(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 531 852**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
G01N 33/533	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01)
A61P 37/02	(2006.01)
A61P 25/02	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2003** **E 10012870 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2336184**

(54) Título: **Administración de agentes para el tratamiento de la inflamación**

(30) Prioridad:

25.02.2002 US 360134 P
23.04.2002 US 374501 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2015

(73) Titular/es:

BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

(72) Inventor/es:

TAYLOR, JULIE y
YEDNOCK, TED A.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 531 852 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Administración de agentes para el tratamiento de la inflamación

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a agentes que se unen específicamente a, e inhiben, un receptor de integrina que comprende una subunidad alfa-4 (a4) y a usos terapéuticos de los mismos.

Antecedentes de la invención

La inflamación es una respuesta de los tejidos vascularizados ante una infección o lesión y se ve afectada por la adhesión de leucocitos a las células endoteliales de vasos sanguíneos y su filtración en los tejidos circundantes. En la inflamación normal, los leucocitos que se infiltran liberan mediadores tóxicos para matar a los organismos invasores, fagocitar residuos y células muertas y desempeñan un papel en la reparación tisular y la respuesta inmunitaria. Sin embargo, en la inflamación patológica, los leucocitos que se infiltran son excesivamente sensibles y pueden provocar daño grave o letal. Véase, por ejemplo, Hickey, Psychoneuroimmunology II (Academic Press 1990).

Las integrinas son una familia de glucoproteínas de superficie celular implicadas en la adhesión celular, migración y activación de células inmunitarias. La integrina alfa-4 se expresa por todos los leucocitos circulantes excepto neutrófilos y forma receptores heterodiméricos junto con las subunidades de integrina betal o beta7; los dímeros tanto alfa-4 beta-1 (α4β1) como alfa-4 beta-7 (α4β7) desempeñan un papel en la migración de leucocitos a través del endotelio vascular (Springer y col., 1994 Cell 76: 301-14; y Butcher y col., 1996 Science 272: 60-6) y contribuyen a la activación y supervivencia celular dentro del parénquima (Damle y col., 1993 J. Immunol. 151: 2368-79; Koopman y col., 1994 J. Immunol. 152: 3760-7; y Leussink y col., 2002 Acta Neuropathol. 103:131-136).

Específicamente, alfa-4 beta-1 (también conocida como el antígeno muy tardío 4 [VLA-4]), se une a la molécula de adhesión de células vasculares 1 *(VCAM-1)* (Lobb y col., 1994 J. Clin. Invest. 94:1722-8), que se expresa por el endotelio vascular en muchos sitios de inflamación crónica (Bevilacqua y col., 1993 Annu. Rev. Immunol. 11: 767-804; y Postigo y col., 1993 Res. Immunol. 144:723-35). El dímero alfa-4 beta-7 interacciona con la molécula de adhesión celular adresina de mucosa (MAdCAM-1) y media la dirección de los linfocitos al intestino (Farstad y col., 1997 Am. J. Pathol. 150: 187-99; y Issekutz y col., 1991 J. Immunol. 147: 4178-84). La expresión de MAdCAM-1 en el endotelio vascular también se aumenta en sitios de inflamación en el tracto intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (Briskin y col., 1997 Am. J. Pathol. 151: 97-110).

Las moléculas de adhesión tales como integrinas alfa-4 son dianas potenciales para agentes terapéuticos. Por ejemplo, el receptor VLA-4, del que la integrina alfa-4 es una subunidad, es una diana importante debido a su interacción con un ligando que reside en células endoteliales del cerebro. Las enfermedades y afecciones resultantes de inflamación cerebral tienen consecuencias particularmente graves. En otro ejemplo, el dímero de integrina alfa-4 beta-7 es una diana importante debido a su implicación en la dirección de los linfocitos y la inflamación patológica en el tracto gastrointestinal.

La integrina alfa-4 beta-1 se expresa en la superficie extracelular de linfocitos y monocitos activados, que se han implicado en la patogénesis de lesiones cerebrales inflamatorias agudas y degradación de la barrera hematoencefálica (BBB) asociada con esclerosis múltiple (EM) (Coles y col., 1999 Ann. Neurol. 46(3): 296-304). Se han ensayado agentes contra la integrina alfa-4 con respecto a su potencial antiinflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. Véase Yednock y col., 1992 Nature 356: 63-66; Patente de Estados Unidos N° 5.840.299 expedida a Bendig, y col. el 24 de noviembre de 1998 y la Patente de Estados Unidos N° 6.001.809 expedida a Thorsett y col. el 14 de diciembre de 1999. Los experimentos *in vitro* demuestran que los anticuerpos de integrina alfa-4 bloquean la unión de los linfocitos a células endoteliales cerebrales. Experimentos que ensayan el efecto de los anticuerpos de integrina alfa-4 en animales que tienen una afección inducida artificialmente que simula la esclerosis múltiple, encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), han demostrado que la administración de anticuerpos anti-integrina alfa-4 evita la inflamación del cerebro y la parálisis posterior en los animales. Colectivamente, estos experimentos identifican anticuerpos anti-integrina alfa-4 como agentes terapéuticos potencialmente útiles para tratar esclerosis múltiple y otros trastornos y enfermedades inflamatorias.

En otro ejemplo específico de inflamación patológica que implica integrinas alfa-4, la enfermedad de Crohn (CD) es una inflamación crónica, incurable, recurrente, transmural del tracto intestinal. La enfermedad se caracteriza por migración y activación celular inmunitaria inapropiada en la mucosa intestinal que implica linfocitos T, macrófagos y neutrófilos (Schreiber y col., 1991 Gastroenterology 101: 1020-30). Las terapias médicas de primera línea para enfermedad de Crohn incluyen 5-aminosalicilatos (5-ASA); que tienen baja eficacia y corticosteroides, que tienen diversos efectos secundarios a corto y largo plazo (Munkholm y col., 1994 Gut 35: 360-2). Se trata a los pacientes refractarios para terapias de primera linea con agentes inmunosupresores tales como azatioprina, 6-rnercaptopurina y metotrexato, pero estos agentes tienen un comienzo de acción lento y efectos secundarios potencialmente graves

(Stein y col., 2001 Surg. Clin. North Am. 81: 71-101, viii). Más recientemente, se han introducido agentes biológicos con un comienzo de acción más rápido para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, pero tales agentes están asediados de forma similar por problemas tales como eficacia a largo plazo y efectos secundarios.

Tilley J.W. et al. (2001 Drugs of the Future 26(10): 985-998) se refiere al uso del anticuerpo anti-integrina alfa 4 natalizumab en el tratamiento de la inflamación patológica provocada por la esclerosis múltiple, donde los pacientes se trataron con infusiones i.v. de natalizumab o placebo durante un periodo de 12 o 24 semanas.

Miller D.H. et al. (2003 N. Engl. J. Med. 348(1): 15-23) proporciona el tratamiento de la esclerosis múltiple con natalizumab donde se administran 3 o 6 mg/kg de peso corporal a los pacientes cada 28 días durante 6 meses.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un agente seleccionado de un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a integrina alfa-4 o un dímero que comprende integrina alfa-4 para preparar una composición farmacéutica administrable de forma crónica para reducir la inflamación patológica crónica causada por esclerosis múltiple en la que el agente es natalizumab que hay que administrar mensualmente durante un periodo de al menos 6 meses al paciente en una cantidad de 1 a 10 mg/kg por paciente.

En una realización, la eficacia de un régimen de dosificación crónico puede determinarse por la medición de saturación de un dímero de integrina específico. En un ejemplo particular, se cree que el dímero de integrina alfa-4 beta-1 está implicado en la esclerosis múltiple y por lo tanto el nivel de saturación requerido para un régimen de administración crónico eficaz puede medirse mediante la medición de la saturación del receptor de dímero alfa-4 beta-1.

En una realización, el éxito de un régimen de dosificación crónico puede determinarse evaluando un marcador fisiológico de la inflamación patológica. Por ejemplo, en un régimen de dosificación crónico administrado para EM, el éxito del régimen de dosificación puede confirmarse por la detección de los niveles de lesiones cerebrales usando una técnica de formación de imágenes, por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

La invención presenta un régimen de dosificación en el que se proporciona administración repetida de un agente para proporcionar un nivel de saturación del receptor de integrina alfa-4 de 65-100 % en un paciente, proporcionado de este modo supresión crónica de la inflamación patológica en el paciente. En otra realización específica, el agente se administra repetidamente para proporcionar niveles de al menos aproximadamente 75-100 % en un paciente. El agente natalizumab se administra repetidamente para proporcionar niveles de al menos aproximadamente 80-100 % en un paciente.

Una característica de la invención es que pueden suprimirse efectos no deseables de la inflamación patológica a largo plazo en un paciente, por ejemplo, durante un periodo de seis meses, un año, dos años o más.

Un aspecto del método de la invención es que se mantienen niveles suficientes de un agente anti-integrina alfa-4 durante periodos largos para suprimir la inflamación patológica durante esos periodos.

Una característica de la invención es que la forma farmacéutica proporciona niveles menores de inflamación patológica durante periodos más largos en comparación con una dosis sencilla.

Una ventaja de la invención es que los agentes usados en los métodos de la invención se toleran bien y tienen baja toxicidad.

Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de los detalles de los métodos y formulaciones como se describen más completamente más adelante.

Breves descripciones de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de líneas que ilustra el número medio acumulativo de nuevas lesiones potenciadas con Gd en pacientes con EM después de dosificación con natalizumab.

La Figura 2 muestra el porcentaje de exploraciones activas en cada punto temporal durante el estudio de EM con natalizumab. Las exploraciones activas son las que contienen una o más nuevas lesiones potenciadas con Gd.

Las Figuras 3A-C y 4A-C muestran las concentraciones en suero de natalizumab después de los puntos temporales del régimen de dosificación en un estudio de EM. Las Figuras 3A-C muestran los niveles para el estudio de 3 mg/kg; Las figuras 4A-C muestran los niveles para el estudio de 6 mg/kg.

Las Figuras 5A-F ilustran los niveles de saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM. Los niveles mostrados son valores de porcentaje.

Las Figuras 6 y 7 muestran el porcentaje de pacientes que consiguen unos criterios predefinidos de respuesta clínica (Figura 6) o remisión (Figura 7) tras la dosificación en el estudio de CD.

La Figura 8 ilustra los cambios medios de la proteína C reactiva en suero en un subconjunto de pacientes que presentaban una proteína C reactiva elevada en la línea basal en el estudio de CD. Los valores de línea basal fueron los siguientes (en mg/l): Placebo: 38,44 (N=26); Grupo de 3+0 mg/kg: 32,35 (N=38); Grupo de 3+3 mg/kg: 41,16 (N=33); y Grupo de 6+6 mg/kg: 333 (N=26).

Las Figuras 9A-B demuestran, respectivamente, los efectos de natalizumab sobre los eosinófilos circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (CU) activas. La Figura 9A demuestra que el natalizumab incrementó significativamente el recuento de eosinófilos circulantes en pacientes con enfermedad de Crohn (n=18) y colitis ulcerosa (n=12) después de una infusión de 3 mg/kg de natalizumab. La Figura 9B muestra que la administración de natalizumab incrementó significativamente el recuento de monocitos en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activas después de una infusión de 3 mg/kg de natalizumab.

Las Figuras 10A-D demuestran el impacto de la administración de natalizumab sobre las células TCRαβ$^+$ que expresan el antígeno de activación. El Panel A demuestra el efecto de natalizumab en pacientes con enfermedad de Crohn activa, es decir, un incremento significativo de las células TCRαβ$^+$ que expresan CD26, HLA-DR, CD8CR y CD8 CD28 hasta al menos cuatro semanas tras la infusión de 3 mg/kg de natalizumab. El Panel B demuestra los efectos de natalizumab sobre las células TCRαβ$^+$ que expresan antígenos de activación en pacientes con colitis ulcerosa activada, es decir, un incremento significativo de las células TCRαβ$^+$ que expresan CD26, HLA-DR, CD8CR y CD8CD28 hasta al menos cuatro semanas tras la infusión de 3 mg/kg de natalizumab. El Panel C demuestra los efectos de la administración de natalizumab sobre las células TCRαβ$^+$ que expresan antígenos de activación y marcadores vírgenes y de memoria en pacientes con enfermedad de Crohn activa, es decir, un incremento significativo de las células TCRαβ$^+$ de la memoria (CD45RO) y vírgenes (CD45RA) hasta al menos cuatro semanas tras la infusión de natalizumab. El Panel B muestra los efectos de natalizumab sobre las células TCRαβ$^+$ que expresan antígenos de activación y marcadores vírgenes y de memoria en pacientes con colitis ulcerosa activa, es decir, un incremento significativo de las células TCRαβ$^+$ de la memoria (CD45RO), vírgenes (CD45RA), CD69 y CD38 en una semana tras la administración de natalizumab.

Las Figuras 11A-B demuestran el efecto de natalizumab sobre las células TCRαβ$^+$ circulantes y células de tipo NK en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activas, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Antes de describirse los presentes métodos y agentes terapéuticos, debe entenderse que la presente invención no está limitada a métodos y agentes terapéuticos particulares descritos, puesto que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta un décimo de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto claramente indique otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos inferiores pueden incluirse independientemente en el inferior, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

Debe observarse que como se usa en el presente documento, las formas singulares "un" y "el" incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de tales anticuerpos y la referencia a "la dosificación" incluye la referencia a una o más dosificaciones y equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la materia y así sucesivamente.

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden requerir confirmarse independientemente.

Definiciones

La expresión "agente antialfa-4" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier agente, que se une específicamente a una integrina que comprende una subunidad alfa-4 e inhibe la actividad de la integrina. Esto incluye agentes que se unen específicamente a integrina alfa-4, así como agentes que se unen a un dímero de integrina que comprende la integrina alfa-4, por ejemplo, alfa-4 beta-1 (α4β1) o alfa-4 beta-7 (α4β7). El término "agentes" pretende incluir moléculas sintéticas y recombinantes (por ejemplo, anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos u otras moléculas o compuestos producidos de forma sintética, así como productos génicos producidos de forma recombinante) así como compuestos de origen natural (por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos y similares).

El término "eficacia" como se usa en el presente documento en el contexto de un régimen de dosificación crónico se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento particular. La eficacia puede medirse basándose en el cambio del curso de la enfermedad en respuesta a un agente de la presente invención. Por ejemplo, en el tratamiento de EM, la eficacia puede medirse por la frecuencia de recaídas en EM recidivante-remitente y por la presencia o ausencia de nuevas lesiones en el sistema nervioso central como se detecta usando procedimientos tales como MRI.

El término "éxito" como se usa en el presente documento en el contexto de regímenes de tratamiento crónicos se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento particular. Esto incluye un equilibrio de eficacia, toxicidad (por ejemplo, efectos secundarios y tolerancia del paciente de una formulación o unidad farmacéutica), conformidad del paciente y similares. Para que un régimen de administración crónico se considere "exitoso" debe equilibrar diferentes aspectos des cuidado del paciente y eficacia para producir el resultado más favorable para el paciente.

Las expresiones "se une específicamente" o "específicamente se une" como se usan en el presente documento se refieren a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su compañero de unión específico (por ejemplo, una afinidad de aproximadamente 1.000x o más por su compañero de unión). En la presente invención, el agente anti-integrina alfa-4 no mostrará unión significativa a ningún polipéptido distinto de una integrina alfa-4 o un receptor que comprenda una integrina alfa-4. Por ejemplo, los anticuerpos usados en los métodos de la invención que se unen a una integrina alfa-4 con una afinidad de unión de 10^7 moles/l o más, preferentemente 10^8 moles/l o más, se dice que se unen específicamente a una integrina alfa-4.

La expresión "sustancialmente homólogo" como se usa en el presente documento pretende significar cualquier polipéptido que tenga una alteración en la secuencia de modo que se sustituye un aminoácido funcionalmente equivalente con uno o más aminoácidos en el polipéptido, produciendo de este modo un cambio que tienen un efecto nulo o relativamente pequeño en las propiedades de unión del polipéptido. Por ejemplo, uno o más restos aminoacídicos dentro de la secuencia pueden sustituirse con otro aminoácido de una polaridad similar.

Las expresiones "induce una respuesta inmunitaria" e "induce una respuesta inmunitaria del huésped" como se usan el presente documento se refieren a la producción de una respuesta inmunológica a un receptor que comprende una integrina alfa-4 en un sujeto tras la introducción de un agente de la invención al sujeto. Una respuesta inmunitaria en el sujeto puede caracterizarse por reactividad de suero con un receptor de integrina alfa-4 que es al menos dos veces la de un sujeto no tratado, más preferentemente tres veces la reactividad de un sujeto no tratado e incluso más preferentemente al menos cuatro veces la reactividad de un sujeto no tratado, midiéndose la inmunorreactividad en suero usando una dilución en suero de aproximadamente 1:100.

La expresión "material excipiente" pretende significar cualquier compuesto que forme una parte de la formulación que se pretende que actúe meramente como un vehículo, es decir no se pretende que tenga actividad biológica en sí misma.

El término "adyuvante" como se usa en el presente documento se refiere a un aditivo de la composición que aumenta la respuesta inmunitario a un agente de la invención pero que no inducirá por sí mismo una respuesta inmunitario. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmunitario usando una diversidad de mecanismos biológicos, incluyendo pero sin limitación reclutamiento linfocítico, estimulación de linfocitos T, estimulación de linfocitos B y estimulación de macrófagos.

Los términos "tratando" y "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para significar generalmente la obtención de un efecto fisiológico y farmacológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir o parcialmente prevenir una enfermedad, síntoma o afección de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, afección, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) evitar que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero al que aún no se haya diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar una regresión de una enfermedad y/o sus síntomas o afecciones. La divulgación se refiere al tratamiento del padecimiento de un paciente de una enfermedad relacionada con la inflamación patológica. La presente invención está implicada en prevenir,

inhibir o aliviar efectos adversos atribuidos a la inflamación patológica durante periodos largos de tiempo y/o son tales causados por las respuestas fisiológicas a la inflamación inapropiada presente en un sistema biológico durante periodos largos de tiempo.

La expresión "inflamación patológica" como se usa en el presente documento se refiere a una inflamación inapropiada y crónica asociada con trastornos que incluyen, pero sin limitación, asma, aterosclerosis, demencia de SIDA, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, rechazo de transplantes, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple (especialmente para inhibir la desmielinización adicional), metástasis tumoral, nefritis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones de anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión de pulmón mediada por leucocitos aguda. Tal inflamación se caracteriza por una respuesta aumentada de las células inflamatorias, incluyendo leucocitos que se infiltran. A lo largo del tiempo, tal inflamación patológica con frecuencia da como resultado daño al tejido en la región de inflamación inapropiada.

Por "Antegren®" se entiende incluir el anticuerpo también conocido como AN 100226 (código numérico de anticuerpo) o natalizumab (nombre USAN). Antegren® es un anticuerpo anti-integrina alfa-4 humanizado recombinante. Preferentemente la enfermedad o afección que hay que tratar en el mamífero es una que se modula cuando se administra una dosis terapéuticamente eficaz de Antegren®.

Aspectos generales de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente resultado de que la administración crónica de una clase emergente de nuevos compuestos conocidos como inhibidores de moléculas de adhesión selectivos (SAMI) es suficiente para proporcionar el mantenimiento de supresión crónica de la inflamación en trastornos que implican dímeros de integrina. Tras el cese del régimen de dosificación repetido, la supresión de la inflamación se invierte (véase, por ejemplo, la Figura 2). Tratamientos previos de inhibidores de inflamación han enfocado los regímenes de dosificación de forma bastante diferente, creyendo que la administración de un inhibidor de inflamación provocaría una reacción del sistema de respuesta del propio cuerpo, que a su vez conduciría a un reconocimiento de la inflamación como patológica y un alivio crónico resultante de la inflamación patológica. Lo que los inventores han mostrado en el presente documento es que un régimen de dosificación crónico no solamente es más eficaz que un régimen de dosificación a corto plazo, sino que de hecho se requiere para mantener la supresión de la inflamación patológica. Por lo tanto, para conseguir algunas de las ventajas más importantes de la invención, los niveles de un agente anti-integrina alfa-4 necesitan mantenerse durante varios meses o incluso años.

La presente invención se basa en los resultados de un ensayo grande, seleccionado de forma aleatoria y controlado por placebo de un anticuerpo anti-integrina alfa-4, natalizumab, en pacientes con EM recidivante o con CD de moderada a gravemente activa. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante antagonista contra integrina alfa-4. Los resultados de estos dos ensayos han mostrado que el tratamiento con natalizumab mejoraba las señales y síntomas de pacientes con EM.

En un sentido general el método de la invención no implica ningún modo particular de administración, puesto que el modo de administración es dependiente de la forma del agente activo y la formulación desarrollada para administrar el agente o agentes activos. Sin embargo, los ejemplos específicos descritos en este documento se obtuvieron usando administración parenteral de natalizumab.

El concepto general de la invención se refiere a introducir cantidades relativamente constantes de natalizumab al sistema circulatorio de un paciente durante un periodo de meses o años. Esta introducción crónica de un agente que se une selectivamente a integrina alfa-4 o un dímero que comprende integrina alfa-4 da como resultado que la supresión de la inflamación patológica se mantenga a un nivel constante durante un periodo de tiempo. Manteniendo los niveles terapéuticos de un agente activo durante un periodo de tiempo, la inflamación patológica puede suprimirse crónicamente en el paciente.

En un sentido muy especifico, la invención implica obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano de un dímero que comprende integrina alfa-4 en un intervalo de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 100 %, **más** preferentemente entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 % e incluso más preferentemente entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 100 %. Estos niveles de saturación del receptor se mantienen a estos niveles de forma crónica (por ejemplo, durante un periodo de 6 meses aproximadamente) para permitir la supresión continuada de inflamación patológica.

Anticuerpos

El agente de la invención es el anticuerpo natalizumab o fragmentos inmunológicamente activos del mismo que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o un dímero que comprende alfa-4, tal como alfa-4 beta-1.

Los fragmentos inmunológicamente activos incluyen fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id

para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. Más preferentemente los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab' y $F(ab')_2$, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv ligados por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que pueden comprender cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

Pueden producirse anticuerpos quiméricos y humanizados a partir de anticuerpos no humanos y pueden tener la misma o similar afinidad de unión que el anticuerpo del que se producen. Las técnicas para producir anticuerpos quiméricos (Morrison y col., 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851; Neuberger y col., 1984 Nature 312: 604; Takeda y col., 1985 Nature 314: 452) incluyen corte y empalme de los genes de, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de ratón de especifidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada; tales anticuerpos están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una región variable (V) de un anticuerpo monoclonal de ratón puede unirse a un ácido nucleico que codifica una región constante humana (C), por ejemplo IgG1 o IgG4.

Si el agente es un anticuerpo, de acuerdo con la presente invención que va a proporcionarse a un individuo, la administración es mediante un régimen de dosificación crónica. La cantidad real administrada y la velocidad y curso temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre dosificación, etc., están dentro de la responsabilidad de facultativos generales y otros doctores en medicina y normalmente tiene en cuenta el trastorno que hay que tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos para los facultativos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª edición, Osol, A. (ed.), 1990.

Composiciones farmacéuticas

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas para la reducción de la inflamación patológica crónica en un sujeto susceptible de esta y/o que padece un trastorno asociado con la inflamación patológica.

Las formulaciones farmacéuticas preferentemente contienen un agente en una concentración de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % de la formulación. También pueden usarse en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son meramente a modo de ejemplo y no se pretende de ningún modo que sean limitantes.

Para preparaciones orales, los agentes pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes o agentes saporíferos.

Cuando el agente es un anticuerpo, la formulación se administra preferentemente en una forma farmacéutica parenteral. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, excipientes o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración humana o animal. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no inmunogénicos, no terapéuticos, no tóxicos y similares. También pueden incluirse moléculas vehículo tales como proteoglucanos. Los ejemplos específicos de tales moléculas vehículo incluyen, pero sin limitación, glucosaminoglucanos tales como heparín sulfato, ácido hialurónico, queratán sulfato, condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, heparán sulfato y dermatín sulfato, perlecan y pentopolisulfato.

Los anticuerpos pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o como una suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua y aceites con o sin la adición de un tensioactivo. Otras preparaciones farmacéuticas son las de origen sintético, vegetal, animal o de petróleo, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los agentes pueden administrarse en una forma de liberación prolongada, por ejemplo una

inyección de depósito, preparación de implante o bomba osmótica, que pueden formularse de tal manera que permitan una liberación prolongada del principio activo.

Además, pueden proporcionarse anticuerpos administrando un polinucleótido que codifique un anticuerpo parcial o completo (por ejemplo, un Fv de cadena sencilla) a un sujeto. El polinucleótido se administra a un sujeto en un vehículo apropiado para permitir la expresión del anticuerpo en el sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Los agentes pueden formularse en preparaciones para inyecciones disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol. Las formulaciones también pueden contener aditivos convencionales tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

Los agentes pueden usarse en formulación de aerosol para administrarse mediante inhalación o suministro pulmonar. Los agentes de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, los agentes pueden componerse en supositorios mezclando con diversas bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los agentes pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carbowax y polietilenglicoles, que se funden a temperatura corporal, pero están solidificados a temperatura ambiente.

La administración puede conseguirse por cualquier medio conveniente, incluyendo inyección parenteral y puede ser de suministro sistémico o localizado. Los agentes pueden incorporarse en una diversidad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los agentes pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, liquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Como tal, la administración puede conseguirse de diversas maneras, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, intranasal, gástrica, intramuscular, intracraneal, subdérmica, etc. El agente activo puede ser sistémico después de su administración o puede localizarse mediante el uso de administración regional, administración intramural o el uso de un implante que actúa para conservar la dosis activa en el sitio de implantación.

Pueden proporcionarse formas farmacéuticas unitarias para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharada, cucharada sopera, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más agentes de la presente invención. De forma similar, las formas farmacéuticas unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el agente de la presente invención en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los implantes para formulaciones de liberación prolongada se conocen bien en la técnica. Los implantes se formulan como microesferas, bloques, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que tolera bien el huésped. El implante se coloca en proximidad al sitio de depósitos de proteína (por ejemplo, el sitio de formación de depósitos amiloides asociados con trastornos neurodegenerativos), de modo que la concentración local de agente activo aumenta en ese sitio en relación con el resto del cuerpo.

Una unidad farmacéutica típica para administración de un sujeto incluye, pero sin limitación: una solución adecuada para administración intravenosa; un comprimido tomado de dos a seis veces al día; o una cápsula o comprimido de liberación en una vez tomado una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente mayor de principio activo, etc. El efecto de liberación temporizada puede obtenerse a través de materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, a través de cápsulas que liberan lentamente por presión osmótica o por cualquier otro medio conocido de liberación controlada.

Los anticuerpos en ocasiones se administran en combinación con un adyuvante. Pueden usarse diversos adyuvantes en combinación con un agente anti-integrina alfa-4 para inducir una respuesta inmunitario. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un agente sin provocar cambios conformacionales en el agente que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL™) (Véase documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). StimulonTM QS-21 es un glucósido triterpeno o saponina aislado de la corteza del árbol *Quillaja Saponaria* Molina hallado en América del Sur (véase Kensil y col., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente de Estados Unidos N° 5.057.540, (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación

con estimulantes inmunitarios, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute y col., 1997 N. Engl. J. Med. 336: 86-91). Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Como alternativa, un agente puede acoplarse a un adyuvante, sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación del epítopo de alfa-4 deseado de modo que afecte a la naturaleza de la respuesta inmunitario del huésped. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse de forma separada antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes para administración son sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son formulaciones de emulsión de aceite en agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitol-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida™ u otros componentes de pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene escualeno 5 %, Tween 80 0,5 % y Span 85 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene escualeno 10 %, Tween 80 0,4 %, polímero bloqueado con pluronic L121 5 % y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor y (c) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno 2 %, Tween 80 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™). Otra clase de adyuvantes preferidos son adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21; Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir del mismo, tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo e incompleto de Freund (IFA), citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF). Tales adyuvantes generalmente están disponibles de fuentes comerciales.

Un adyuvante puede administrarse con un agente como una composición sencilla o puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración del agente. El agente y un adyuvante pueden envasarse y proporcionarse en el mismo recipiente o pueden envasarse en recipientes separados y mezclarse antes de su uso. El agente y el adyuvante se envasan normalmente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el agente y adyuvante se envasan por separado, el envase normalmente incluye instrucciones para mezclar antes de su uso. La selección de un adyuvante y/o vehículo depende de factores tales como la estabilidad de la formulación que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación y la eficacia del adyuvante para la especie a vacunar. En seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable preferido es uno que se ha aprobado para administración humana por los cuerpos reguladores pertinentes. Los ejemplos de tales adyuvantes preferidos para seres humanos incluyen alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, dos o más adyuvantes diferentes pueden usarse simultáneamente. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21 y alumbre, QS-21 y MPL juntos. Además, puede usarse el adyuvante incompleto de Freund (Chang y col., 1998 Advanced Drug Delivery Reviews 32: 173-186), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

Regímenes de dosificación de administración crónica

Los regímenes de tratamiento crónico de la presente invención proporcionan el agente anti-integrina alfa-4 natalizumab a un nivel que mantendrá suficiente saturación del receptor para suprimir la inflamación patológica en un paciente que lo necesite. Los métodos de la invención implican la administración una vez al mes teniendo lugar dosificaciones repetidas durante un periodo de al menos seis meses y más preferentemente durante un año o más. Los métodos de la invención implican obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano de un dímero que comprende integrina alfa-4 (por ejemplo, VLA-4) en un intervalo de aproximadamente el 65 % al 100 %, más preferentemente entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 % e incluso más preferentemente entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 100 %. Estos niveles de saturación del receptor se mantienen a estos niveles de forma crónica (por ejemplo, durante un periodo de 6 meses aproximadamente) para permitir la supresión continuada de la información patológica.

En la invención, el agente anti-alfa 4 es el anticuerpo humanizado, natalizumab, y la dosificación es mensual. Pueden controlarse los niveles de saturación del receptor para determinar la eficacia del régimen de dosificación y medirse los marcadores fisiológicos para confirmar el éxito del régimen de dosificación. Como confirmación, pueden controlarse los niveles en suero del anticuerpo para identificar la eliminación del anticuerpo y para determinar el efecto potencial de la semivida en la eficacia del tratamiento.

La cantidad de agente administrado en una unidad de dosificación puede depender de si también se administra un

adyuvante, requiriéndose por lo general dosificaciones más elevadas en presencia de adyuvante. Para la inmunización con el agente de la invención, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal. La dosificación y la frecuencia pueden variar dependiendo de la semivida del agente en el paciente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. De acuerdo con los principios proporcionados en la presente, las dosificaciones eficaces se pueden monitorizar obteniendo una muestra de fluido del paciente, generalmente una muestra de fluido cerebroespinal o de suero sanguíneo, y determinando la saturación del receptor de integrina utilizando métodos conocidos en la técnica. Idealmente, se toma una muestra antes de la dosificación inicial; se toman muestras posteriores y se evalúan antes y/o después de cada inmunización.

Cuando se administra adyuvante, el nivel de dosificación se aumenta de acuerdo con el adyuvante particular y el nivel de inmunogenicidad del agente anti-alfa 4. Las dosis para agentes individuales, seleccionadas de acuerdo con la presente invención, se determinan de acuerdo con métodos de dosificación convencionales, tomados junto con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Como alternativa a la administración crónica comprendida por dosificaciones individuales repetidas, puede administrarse un agente anti-alfa 4 como una formulación de liberación prolongada, siempre que la dosificación sea tal que los niveles de saturación del receptor sigan siendo suficientes para suprimir la inflamación. Por ejemplo, pueden usarse sistemas de liberación controlada para administrar de forma crónica un agente anti-alfa 4 dentro del alcance de la presente invención. Pueden encontrarse análisis de formas farmacéuticas de liberación controlada apropiadas en Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.).

Las diversas tecnologías de liberación controlada abarcan un espectro muy amplio de formas de dosificación farmacológicas. Las tecnologías de liberación controlada incluyen, pero sin limitación, sistemas físicos y sistemas químicos. Los sistemas físicos incluyen, pero sin limitación, sistemas de depósito con membranas controladoras de la velocidad, tales como microencapsulación, macroencapsulación y sistemas de membrana; los sistemas de depósito sin membranas controladoras de la velocidad, tales como fibras huecas, triacetato de celulosa ultramicroporosa y sustratos poliméricos porosos y espumas; sistemas monolíticos, incluyendo los sistemas físicamente disueltos en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo, no erosionables, erosionables, de penetración de agente ambiental y degradables) y materiales físicamente dispersados en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo, no erosionables, erosionables, de penetración de agente ambiental y degradables); estructuras laminadas, incluyendo capas de depósito químicamente similares o diferentes a capas de control exteriores; y otros procedimientos físicos, tales como bombas osmóticas o adsorción en resinas de intercambio iónico.

Los sistemas químicos incluyen, pero sin limitación, erosión química de matrices poliméricas (por ejemplo, erosión heterogénea u homogénea) o erosión biológica de una matriz polimérica (por ejemplo, heterogénea u homogénea). Puede encontrarse un análisis adicional de categorías de sistemas para liberación controlada en Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory anti Applications, 1980 (CRC Press, Inc.).

El anticuerpo puede usarse para tratar a un paciente que está afectado por un trastorno que implica o surge de la inflamación patológica o para tratar de forma profiláctica a un paciente en riesgo de un trastorno particular. Los regímenes de dosificación que son necesarios para tratamiento profiláctico frente a terapéutico pueden variar y requerirán diseñarse para el uso específico y trastorno tratado.

En algunos métodos, se administran dos o más agentes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión) simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada agente administrado queda dentro de los rangos indicados. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indica por medición de los niveles de saturación del receptor o siguiendo otros indicios del proceso de la enfermedad.

Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosificación pueden variar en función del agente específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios. Algunos de los agentes específicos son más potentes que otros. Las dosificaciones preferidas para un agente dado son fácilmente determinables por los expertos en la materia por una diversidad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un agente dado.

Indicaciones terapéuticas

Las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para obtener un amplio intervalo de efectos deseables. Particularmente las formulaciones son útiles para tratar esencialmente cualquier patología o síntoma que es tratable por administración a largo plazo de antiinflamatorios que se dirigen a una inflamación patológica.

El uso del anticuerpo es en el tratamiento de esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune neurológica progresiva que afecta a una estimación de 250.000 a 350.000 personas en los Estados Unidos. Se cree que la esclerosis múltiple es el resultado de una reacción autoinmune específica en la que ciertos

leucocitos atacan e inician la destrucción de la mielina, la vaina aislante que cubre las fibras nerviosas. En un modelo animal para esclerosis múltiple, se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra la integrina alfa-4 beta-1 bloquean la adhesión de los leucocitos al endotelio y evitan de este modo la inflamación del sistema nervioso central y la parálisis posterior en los animales.

La aparición de EM puede ser dramática o tan suave que no provoque que un paciente busque atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad (en una o más extremidades), visión borrosa debido a neuritis óptica, alteraciones sensoriales, diplopía y ataxia. El curso de la enfermedad puede estratificarse en tres categorías generales: (1) EM recidivante, (2) EM progresiva crónica y (3) EM inactiva. La EM recidivante se caracteriza por ataques recurrentes de disfunción neurológica. Los ataques de EM generalmente evolucionan durante días a semanas y pueden seguirse de recuperación completa, parcial o ninguna. La recuperación de los ataques generalmente se produce en un periodo de semanas a varios meses desde el pico de los síntomas, aunque de forma poco habitual alguna recuperación puede continuar durante dos o más años.

La EM progresiva crónica conduce al empeoramiento progresivo gradualmente sin periodo de estabilización o remisión. Esta forma se desarrolla en pacientes con un historial anterior de EM recidivante, aunque en el 20 % de los pacientes, no pueden encontrarse recaídas. Las recaídas agudas también pueden producirse durante el transcurso progresivo.

Una tercera forma es EM inactiva. La EM inactiva se caracteriza por déficits neurológicos fijos de magnitud variable. La mayoría de los pacientes con EM inactiva tienen un historial anterior de EM recidivante.

El curso de la EM también depende de la edad del paciente. Por ejemplo, los factores de pronóstico favorable incluyen aparición temprana (excluyendo infancia), un transcurso recidivante y poca discapacidad residual 5 años después de la aparición. Por el contrario, se asocia un pronóstico negativo con una edad tardía de aparición (es decir, 40 años de edad o mayor) y un transcurso progresivo. Estas variables son interdependientes, puesto que la EM progresiva crónica tiende a comenzar a una edad más tardía que la EM recidivante. La discapacidad de la EM progresiva crónica habitualmente se debe a paraplejía o tetraplejia progresiva en pacientes individuales. En un aspecto de la invención, los pacientes se tratarán preferentemente cuando el paciente esté en remisión en lugar de cuando esté en una etapa recidivante de la enfermedad.

El uso a corto plazo de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) o corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona oral o metilprednisolona intravenosa) es la única medida terapéutica específica para tratar pacientes con empeoramiento agudo de EM.

Las terapias más nuevas para EM incluyen tratar al paciente con interferón beta-1b, interferón beta-1a y copaxone® (anteriormente conocido como copolímero 1). Se ha mostrado que estos tres fármacos reducen significativamente la tasa de recaída de la enfermedad. Estos fármacos normalmente se autoadministran por vía intramuscular o vía subcutánea.

Ninguno de los tratamientos actualmente disponibles inhibe la desmielinización o EM. Un aspecto de la invención contempla tratar la EM con agentes desvelados en el presente documento solos o en combinación con otras modalidades de tratamiento convencionales. Las modalidades de tratamiento convencionales incluyen pero sin limitación las siguientes. Las modalidades de tratamiento adicionales no analizadas en el presente documento para su uso en el tratamiento de EM en combinación con los métodos y composiciones desvelados en el presente documento dependiendo del estado de la enfermedad en el paciente serían evidentes para el facultativo experto. Tales modalidades de tratamiento adicional para EM u otra inflamación patológica incluirían otros inmunomoduladores o inmunosupresores.

Los agentes y composiciones farmacéuticas analizados anteriormente pueden administrarse de forma crónica para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de los trastornos inflamatorios anteriormente enumerados, incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, aterosclerosis, artritis reumatoide, rechazo de injerto u órgano y enfermedad de injerto contra huésped. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente sospechoso de, o que ya padece una enfermedad tal en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz.

En aplicaciones profilácticas, se administran de forma crónica composiciones farmacéuticas a un paciente susceptible de, o de cualquier otro modo en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retardar la aparición de la enfermedad. Se define que una cantidad tal es una dosis profilácticamente eficaz. En pacientes con esclerosis múltiple en remisión, puede evaluarse el riesgo por formación de imágenes por NMR o, en algunos casos, por indicios presintomáticos observados por el paciente.

Los regímenes de dosificación eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medio de

administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. De este modo, se requerirá valorar las dosificaciones de tratamiento para optimizar la seguridad y eficacia. En general, cada administración del régimen de dosificación variará de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped.

Terapias de combinación

Los agentes anti-alfa 4 pueden usarse con cantidades eficaces de otros agentes terapéuticos contra la inflamación aguda y crónica. Tales agentes incluyen otros antagonistas de moléculas de adhesión (por ejemplo, otras integrinas, selectinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) (véase Springer, 1990 Nature 346: 425-433; Osborn, 1990 Cell 62: 3; Hynes, 1992 Cell 9: 11). Las integrinas son glucoproteínas transmembrana heterodiméricas que consisten en una cadena α (120-180 kDa) y una cadena β (90-110 kDa), que tienen generalmente dominios citoplasmáticos cortos. Por ejemplo, tres integrinas importantes (es decir, LFA-1, Mac-1 y P150,95) tienen diferentes subunidades alfa, designadas CAD 11a, CAD 11b y CD 11c y una subunidad beta común designada CD18. LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) se expresa en linfocitos, granulocitos y monocitos y se une predominantemente a un contrarreceptor miembro de la familia Ig denominado ICAM-1 y ligandos relacionados. ICAM-1 se expresa en muchas células, incluyendo leucocitos y células endoteliales y se regula positivamente en el endotelio vascular por citocinas tales como TNF e IL-1. Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) se distribuye en los neutrófilos y monocitos y también se une a ICAM-1. La tercera integrina p2, P150,95 ($\alpha_x\beta_2$), también se encuentra en los neutrófilos y monocitos. Las selectinas consisten en L-selectina, E-selectina y P-selectina.

Otros agentes antiinflamatorios que pueden usarse en combinación con los agentes anti-alfa 4 incluyen anticuerpos y otros antagonistas de citocinas, tales como interleucinas IL-1 a IL-13, factores de necrosis tumoral a y β, interferones α, β y γ, factor de crecimiento tumoral beta (TGF-β), factor estimulador de colonias (CSF) y factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF). Otros agentes antiinflamatorios incluyen anticuerpos y otros antagonistas de quimiocinas tales como MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, exotaxina e IL-8. Otros agentes antiinflamatorios incluyen AINE, esteroides y otras moléculas pequeñas inhibidoras de la inflamación. Las formulaciones, vías de administración y concentraciones eficaces de agentes para terapias combinadas son como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos humanizados contra integrina alfa-4.

Los agentes adicionales para su uso en combinación con agentes que median la integrina alfa-4 o los dímeros que comprenden integrina alfa-4 y tratan la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (CU), incluyen pero sin limitación 5-aminosalicilatos, glucocorticoides, derivados de tioguanina, metotrexato (MTX), ciclosporina, antibióticos e infliximab.

Los 5-aminosalicilatos incluyen sulfasalazina (también conocida como Azulfidina) que es un conjugado de mesalamina ligado a sulfapiridina por un enlace diazo y se administra habitualmente en una cantidad de 500 mg/día a aproximadamente 6 g/día. Los 5-aminosalicilatos también pueden coadministrarse con un glucocorticoide. Preferentemente, se usa un 5-aminosalicilato en terapia de combinación con uno de los agentes adicionales analizados en el presente documento para tratar la colitis ulcerosa, sin embargo también puede usarse para tratar la enfermedad de Crohn. Las formulaciones de mesalamina que no contienen sulfonamida incluyen pero sin limitación ASACOL®, CLAVERSA, SALOFALK, PENTASA®, DIPENTUM®, COLAZIDE y ROWASA®.

Los glucocorticoides han sido un fundamento del tratamiento para empeoramientos graves agudos de IBD desde 1955, cuando se mostró por primera vez que eran eficaces en CU. La prednisona oral puede administrarse junto con cualquiera de los agentes desvelados en el presente documento. Normalmente, se administran de 20 a 40 mg de prednisona oral una vez al día. Los glucocorticoides también pueden administrarse por vía intravenosa y mediante enemas en combinación con, simultáneamente con o en un periodo de tiempo corto antes o después de que se administre un agente anti-integrina alfa-4. Por ejemplo, la hidrocortisona está disponible como un enema de retención (100 mg/60 ml) y la dosis habitual es un enema de 60 ml por noche durante 2 a 3 semanas. Esto puede alterarse cuando se usa en combinación con las terapias y agentes analizados en el presente documento como se entendería por el experto en la materia. Otros esteroides que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, metasulfobenzoato de prednisolona, pivalato de tixocortol, propionato de fluticasona, dipropionato de beclometasona y budesonide.

Los derivados de tioguanina también son útiles en el tratamiento de IBD, CD y CU. Estos incluyen pero sin limitación 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina (IMURAN). Los dos fármacos pueden usarse de forma intercambiable en combinación con cualquiera de los agentes moduladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento.

También se contempla el metotrexato (MTX) para su uso en combinación con los agentes reguladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento. Preferentemente, MTX se administra mediante inyección intramuscular (i.m.) al sujeto en combinación con un agente anti-integrina alfa-4. MTX es eficaz en CD dependiente de esteroides, pero no tan útil en CU. MTX puede administrarse en cantidades de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg por semana por sujeto o según sea necesario como se determine por el experto en la materia.

También pueden usarse ciclosporinas (por ejemplo, SANDIMMUNE®, NEORAL®) en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento para tratar la inflamación patológica del intestino. Esto puede usarse para tratar CU grave aguda, que no responde a glucocorticoides.

Infliximab (es decir, REMICADE®) también puede usarse para tratar CD en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 indicados en el presente documento. Infliximab es una inmunoglobulina que se une a TNF y neutraliza de este modo su actividad. Otros anticuerpos anti-TNF tales como CDP571, también pueden usarse en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento.

También se contemplan anticuerpos para su uso en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 indicados en el presente documento para modular CU, IBD y CD. Por ejemplo, los pacientes pueden tratase con metronidazol o ciprofloxacina (o equivalentes farmacológicos de los mismos) en combinación con un agente mediador de integrina alfa-4 o en forma de una mezcla.

También se contempla el uso de terapias de apoyo para IBD, CD y CU junto con agentes que median la integrina alfa- 4 o los dímeros que comprenden integrina alfa-4 y tratan la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Las terapias de apoyo incluyen, pero sin limitación, analgésicos, agentes anticolinérgicos y antidiarreicos. Combinar tales terapias de apoyo puede ser útil al comienzo de un régimen de tratamiento para reducir los síntomas de un paciente y mejorar su calidad de vida. Las terapias de apoyo incluyen administración oral de hierro, folato y vitamina B_{12}. Los agentes antidiarreicos incluyen, pero sin limitación difenoxilato, codeína, loperamida y anticolinérgicos (o equivalentes farmacológicos de los mismos), que pueden administrarse a pacientes con enfermedad suave para reducir la frecuencia de movimientos intestinales y aliviar la urgencia rectal. Puede usarse colestiramina en pacientes para evitar la secreción colónica inducida por sal biliar en pacientes que ya se hayan sometido a resecciones ileocólicas limitadas antes del tratamiento con los regímenes crónicos descritos en el presente documento. Los agentes anticolinérgicos incluyen, pero sin limitación, bromuro de clidinio, clorhidrato de diclomina, tintura de belladona y similares y son útiles para reducir calambres abdominales, dolor y urgencia rectal.

Para el tratamiento de EM, los agentes anti-integrina alfa-4 (por ejemplo, anticuerpos anti-integrina alfa-4, compuestos pequeños antagonistas de integrina alfa-4 y similares) pueden combinarse con otros compuestos o composiciones usados para tratar, aliviar o paliar síntomas asociados con EM.

Otros agentes usados para tratar, la aliviar o paliar síntomas asociados con EM, incluyen pero sin limitación: relajantes musculares (por ejemplo, Diazepam, ciclobenzaprina, Clonazepam, clonidina, primidona y similares), anticolinérgicos (por ejemplo, propantelina, diciclomina y similares), estimulantes del sistema nervioso central (por ejemplo, Pemolina) agentes antiinflamatorios no esteroideos (NE tales como ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno), interferones, inmunoglobulina, glatirámero (Copaxone®), mitoxantrona (Novantrone®), misoprostol, inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (por ejemplo, Pirfenidona, infliximab y similares) y corticosteroides (por ejemplo, glucocorticoides y mineralocorticoides).

Los agentes habituales para tratar la esclerosis múltiple incluyen interferón beta-1b (Betaseron®), interferón beta-1a (Avonex®), interferón de alta dosis beta-1a (Rebif), Glatirámero (Copaxone®), inmunoglobulina, mitoxantrona (Novantrone®), corticosteroides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona y similares). Otros corticosteroides también pueden usarse e incluyen pero sin limitación cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6α-metilprednisolona, triamcinolona y betametasona.

Las formas farmacéuticas de los agentes a usar en combinación con los compuestos y composiciones desvelados en el presente documento variarían dependiendo del sujeto y combinación farmacológica que se usa. Por ejemplo, los interferones se administran normalmente como sigue: interferón beta-1a (Avonex®) se administra a 30 µg una vez por semana; interferón beta-1a se administra a aproximadamente 22 µg o 44 µg tres veces por semana; e interferón beta 1b (Betaseron®) se administra a 250 µg en días alternos (Durelli y col., Lancet 359: 1453-60, 2002). Normalmente los interferones se administran para esclerosis múltiple recidivante o remitente. De este modo en combinación con los agentes anti-integrina alfa-4 desvelados en el presente documento, los intervalos preferidos de interferones pueden incluir de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 250 µg y más preferentemente de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 50 µg, dependiendo de la manera en la que el agente se administre junto con los otros compuestos anti-integrina alfa-4 y composiciones desveladas en el presente documento.

Los AINE o NE contemplados para su uso con la presente invención incluyen pero sin limitación inhibidores de COX no selectivos e inhibidores de COX-2 selectivos. Los inhibidores de COX no selectivos incluyen pero sin limitación derivados de ácido salicílico (por ejemplo, aspirina), salicilatos sódicos, trisalicilato magnésico de colina, salsalato, diflunisal, sulfasalazina y olsalazina), derivados de paraaminofenol (por ejemplo, acetaminófeno), ácidos acéticos de indeno e indol (por ejemplo, tolmetina, diclofenaco y ketorolaco), ácidos acéticos de heteroarilo (por ejemplo, abuprofeno, naproxeno, flubiprofeno, ketoprofeno, fenprofeno y oxaprozina), ácidos antranílicos o fenamatos (por ejemplo, ácido mefenámico y ácido meclofenámico), ácidos enólicos (por ejemplo, oxicam tales como piroxicam y meloxicam) y alcanonas (por ejemplo, nabumetona). Los inhibidores de COX-2 selectivos incluyen furanonas sustituidas con diarilo (por ejemplo, rofecoxib), pirazoles sustituidos con diarilo (por ejemplo, celecoxib), ácidos

acéticos de indol (por ejemplo, etodolac) y sulfonanilidas (por ejemplo, nimesulida). Los NE se administran con frecuencia en combinación con interferón para reducir los síntomas de tipo gripe experimentados por pacientes que reciben, por ejemplo, Avonex®. Los agentes de NE habituales incluyen naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno. El paracetamol también se administra frecuentemente a los pacientes. Véase, Reess y col., 2002 Mult. Soler. 8: 15-8.

El acetato de glatirámero (GA, Copaxone®) es una molécula sintética que inhibe la activación de los linfocitos T reactivos a proteína básica de mielina e induce un repertorio de linfocitos T caracterizado por efectos antiinflamatorios. Además, el glatirámero puede acceder al sistema nervioso central (SNC), mientras que el interferón-beta no puede (Dhib-Jalbut, 2002 Neurology 58: S3-9; Weinstock-Guttman y col., 2000 Drugs 59: 401-10).

La mitoxantrona es un agente sintético de antracenodiona, que se ha demostrado que es eficaz para tratar la esclerosis múltiple progresiva secundaria (EM-PS). Sin embargo, el uso de este fármaco está limitado de nuevo por su cardiotoxicidad acumulativa (Weinstock-Guttman y col., 2000).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) puede ser una citocina clave en la desmielinización (Walker y col., 2001 Mult. Scler. 7: 305-12). De este modo el uso de agentes que antagonizan la función de TNF-a o inhiben su síntesis pueden ser útiles en combinación con los agentes y compuestos desvelados en el presente documento. Esto puede incluir anticuerpos anti-TNF-a (por ejemplo, infliximab) así como agentes tales como pirfenidona. La pirfenidona es un fármaco no peptídico, que se ha mostrado que reduce la síntesis de TNF-α y que bloquea receptores para TNFα. Misma referencia.

El principal pilar en la mayoría de las afecciones y enfermedades desmielinizantes ha sido el uso de ACTH, glucocorticoides y corticosteroides. Estos agentes se usan por sus efectos antiedema y antiinflamatorios. ACTH se administra habitualmente a un sujeto a 80 U proporcionado por vía intravenosa en 500 ml de dextrosa 5 % y agua durante 6-8 horas durante 3 días. También puede administrarse a 40 U/ml por vía intramuscular a una dosis de 40 U cada 12 horas durante 7 días, reduciendo la dosis después cada 3 días. Véase, S. Hauser, "Multiple sclerosis and other demyelinating diseases," en Harrison's Principies of Internal Medicine 2287-95 (13ª edición, Isselbacher y col., ed. 1994). La metilprednisolona se administra normalmente lentamente en 500 ml de D5W durante 6 horas, preferentemente por la mañana. Las dosificaciones habituales incluyen 1000 mg diarios durante 3 días, 500 mg diarios durante 3 días y 250 mg diarios durante 3 días. Misma referencia. También se administra habitualmente una combinación de metilprednisolona-prednisona. Normalmente se administran aproximadamente 1.000 mg de metilprednisolona intravenosa durante 3 días seguido de prednisona oral a 1 mg/kg por día durante 14 días. Por lo tanto, para su uso en combinación con los compuestos y composiciones desvelados en el presente documento, los esteroides pueden administrarse en cantidades que varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 mg/kg durante aproximadamente 1 a 14 días, según se requiera.

Un efecto secundario en las afecciones desmielinizantes tales como EM, es la fatiga y la reducción de la función cognitiva. Agentes tales como clorhidrato de amantadina y pemolina se han usado frecuentemente para tratar la fatiga asociada con EM (Geisler y col., 1996 Arch. Neurol. 53: 185-8).

El beneficio de tales terapias de combinación es que pueden reducir los efectos secundarios específicos de agente y específicos de clase que actualmente se encuentran con algunos de los fármacos. Los efectos secundarios específicos de clase del interferón beta incluyen fiebre, escalofríos, mialgias, artralgias y otros síntomas de tipo gripal, que comienzan de 2 a 6 horas después de la inyección y normalmente se resuelven 24 horas después de la inyección. Ocasionalmente el interferón beta también induce empeoramiento transitorio de síntomas de EM preexistentes. Los efectos secundarios específicos de agente incluyen reacciones en el sitio de inyección con interferón beta-1b. El tratamiento de estos efectos puede conseguirse adaptando la dosis y momento de administración, prescribiendo combinaciones apropiadas de acetaminofeno, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NE o AINE) y esteroides. Véase Munschauer y col., 1997 Clin. Ther. 19: 883-93.

De este modo, las combinaciones de fármacos que pueden reducir la cantidad de un fármaco particular administrado pueden reducir los efectos secundarios adversos experimentados por un paciente.

Cuando se administran en combinación, los compuestos pequeños antagonistas de integrina alfa-4 pueden administrarse en la misma formulación que estos otros compuestos o composiciones o en una formulación separada. Cuando se administran en combinación, los anticuerpos anti-alfa 4 generalmente se administran en una formulación separada de los otros compuestos y composiciones. Cuando se administran en combinaciones, los agentes anti-alfa 4 pueden administrarse antes de, después de o simultáneamente con los otros compuestos y composiciones usados para tratar, aliviar o paliar los síntomas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de ejemplos representativos de cómo realizar y usar las realizaciones de la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención, ni se pretende que representen

que los experimentos posteriores son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A no ser que se indique de otro modo, las partes son partes por peso, el peso molecular es peso molecular medio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana.

Ejemplo 1

Ensayo controlado de natalizumab en la esclerosis múltiple recidivante

Población de Pacientes

Veintiséis centros clínicos en Estados unidos, Canadá y en el Reino Unido admitieron a 213 pacientes desde septiembre de 1999 hasta mayo de 2000. La junta de revisión institucional o el comité de ética central y local aprobaron el protocolo. Todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado por escrito. Se proporcionó supervisión del estudio por un comité de control de datos de seguridad independiente.

Se requería que los sujetos aptos tuvieran de 18 a 65 años de edad, con EM inequívoca apoyada por laboratorio o clínica definida por criterios de Poser, progresiva secundaria o recidivante-remitente (Poser y col., 1983 Ann. Neurol. 13: 227-31; Lublin y col., 1996 Neurology 46: 907-11), un historial de al menos dos recaídas dentro de los dos años anteriores, una puntuación de estado de discapacidad expandida de Kurtzke de línea basal (EDSS) (Kurtzke, 1983 Neurology 33: 1444-52) entre 2 y 6,5 y un mínimo de tres lesiones en MRI de cerebro ponderado con T_2. Se excluyó a los pacientes que recibieron tratamientos inmunosupresores o inmunomoduladores en los tres meses anteriores o experimentaron una recaída o recibieron corticosteroides sistémicos en los 30 días anteriores.

Diseño del Estudio y Selección Aleatoria

Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a uno de tres grupos de tratamiento: natalizumab 3 mg/kg, natalizumab 6 mg/kg o placebo de acuerdo con un programa de selección aleatoria en bloque generado por ordenador. Los pacientes recibieron seis infusiones intravenosas a intervalos de 28 días y después tuvieron 6 meses de seguimiento de seguridad. Al investigador, a todo el resto del personal del estudio y a los pacientes se les impidió conocer la asignación de tratamiento.

Procedimientos de Estudio y Criterios de Valoración

Se obtuvieron exploraciones de cerebro de MRI ponderado con T_1 potenciado con Gd y ponderado con T_2 de densidad de protones no potenciado durante la fase de exploración (mes -1), inmediatamente antes de cada tratamiento (mes 0-5) y un mes después del último tratamiento (mes 6). Se obtuvieron exploraciones de MRI de seguimiento los meses 9 y 12. Se adquirieron 46 cortes axiales contiguos de 3 mm de grosor del cerebro. Se realizó un análisis de MRI por un solo centro ciego al tratamiento e historial del paciente. Se identificaron lesiones en imágenes de copia física por dos expertos clínicos experimentados trabajando por consenso.

La medida de resultado primaria prospectiva fue el número de nuevas lesiones potenciadas con Gd durante el periodo de tratamiento de 6 meses, definido como el periodo después de la primera infusión a un mes después de la última infusión. Otros parámetros de MRI evaluados incluyeron: el número de lesiones potenciadas con Gd persistentes (lesiones potenciadas que también se habían potenciado en la exploración mensual anterior); el volumen de lesiones potenciadas con Gd (medido por un procedimiento de establecimiento de umbral local semiautomático; Grimaud y col., 1996 Magn. Reson. Imaging 14: 495-505); el número de nuevas lesiones activas (es decir, nuevas lesiones potenciadas con Gd más nuevas o crecientes lesiones T2 no potenciadas); y el número de exploraciones activas (es decir, que contienen una o más nuevas lesiones potenciadas con Gd).

Los criterios de valoración clínicos incluyeron frecuencia de recaída y cambios en EDSS y una evaluación global autoinformada usando una escala de análogo visual (VAS). Se registraron todos los acontecimientos adversos. Se examinó a los pacientes a intervalos trimestrales programados y en visitas no programadas para recaídas sospechadas por los neurólogos responsables de la evaluación y el tratamiento que desconocían ambos la asignación de tratamiento del paciente. El neurólogo responsable del tratamiento realizó una examinación e historial médico y registró los acontecimientos adversos. El neurólogo responsable de la evaluación evaluó el estado neurológico y asignó una puntuación de EDSS sin conocimiento del historial del paciente o puntuaciones de EDSS anteriores.

Se definió una recaída objetiva como la aparición de un episodio agudo de nuevos o peores síntomas de EM que duraran al menos 48 horas después de un periodo estable de al menos 30 días. También se acompañó del aumento de al menos un punto en la puntuación de EDSS, un aumento de al menos un punto en dos puntuaciones de sistema funcional (FSS) o un aumento de al menos dos puntos en un FSS en comparación con línea basal, como se determinó por el neurólogo responsable de la evaluación. Los síntomas neurológicos que no cumplían con los

criterios anteriores para recaída, pero que se evaluaron por el neurólogo responsable del tratamiento, quien consideró que constituían una recaída, también se registraron (recaídas totales).

En una escala de análogo visual (VAS), los pacientes marcaron una localización a lo largo de una línea de 10 cm que reflejaba su evaluación de su bienestar global en la línea basal y después de 3 y 6 meses de tratamiento, reflejando mayores puntuaciones un mayor bienestar.

Los pacientes se siguieron clínicamente hasta el mes 12. Se animó a los pacientes que abandonaron el tratamiento, pero que no alcanzaron el criterio de valoración, a volver para evaluaciones de seguimiento.

Análisis Estadístico

Las estimaciones del tamaño de muestra se basaron en el número de nuevas lesiones potenciadas con Gd observadas durante las primeras 12 semanas después de la primera infusión en un ensayo clínico previo de natalizumab (Tubridy y col., 1999 Neurology 53: 466-72). Basándose en los resultados de este ensayo previo y usando una metodología de tamaño de muestras apropiada para una comparación de dos caras, dos grupos a un nivel de significación del 5 por ciento, basándose en la estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney (Noether, 1987 J. Amer. Stat. Assoc. 82: 645-7), se calculó que se necesitaban aproximadamente 73 pacientes en cada grupo para una potencia del 80 por ciento.

La comparación primaria del número de lesiones potenciadas con Gd entre natalizumab 6 mg/kg y placebo así como volúmenes potenciadas con Gd se evaluó con el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los valores ausentes debido a no haber realizado una o más exploraciones de MRI se imputaron reemplazando el valor ausente con el número medio de lesiones en exploraciones disponibles para ese paciente. Las exploraciones de MRI obtenidas de pacientes que recibieron corticosteroides sistémicos dentro de los 30 días anteriores se descartaron y se trataron como valores ausentes. Se usó la estadística de correlación de Cochran-Mantel-Haenszel, usando puntuaciones separadas equitativamente para las puntuaciones de grupos y rangos para la variable de resultado primaria, para ensayar una relación de respuesta a dosis usando datos de los tres grupos.

Se usó el ensayo de chi cuadrado de Pearson para comparar las proporciones de pacientes con recaídas. Se analizaron los cambios desde la línea basal en EDSS y VAS usando una ANOVA de dos vías con el centro de estudio y los grupos de tratamiento como variables independientes.

Todos los análisis incluyeron a todos los pacientes seleccionados de forma aleatoria y siguieron el principio de "intención de tratar". Todos los valores de P indicados son de dos colas. No hubo diferencias significativas en las características demográficas, historiales de enfermedad de EM, EDSS de entrada y parámetros de MRI entre los tres grupos en la línea basal (Tabla 1).

Tabla 1: características de línea basal y demográficas de pacientes seleccionados de forma aleatoria

			Natalizumab	
CARACTERÍSTICA		**PLACEBO (N=71)**	**3 MG/KG (N=68)**	**6 MG/KG (N=74)**
Edad, años	Media	42,9	42,8	44,9
	Intervalo	22-66	22-65	30-63
Género N (%)	Hombre	25 (35,2)	21 (30,9)	15 (20,3)
	Mujer	46 (64,8)	47 (69,1)	59 (79,7)
Categoría de EM N (%)	R-R	45 (63,4)	47 (69,1)	52 (70,3)
	S-P	26 (36,6)	21 (30,9)	22 (29,7)
EDSS	Media	4,40	4:21	4,32
	Intervalo	2,0-6,5	1,0-6,5	0,0-6,5
Duración de la enfermedad en años	Media	10,2	11,6	13,1
	Intervalo	1-32	0-40	2-39
Número de recaídas en los 2 años anteriores	Media	3	2,9	3,1
	Intervalo	2-12	2-10	2-8
Tiempo desde la última recaída en meses	Media	6,5	7,2	6
	Intervalo	2-17	2-24	2-22

		Natalizumab	
CARACTERÍSTICA	**PLACEBO (N=71)**	**3 MG/KG (N=68)**	**6 MG/KG (N=74)**
Exploración de MRI ponderado con T_1 (Mes 1) Número (%) de exploraciones con una o más lesiones potenciadas con Gd	28 (40)	29 (43)	29 (40)
Número de lesiones cerebrales potenciadas con Gd			
Media	1,6	1,5	1,7
Intervalo	0-42	0-18	0-23
MRI ponderado con T_1 de línea basal (Mes 0) Número (%) de exploraciones con una o más nuevas lesiones potenciadas con Gd. Número de nuevas lesiones cerebrales potenciadas con Gd.	22 (31)	29 (43)	32 (43)
Media	1,3	1,3	1,4
Intervalo	0-28	0-32	0-12

Resultado primario

Los pacientes en el grupo de placebo mostraron una media de 9,6 nuevas lesiones potenciadas con Gd durante el periodo de tratamiento de seis meses. Los valores correspondientes en los grupos que recibieron natalizumab fueron de 0,7 para el grupo de 3 mg/kg (P<0,0001) y 1,1 para el grupo de 6 mg/kg (P<0,0001) (véase la Tabla 2). Esta diferencia constituyó una reducción del 93 % y del 88 % en nuevas lesiones potenciadas con Gd en los grupos de 3 mg/kg y 6 mg/kg, respectivamente. Fue evidente una diferencia entre los grupos de tratamiento en comparación con el placebo después de la primera infusión (Figura 1).

Tabla 2: resumen de la actividad de MRI durante el tratamiento (meses 1-6) y seguimiento (meses 9 y 12)

	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	P VALOR*
Nuevas lesiones potenciadas M1-				
Media	9,6	0,7	1,1	(i) <0,0001
Mediana	2,0	0	0	(ii) <0,0001
DT	27,4	2,1	2,7	
Lesiones potenciadas persistentes M1-6				
Media	3,6	0,8	1,3	<0,0001
Mediana	1	0	0	
DT	6,5	1,9	2,6	
Nuevas lesiones activas M1-6				
Media	9,7	0,8	1,1	<0,0001
Mediana	2,0	0	0	
DT	27,4	2,2	3	
Exploraciones activas M1-6 (%)	39 %	9 %	11 %	(i) <0,0001 (ii) <0,0001
Volumen de lesión potenciada M1-6 (mm^3)	1169,0	156	279,0	(i) 0,005
Media	266	0	0	(ii) 0,01
Mediana	2666	359,0	632,0	
DT				
Nuevas lesiones potenciadas M9 y 12				
Media	2,5	2,6	2,1	(i) 0,90
Mediana	1,0	0,5	0	(ii) 0,59

DT	4,37	4,58	4,96	
Lesiones potenciadas persistentes M9 y 12				
Media	0,2	0,1	0,1	0,029
Mediana	0	0	0	
DT	0,64	0,32	0,3	
Nuevas lesiones activas M9 y 12				
Media	2,7	2,8	2,3	0,424
Mediana	1,0	0,5	1,0	
DT	4,49	5,69	5,11	
Exploraciones activas M9 y 12 (%)	42 %	40 %	35 %	
Volumen de lesión potenciada M9 y 12 (mm^3)				
Media	427,0	323	233	0,260
Mediana	88,0	31,0	0	
DT	797,0	591,0	686	
*(i) comparación de placebo frente a natalizumab 3 mg/kg ; (ii) comparación de placebo frente a natalizumab 6 mg/kg				

Resultados de MRI Secundarios

Hubo una reducción significativa y notable en el número acumulativo de lesiones potenciadas persistentes, nuevas lesiones activas, volumen total de lesiones potenciadas y porcentaje de exploraciones activas de los meses 1-6 (Tabla 2; Figura 2).

Resultados de eficacia clínica

Durante el periodo de tratamiento de seis meses, se registraron un total de 35 recaídas en 26 de los 71 pacientes con placebo; se registraron 18 recaídas en 13 de los 68 pacientes que recibieron natalizumab 3 mg/kg y se registraron 15 recaídas en 14 de los 74 pacientes que recibieron 6 mg/kg (P=0,05, placebo frente a todos los pacientes tratados con natalizumab). Aplicando los criterios de recaída objetivos más rigurosos, el efecto era igualmente fuerte: 18 recaídas en 15 pacientes de placebo; 3 recaídas en 3 pacientes que recibieron natalizumab 3 mg/kg; 8 recaídas en 8 pacientes que recibieron natalizumab 6 mg/kg (P=0,05). Más recidivas en el grupo de placebo requirieron tratamiento con esteroides que en los grupos tratados (22 en el grupo de placebo, 5 en el de natalizumab 3 mg/kg y 7 en el de natalizumab 6 mg/kg, P=0,007, placebo frente a todos los pacientes tratados con natalizumab).

En la VAS, los pacientes en el grupo de placebo no indicaron cambios, mientras que los de los grupos de natalizumab indicaron una mejoría en su bienestar en el mes 6, momento en el cual la diferencia entre los grupos era significativa (P=0,033, placebo frente a todos los pacientes tratados con natalizumab). No se observaron cambios significativos en EDSS en ningún grupo durante el tratamiento.

Concentración de Anticuerpos v Saturación del Receptor

Se recogieron muestras de suero de los pacientes en cada visita y se analizaron cuantitativamente con respecto a anticuerpos dirigidos específicamente contra natalizumab usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). También se midieron los niveles en suero de natalizumab y la ocupación del receptor por natalizumab en un subgrupo de 12 a 14 pacientes por grupo de tratamiento antes de cada infusión y a las 2 horas, 24 horas, 1, 2 y 3 semanas después de la primera y última infusiones.

Se determinaron las concentraciones de anticuerpo en suero usando un ensayo de ELISA. Brevemente, se preparó una solución de 2,0 µg/ml de un anticuerpo de captura que se une específicamente a natalizumab en una solución que contenía bicarbonato sódico a pH 8,3. Se añadieron 100 µl de la solución de anticuerpo a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos Costar. La placa se recubrió con una cinta sellante de placas y se incubó a temperatura ambiente durante 12-26 horas. La placa se aspiró, se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo (caseína 0,25 % en PBS, pH 7,4) a cada pocillo y se incubó durante una hora adicional a temperatura ambiente. Después las placas se desecaron y se almacenaron para su uso posterior o se lavaron una vez con 300 µl de tampón de ensayo (TBS, pH 7,5 que contenía Tween-20 0,05 %). Si las placas se desecaron, se rehidrataron justo antes de su uso

añadiendo 300 µl de tampón de lavado a cada pocillo e incubando durante 1-2 minutos. Las placas se aspiraron y se invirtieron sobre pañuelos de papel para absorber el exceso de humedad.

Las muestras de ensayo se diluyeron en diluyente de caseína antes del ELISA (caseína 0,25 % en PBS, con Tween 20 0,05 %, pH 7,4). Normalmente, se ensayaron de dos a tres diluciones de cada muestra para asegurar que los valores de natalizumab eran precisos. También se prepararon muestras de control de dilución usando cantidades conocidas de natalizumab para controlar la precisión de las etapas restantes.

Se añadieron 100 µl de patrón de referencia, muestra de ensayo o muestra de control de dilución a cada pocillo y la placa se incubó durante 60-75 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se retiró la humedad restante. Se añadieron 100 µl de conjugado de fosfatasa alcalina IgG4 anti humano de ratón recién diluido a cada pocillo y las placas se incubaron durante 60 minutos adicionales a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y se retiró la humedad restante. Se añadieron 100 de sustrato fluorescente A usando un pipeteador multicanal calibrado y las placas se incubaron 45-60 minutos a temperatura ambiente. Los niveles en cada pocillo se determinaron usando un Lector de Microplacas de Fluorescencia fmax usando el archivo de protocolo conc 102.ppr de SOFTmax Pro Versión 1.3.1.

Los resultados son como se muestran en las Figuras 3 y 4. Como se muestra en estas figuras, los niveles de natalizumab se redujeron entre las dosificaciones y en el mes 7 u 8 (es decir, de 2 a 3 meses después de la dosificación final) el anticuerpo no era detectable en la mayoría de los pacientes.

Además de medir la concentración de anticuerpo en suero, se determinaron los niveles de saturación del receptor y específicamente niveles de saturación de VLA-4, durante el estudio de dosificación usando análisis de FACS. La determinación de saturación de VLA-4 se determinó por un inmunoensayo indirecto usando citometría de flujo.

Se separó aproximadamente 1 ml de una muestra de sangre de un paciente en alícuotas en dos tubos de polipropileno de 15 ml y se añadió tampón de ensayo frío (suero humano [Scantibodies Laboratory, Inc. Part 3SH341] diluido al 3 % en PBS) hasta la marca de 14 ml en el tubo. Los tubos se centrifugaron a 2.200 rpm durante 5 minutos a 10-15 °C y el líquido se aspiró y se descartó. El sedimento celular se resuspendió en tampón de lavado frío hasta un total de 1 ml.

Se preparó un patrón de referencia madre de natalizumab 500 µg/ml en tampón de lavado. Se añadieron 20 µl de la referencia madre de natalizumab diluida al primer tubo y se añadieron 20 µl de tampón de lavado al segundo tubo. Ambos tubos se incubaron en hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, los tubos se llenaron con tampón de lavado hasta la marca de 14 ml y se centrifugaron a 2.200 rpm durante 5 minutos en frío. El sobrenadante se aspiró y la etapa de lavado se repitió una segunda vez. Después del segundo lavado, las células se resuspendieron en tampón de lavado hasta la marca de 1 ml.

Se añadieron 10 µl de anticuerpo anti CDw49d humano conjugado con R-Ficoeritrina (PE) (Pharmingen, Cat. n° 31475X) a cada tubo y los tubos se agitaron por vórtex suavemente. Los tubos se incubaron a 2-8 °C durante 10-15 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, se añadieron 2 ml de solución de lisado 1X, pH 7,4, y cada tubo se agitó en vórtex suavemente. Los tubos se incubaron en hielo durante 10-15 minutos a 2-8 °C, se centrifugaron 5 minutos en frío y el sobrenadante se aspiró del sedimento celular. El sedimento celular se resuspendió en 4 ml de tampón de tinción frío y los tubos se centrifugaron de nuevo a 2.200 rpm en frío. El sobrenadante se retiró después muy cuidadosamente, se añadieron 0,5 ml de una solución fijadora (fijador de Ortho pH 7,6) y los tubos se agitaron por vórtex inmediatamente para asegurar que las células se resuspendieran en el fijador. Los tubos se cubrieron con papel de aluminio hasta el ensayo de FACS.

Cada muestra fue analizada después para saturación del receptor VLA-4 en las muestras con y sin natalizumab usando el citómetro de flujo FACS Calibur y software CellQuestTM. El software CellQuestTM permite la adquisición y análisis de datos del citómetro de flujo.

Los niveles de saturación del receptor se muestran en la Figura 5. Los niveles de saturación del receptor para los meses 1-4 se determinaron antes de la dosificación de ese mes. Los niveles de saturación del receptor producida por intervalos de dosificación de un mes fueron consistentemente bastante altos y estos niveles crónicos fueron suficientes para mantener una supresión de la inflamación patológica y evidencias fisiológicas asociadas de la enfermedad. En promedio, los niveles de saturación se mantuvieron durante un mes a una media de al menos 67 % y una mediana de al menos 75 %. Estos niveles fueron suficientes para la supresión de lesiones cerebrales en los pacientes tratados (véase la Figura 1). El nivel mínimo de saturación determinado en el estudio preinfusión desde el mes 2 hasta el mes 5 (y la semana 21 después de la administración en el mes 5) es particularmente bajo en comparación con los valores medio y mediano debido a un solo paciente con una respuesta de anticuerpo a natalizumab.

A medida que los niveles de saturación del receptor disminuyeron en los pacientes, también lo hizo la eficacia del tratamiento. Los niveles de saturación del receptor medios de 42 % y niveles de saturación del receptor medianos de 41 % de saturación del receptor en la población tratada no se asociaron con la supresión de las lesiones cerebrales en la población de pacientes (véase las Figuras 2 y 5) y por lo tanto es necesario un nivel de saturación del receptor crónico por encima de este para la supresión eficaz de la inflamación patológica usando agentes tales como inhibidores de alfa-4.

Seguridad y Tolerancia

El tratamiento repetido con natalizumab, a dosis de 3 o 6 mg/kg, pareció ser bien tolerado por pacientes con EM durante un periodo de tratamiento de seis meses. Un número similar de pacientes de cada grupo experimentó acontecimientos adversos emergentes del tratamiento. Aunque no eran significativos, ciertos acontecimientos adversos se producían de forma más habitual con natalizumab en comparación con el placebo (Tabla 3). Se vio una linfocitosis suave prolongada en los grupos de natalizumab durante el periodo de tratamiento de seis meses.

Tabla 3: acontecimientos adversos informados más habitualmente en pacientes tratados con natalizumab frente a placebo*

	PLACEBO (71)	**3 MG/KG (68)**	**6 MG/KG (74)**
Número total de pacientes con acontecimientos adversos	68 (96 %)	62 (91 %)	70 (95 %)
Cuerpo completo Infección	10 (14 %)	14 (21 %)	14 (19 %)
Sistema digestivo Flatulencia	0	4 (6 %)	0 (0 %)
Sistema nervioso Parestesia circumoral	1 (1,0 %)	5 (7 %)	2 (3 %)
Sistema respiratorio Sinusitis Faringitis	3 (4 %) 8 (11 %)	7 (10 %) 10 (15 %)	3 (4 %) 15 (20 %)
Piel y apéndices Erupción	4 (6 %)	6 (9 %)	8 (11 %)
Sistema urogenital Infección	10 (14 %)	14 (21 %)	11 (15 %)
*A incluir en la Tabla, se requirió una diferencia de al menos 5 por ciento en la incidencia de acontecimientos adversos entre el grupo de placebo y uno de los grupos de natalizumab.			

No hubo diferencias significativas en el número de acontecimientos adversos graves (SAE) indicados en los grupos de placebo y tratamiento (es decir, 7 pacientes tratados con placebo indicaron 11 SAE, 5 pacientes que recibieron natalizumab 3 mg/kg indicaron 5 SAE y 3 pacientes que recibieron natalizumab 6 mg/kg indicaron 4 SAE). De estos, se consideró que cuatro eran mediados de forma inmunitaria y relacionados con el fármaco del estudio. Hubo una reacción anafiláctica con urticaria y broncoespasmos en el grupo de 3 mg/kg, que se revirtió rápidamente con tratamiento de esteroides y antihistaminas. Hubo tres informes de náuseas por suero, una en cada grupo incluyendo placebo. Solamente un acontecimiento se acompañó de un cambio en los niveles de complemento y todos se produjeron en el mismo sitio de investigación. En general, estos acontecimientos complicaron menos de una de cada 250 infusiones.

No hubo diferencias en el número de pacientes que abandonaron el tratamiento debido a un acontecimiento adverso entre los grupos (es decir, 3 en el grupo de placebo, 4 en el grupo de 3 mg/kg y 3 en el grupo de 6 mg/kg). Hubo una muerte en el estudio secundaria a carcinomatosis pleural complicada por hemotórax en un paciente con placebo.

La tasa de formación de anticuerpos también se evaluó. En general, 15 pacientes tratados con natalizumab (11 por ciento) desarrollaron anticuerpos anti-natalizumab: 13 durante el periodo de tratamiento y 2 durante el periodo de seguimiento post-tratamiento. La relevancia clínica, si la hubiera, de la presencia de anticuerpos anti-natalizumab no se conoce actualmente.

Las concentraciones en suero máximas de natalizumab fueron dependientes de la dosis y no hubo acumulación significativa observada con dosificación repetida. Los pacientes que recibieron natalizumab a 3 mg/kg mostraron más del 80 % de saturación del receptor VLA-4 durante el periodo de tratamiento; la ocupación del receptor fue mayor (aproximadamente el 90 %) y más prolongada en pacientes que recibieron natalizumab 6 mg/kg.

Seguimiento Post-tratamiento: Meses 6-12.

El número acumulativo de nuevas lesiones de potenciación y exploraciones activas (meses 9 y 12 combinados) fueron similares en los tres grupos (Tabla 2). Hubo una tendencia a menor actividad en el grupo de 6 mg/kg el mes 9. No hubo una diferencia significativa en el número total de recaídas clínicas indicadas entre los tres grupos: 24 en el grupo de placebo, 24 en el grupo de 3 mg/kg y 26 en el grupo de 6 mg/kg o en el número de recaídas según se determinó por los criterios objetivos predefinidos.

Este estudio es el primero que proporciona sólidas pruebas clínicas y MRI en seres humanos de que la inhibición selectiva de tráfico y adhesión de leucocitos mediada por integrina alfa-4 es un enfoque eficaz para el tratamiento crónico de la EM. Ambos niveles de dosis del anticuerpo monoclonal humanizado específico de integrina alfa-4 natalizumab demostraron efectos altamente significativos estadísticamente en comparación con el placebo en la supresión de nuevas lesiones cerebrales inflamatorias potenciadas con Gd en pacientes con EM durante el periodo de tratamiento de seis meses. Se observó una reducción de estas lesiones en pacientes tratados con natalizumab un mes después de la primera infusión y se prolongó a lo largo del periodo de tratamiento. Para ambos niveles de dosis, la reducción fue de aproximadamente el 90 %, un efecto mayor que la reducción del 50 al 70 % indicada con interferones beta (Grupo de Análisis MS/MRI, 1995 Neurology 4: 1277-1285; Jacobs y col., 1996 Ann. Neurol. 39: 285-294; y Grupo de Estudio PRISEM (Prevención de Recaídas y Discapacidad por Interferón beta-1a por vía Subcutánea en Esclerosis Múltiple), 1998 Lancet 352: 1498-1504).

Además, los efectos de natalizumab en los resultados de MRI en este ensayo están apoyados por observaciones clínicas. Este estudio no estaba preparado prospectivamente para mostrar efectos en los resultados clínicos. No obstante, el tratamiento con natalizumab dio como resultado una reducción significativa de la tasa de recaída y una percepción de bienestar aumentado entre los pacientes. Cuando se consideran todas las recaídas clínicas indicadas, ambos grupos de natalizumab experimentaron significativamente menos recaídas que el grupo de placebo durante los seis meses del tratamiento. También se observó una reducción significativa de estos episodios usando criterios de recaída predefinidos; una medida más rigurosa, debido a que requiere un cambio en las señales objetivas. El efecto de natalizumab en recaídas excede el de los tratamientos actualmente aprobados para EM, que presentan un efecto de aproximadamente el 30 % (Grupo de Análisis MS/MRI, mencionado anteriormente; Jacobs y col., mencionado anteriormente; Grupo de Estudio PRISMS, mencionado anteriormente; Johnson y col., 1995 Neurology 45:1268-76).

Es importante destacar que no se observaron efectos de rebote en nuevas lesiones de MRI o recaídas en los grupos de natalizumab después de la finalización del tratamiento. Además, se toleraron bien las infusiones mensuales de natalizumab durante seis meses y se asociaron con un perfil de seguridad similar al placebo y aceptable para el tratamiento crónico de EM.

Los resultados del presente estudio proporcionan apoyo adicional para el papel de la integrina alfa-4 y las células inmunitarias que la expresan, en la patogénesis de lesiones cerebrales inflamatorias agudas en pacientes con EM. La reducción de nuevas lesiones potenciadas con Gd fue evidente después de un mes de tratamiento. Esta observación sugiere que natalizumab actúa pronto en el desarrollo de la lesión previniendo la aparición de nuevas lesiones.

En resumen, natalizumab ha demostrado fuertes efectos en parámetros clínicamente significativos en el presente ensayo controlado por placebo en pacientes con EM recidivante. La terapia se toleró bien durante este ensayo de seis meses. Los efectos beneficiosos de natalizumab en la aparición de nuevas lesiones del SNC inflamatorias, la aparición de recaídas clínicas y mejora en el bienestar de los pacientes observados en este estudio indican el potencial para observar efectos en discapacidad en estudios a más largo plazo actualmente en progreso.

Ejemplo 2

Ensayo controlado de natalizumab en la enfermedad de Crohn

Métodos

En un ensayo de placebo controlado y doble enmascaramiento, se seleccionaron aleatoriamente 248 pacientes con enfermedad de Crohn (CD) de moderada a intensamente activa para recibir dos infusiones de placebo o una infusión de natalizumab de 3 mg/kg seguida de placebo; o dos infusiones de natalizumab de 3 mg/kg o 6 mg/kg, en un intervalo de 4 semanas. Las medidas de los resultados incluyeron el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI), la calidad de vida relacionada con la salud (QOL) y los niveles de proteína C reactiva en suero.

El natalizumab incrementó las tasas de remisión clínica y respuesta clínica, y mejoró la QOL en pacientes con CD activa, a la vez que mostró un perfil de seguridad aceptable para el tratamiento de esta enfermedad.

Población de Pacientes

Después de recibir la aprobación del Comité de ética local, cada centro evaluó a pacientes, hombres y mujeres, de al menos 18 años de edad que presentaban una evidencia clínica de CD de moderada a intensamente activa como un CDAI de al menos 220 pero inferior o igual a 450. De los 311 pacientes evaluados, 248 se asignaron aleatoriamente a 35 centros de estudio en Bélgica, la República Checa, Dinamarca, Alemania, Israel, los Países Bajos, Suecia y el Reino Unido desde septiembre de 1999 hasta agosto del 2000. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. Los pacientes que recibieron metotrexato, ciclosporina o cualesquiera agentes de investigación en un periodo de 3 meses fueron excluidos; se exigió a los pacientes que recibieron azatioprina o 6-mercaptopurina que hubieran estado tomando una dosis estable durante al menos 4 meses. Otras exclusiones incluyeron un tratamiento previo con anticuerpos; el uso actual de prednisolona oral con una dosis superior a 25 mg/día; el uso actual de una dieta elemental o nutrición parenteral; enfermedades intestinales infecciosas o neoplásicas; cirugía intestinal en un periodo de 3 meses; presencia de una colostomía, ileostomía o una colorrectostomía con anastomosis ileorrectal; síntomas debidos principalmente a la presencia de estructuras fibróticas; y la impresión clínica de que es probable que el paciente requiera cirugía abdominal de emergencia a corto plazo.

Diseño del Estudio y Selección Aleatoria

Los pacientes elegibles se asignaron aleatoriamente a uno de entre cuatro regímenes de tratamiento de acuerdo con un programa de aleatorización en bloque generado por ordenador. Cada grupo recibió dos infusiones intravenosas separadas por un intervalo de 4 semanas. Los cuatro regímenes de tratamiento fueron dos infusiones de placebo; una infusión de natalizumab de 3 mg/kg seguida de una infusión de placebo; y dos infusiones de natalizumab de 3 o 6 mg/kg. Al investigador, a todo el resto del personal de estudio y a los pacientes se les impidió conocer la asignación del tratamiento.

Procedimientos de Estudio y Criterios de Valoración

El criterio de valoración primario para la eficacia fue la proporción de pacientes en remisión (CDAI < 150) en la semana 6. El CDAI incorpora ocho variables relacionadas: el número de heces líquidas o muy blandas por día, la gravedad del dolor abdominal o los calambres, el bienestar general, la presencia de manifestaciones extraintestinales de la enfermedad, la presencia de una masa abdominal, el uso de fármacos contra la diarrea, el hematocrito y el peso corporal (Best et al., 1976 Gastroenterology 70: 439-441; y Summers et al., 1979 Gastroenterology 77: 847-69). Las puntuaciones por debajo de 150 indicaron remisión; las puntuaciones entre 150 y 219 indicaron una enfermedad ligeramente activa, entre 220 y 450 indicaron una enfermedad moderadamente activa y las puntuaciones por encima de 450 indicaron una actividad intensa. Los criterios de valoración prospectivos adicionales fueron la proporción de pacientes que mostraron una respuesta clínica (es decir, una reducción de al menos 70 puntos en el CDAI), calidad de vida relacionada con la salud, que se midió con un cuestionario específico para la enfermedad inflamatoria del intestino, el IBDQ (Irvine et al., 1994 Gastroenterology 106: 287-96), y los niveles en suero de proteína C reactiva.

A lo largo del estudio se realizaron evaluaciones de la seguridad, que incluyeron el registro de acontecimientos adversos y la monitorización de los laboratorios clínicos. Un Comité de monitorización de datos de seguridad independiente proporcionó un nivel adicional de monitorización. En cada visita se tomaron muestras de suero y se analizaron para detectar anticuerpos contra natalizumab con un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Análisis Estadístico

Todos los análisis de la eficacia utilizaron la población con intención de ser tratada (ITT) de la última observación

realizada (LOCF), que comprendía todos los pacientes seleccionados de forma aleatoria (n=248). Los pacientes que utilizaron medicamentos de acción rápida se clasificaron como fracasos del tratamiento. La población de seguridad (n=244) comprendió los sujetos seleccionados de forma aleatoria y que recibieron la dosificación. Cuatro pacientes no recibieron la dosificación por no ser elegibles.

Todos los ensayos estadísticos fueron de dos caras y con un nivel de significancia estadística de un 5 por ciento. Se realizaron tres ensayos apareados para cada tratamiento activo en comparación con el placebo. Se analizaron las tasas de remisión y respuesta con el ensayo de chi cuadrado de Cochran Mantel-Haenszel (asociación general) (Landis et al., 1978 Int'l. Stat. Rev. 46: 237-54) utilizando la población como estrato. Se analizó el efecto de las covariables sobre la remisión y la respuesta (sí o no) en la semana 6 utilizando regresión logística.

El tamaño de muestra de 60 sujetos por grupo se calculó para proporcionar una potencia de un 80 por ciento a un nivel de significancia de un 5 por ciento con el fin de detectar una diferencia en las tasas de respuesta asumiendo una tasa de respuesta de un 40 por ciento en los grupos de natalizumab y una tasa de respuesta de un 15 por ciento en el grupo de placebo.

Se utilizaron análisis de dos vías de modelos de varianza con efectos fijos por población y grupo de tratamiento para comparar las reducciones medias de CDAI respecto a la línea basal. Se evaluaron los contrastes comparando cada uno de los grupos de tratamiento activo con el grupo de placebo.

Los datos de proteína C reactiva e IBDQ se analizaron utilizando el ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar el cambio respecto a la línea basal entre cada uno de los tres grupos de tratamiento activo y el placebo. En un análisis planeado prospectivamente, se compararon los niveles de proteína C reactiva para los pacientes con un valor por encima del límite superior del intervalo normal de 8 mg/l en la línea basal (semana 0).

Resultados

Las características demográficas, las puntuaciones de CDAI, el lugar de la enfermedad y las medicaciones fueron comparables entre los grupos en la línea basal (Tabla 4). En el momento de la evaluación en la semana 0, la mayoría de los pacientes estaban recibiendo otras medicaciones para la CD, incluidos los compuestos 5-ASA (48-64 por ciento), esteroides orales (46-63 por ciento) o azatioprina/6-mercaptopurina (18-37 por ciento) con o sin otros agentes. Veintisiete pacientes se retiraron del estudio antes de completar las 12 semanas: 10 en el grupo de placebo, y 6, 5 y 6 en los grupos de 3+0, 3+3 y 6+6 mg/kg de natalizumab, respectivamente.

Tabla 4: características demográficas y medicaciones en la línea basal

CARACTERÍSTICA	PLACEBO	3+0 MG/KG	3+3 MG/KG	6+6 mc/KG
Pacientes seleccionados de forma aleatoria	63	68	66	51
Edad media e intervalo (años)	34 (18-68)	36 (18-66)	36 (19-64)	35 (19-62)
Duración media de la enfermedad e intervalo (años)	8,9 (0,3-64,3)	8,4 (0,5-27,5)	8,1 (0,5-22)	7,8 (0,6-29)
CDAI medio en la línea basal e intervalo*	300 (186-447)	288 (211-427)	298 (219-442)	296 (210-429)
Lugar de la enfermedad:				
Íleo	15 (24%)	9 (13%)	17 (26%)	12 (24%)
Colónico	11 (17%)	16 (24%)	16 (24%)	16 (31%)
Ileocolónico	37 (59%)	43 (63%)	33 (50%)	23 (45%)
Género: mujer	33 (52%)	41 (60%)	36 (55%)	26 (51%)
Peso medio e intervalo (kg)	68 (42-100)	66 (41-95)	64 (44-97)	69 (44-98)
Medicaciones concomitantes				
Sin medicaciones concomitantes+ para la enfermedad de Crohn	12 (19%)	11 (16%)	9 (14%)	5 (10%)
Compuestos 5 ASA	30 (48%)	40 (59%)	42 (64%)	30 (59%)
Esteroides orales	31 (49%)	31 (46%)	37 (56%)	32 (63%)
Azatioprina o 6-MP (± esteroides)	2 (35%)	25 (37%)	17 (26%)	9 (18%)
*Ocho de los 248 pacientes presentaron una puntuación de CDAI < 220 en la línea basal. Cinco de estos 8 pacientes				

CARACTERÍSTICA	PLACEBO	3+0 MG/KG	3+3 MG/KG	6+6 mc/KG
fueron elegibles (CDAI ≥ 220) basándose en su hematocrito evaluado, que correspondió al valor disponible en el momento de la selección aleatoria, pero presentaron puntuaciones < 220 cuando se recalcularon posteriormente utilizando el hematocrito de la línea basal. Las puntuaciones de CDAI para los otros 3 pacientes se calcularon incorrectamente en el momento de la selección aleatoria. +5 ASA, esteroides o inmunosupresores.				

Respuestas Clínicas, Remisiones y Puntuaciones Medias de CDAI

La proporción de pacientes que consiguieron una respuesta clínica (es decir, al menos una reducción de 70 puntos en el CDAI respecto a la línea basal) fue significativamente mayor desde el punto de vista estadístico que para el placebo en los tres grupos de natalizumab en las semanas 4, 6 y 8 (Tabla 5 y Figura 6) y este efecto persistió a lo largo de la semana 12 en los dos grupos que recibieron 2 infusiones de natalizumab. Se observaron tendencias para la mejora de las tasas de respuesta clínica incluso a las 2 semanas después del primer tratamiento, y el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto al placebo en este punto de evaluación. Los resultados para la reducción respecto a la línea basal en la puntuación media de CDAI (Tabla 6) concuerdan con estas observaciones de la tasa de respuesta.

Tabla 5: tasas de remisión y respuesta clínica en la población ITT

PUNTO DE EVALUACIÓN	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=51)
REMISIÓN (CDAI < 150)				
N.º DE PACIENTES (%)				
Semana 2	6(10)	10(15)	13(20)	6(12)
Valor P		0,328	0,127	0,745
Semana 4	9(14)	**21(31)**	**19(29)**	**15(29)**
Valor P		**0,02**	**0,027**	**0,028**
Semana 6 (criterio de valoración prim.)	17(27)	20(29)	**29(44)**	16(31)
Valor P		0,757	**0,030**	0,533
Semana 8	10(16)	19(28)	**27(41)**	**22(43)**
Valor P		0,107	**<0,001**	**<0,001**
Semana 12	17(27)	19(28)	**28(42)**	21(41)
Valor P		0,992	**0,042**	0,091
RESPUESTA (REDUCCIÓN DE PUNTOS ≥70)				
N.º DE PACIENTES (%)				
Semana 2	19(30)	31 (46)	**36(55)**	22(43)
Valor P		0,081	**0,004**	0,136
Semana 4	18(29)	**32(47)**	**41 (62)**	**27(53)**
Valor P		**0,029**	**<0,001**	**0,006**
Semana 6	24(38)	**40(59)**	**47(71)**	**29(57)**
Valor P		**0,022**	**<0,001**	**0,039**
Semana 8	22 (35)	**38 (56)**	**44 (67)**	**28 (55)**

PUNTO DE EVALUACIÓN	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=51)
Valor P		**0,018**	**<0,001**	**0,028**
Semana 12	27(43)	34(50)	**40(61)**	**33(65)**
Valor P		0,503	**0,033**	**0,018**

La negrita resalta los resultados estadísticamente significativos en comparación con el placebo.

Tabla 6: reducción de la puntuación media de CDAI respecto a la línea basal

PUNTO DE EVALUACIÓN	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=51)
REDUCCIÓN MEDIA DE LA PUNTUACIÓN CDAI RESPECTO A LA LÍNEA BASAL (DT)				
Semana 2	39,3 (73,5)	63,5 (74,8)	**80,0 (68,9)**	60,5 (68,3)
Valor P frente al placebo		0,061	**0,001**	0,103
Semana 4	37,3 (88,8)	**79,9 (89,5)**	100,7 **(76,4)**	**84,2 (90,5)**
Valor P frente al placebo		**0,004**	<0,001	**0,003**
Semana 6	49,3 (97,8)	**81,5 (86,1)**	**119,4** (79,1)	**97,2 (94)**
Valor P frente al placebo		**0,042**	**<0,001**	**0,004**
Semana 8	49,7 (99,5)	82,4 (87,2)	**117,8 (90,7)**	**106,9 (102,9)**
Valor P frente al placebo		0,053	**<0,001**	**0,001**
Semana 12	63,1 (103,9)	70,1 (91,7)	**119,2 (111)**	**112,5 (96,4)**
Valor P frente al placebo		0,729	**0,001**	**0,008**
La reducción respecto a la línea basal se define como (semana 0 – semana n) DT = desviación estándar La negrita resalta los resultados estadísticamente significativos en comparación con el placebo.				

Cuatro semanas después del primer tratamiento y antes de que los pacientes recibieran el segundo tratamiento, los tres grupos de natalizumab presentaron una tasa de remisión significativamente más elevada desde el punto de vista estadístico en comparación con los pacientes del grupo de placebo (Tabla 5 y Figura 7). Sin embargo, en la semana 6, el criterio de valoración primario definido prospectivamente, la proporción de pacientes en remisión clínica fue significativamente más elevada desde el punto de vista estadístico únicamente en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab en comparación con el placebo. En la semana 8, los dos grupos que recibieron dos infusiones de natalizumab (ya sea 3 o 6 mg/kg) mostraron unas tasas de remisión significativamente más elevadas desde el punto de vista estadístico en comparación con el placebo. En la semana 12, el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab siguió mostrando un beneficio estadísticamente significativo en comparación con el placebo en cuanto a la remisión clínica, mientras que el grupo de 6+6 mg/kg mostró una fuerte tendencia para el beneficio en comparación con el placebo para este resultado.

Elementos de Predicción de la Remisión o la Respuesta

Utilizando los resultados de la semana 6, se llevó a cabo un análisis para identificar las variables de la línea basal que podrían predecir la remisión o la respuesta clínica. Las variables examinadas incluyeron el lugar de la enfermedad, la duración de la enfermedad, las puntuaciones de CDAI en la línea basal, el uso concomitante de esteroides orales, el uso concomitante de azatioprina o 6-mercaptopurina y los síntomas extraintestinales. La puntuación de CDAI en la línea basal fue un elemento de predicción significativo de la remisión (P<0,001); los pacientes con un CDAI más elevado en la línea basal presentaban una probabilidad menor de conseguir la remisión.

Sin embargo, el CDAI en la línea basal no predijo la probabilidad de respuesta. Todas las demás variables analizadas no fueron elementos de predicción significativos de la remisión o de la respuesta.

Calidad de Vida

Se observó una mejora estadísticamente significativa en las puntuaciones medias de IBDQ en todos los grupos de tratamiento de natalizumab en la semana 6 en comparación con el placebo. En la semana 12, únicamente los grupos de tratamiento que recibieron dos infusiones de natalizumab siguieron presentando puntuaciones de IBDQ significativamente más elevadas que el grupo de placebo (Tabla 7).

Tabla 7: puntuaciones medias de IBDQ

PUNTO DE EVALUACIÓN	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG DE NATALIZUMAB (N=51)
PUNTUACIÓN DE IBDQ, MEDIA (INTERVALO)				
Semana 0	130 (66-192)	130 (52-188)	136 (79-194)	123 (55-194)
Semana 6	142 (61-219)	**157 (81-221)**	**163 (99-211)**	**155 (67-224)**
Valor P		**0,008**	**<0,001**	**<0,001**
Semana 12	145 (61-217)	151 (81-221)	**163 (86-221)**	**153 (64-215)**
Valor P		0,486	**0,021**	**0,014**

La negrita resalta las mejoras en la puntuación de IBDQ en comparación con la línea basal de cada tratamiento.

Proteína C reactiva

Los pacientes que presentaron niveles elevados de proteína C reactiva en suero en la línea basal recibieron evaluaciones periódicas de dichos niveles durante el ensayo. Aquellos que recibieron dos infusiones de natalizumab exhibieron una reducción significativa respecto a la línea basal de los niveles medios en suero de proteína C reactiva en comparación con los pacientes del grupo de placebo (Figura 8). La mejora se mantuvo a lo largo de la semana 12 en los pacientes que recibieron dos infusiones de 3 mg/kg de natalizumab.

Seguridad y Tolerabilidad

El tratamiento con natalizumab en todos los niveles de dosis fue bien tolerado a lo largo del periodo de estudio de 12 semanas. Números similares de pacientes de cada grupo abandonaron el estudio debido a acontecimientos adversos (es decir, 2 en el grupo de placebo, 1 en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, 2 en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab y 3 en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab). En conjunto, 31 pacientes describieron un acontecimiento adverso grave durante la fase principal del estudio (es decir, 9 en el grupo de placebo, 8 en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, 8 en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab y 6 en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab). No se consideró que los efectos adversos graves estuvieran relacionados con el fármaco del estudio y ninguno de ellos fue letal; la mayoría fueron ingresos hospitalarios debidos a complicaciones o síntomas asociados con la CD. Los números de pacientes que experimentaron acontecimientos adversos emergentes a causa del tratamiento fueron similares en los diferentes grupos de tratamiento: 52 (83 por ciento) en el grupo de placebo, 51 (78 por ciento) en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, 57 (88 por ciento) en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab y 41 (80 por ciento) en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab. La Tabla 8 muestra los acontecimientos adversos no relacionados con la CD con una incidencia de al menos un 5 por ciento superior en un grupo de natalizumab en comparación con el grupo de placebo. Ninguno de estos diferentes tipos de acontecimientos adversos fue significativamente diferente desde el punto de vista estadístico respecto al placebo, y no se considera que ninguno de ellos presente un perfil de seguridad inaceptable para el uso de natalizumab en pacientes con CD de moderada a grave.

Tabla 8: acontecimientos adversos no relacionados con la enfermedad de Crohn con una incidencia > 5% respecto al placebo y otros acontecimientos de interés

TÉRMINO PREFERIDO	PLACEBO N=63(%)	3+0 N=65	3+3 N=65	6+6 N=51
Dolor en el pecho	0 (0)	2 (3)	2 (3)	4 (8)
Conjuntivitis	0 (0)	2 (3)	5 (8)	0 (0)

TÉRMINO PREFERIDO	PLACEBO N=63(%)	3+0 N=65	3+3 N=65	6+6 N=51
Mareos	0 (0)	6 (9)	3 (5)	0 (0)
Fiebre	1 (2)	4 (6)	3 (5)	4 (8)
Síndrome gripal	6 (10)	9 (14)	7 (11)	10 (20)
Cefalea	20 (32)	9 (29)	27 (42)	14 (27)
Dolor	4 (6)	4 (6)	4 (6)	11 (22)
Sinusitis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
OTROS ACONTECIMIENTOS: reacción a la infusión*	0 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (2)
Pts con anticuerpos anti-natalizumab	0 (0)	8 (13)	4 (6)	1 (2)
*Conlleva la interrupción o el cese de la infusión.				

Se detectaron anticuerpos anti-natalizumab en 13 pacientes tratados con natalizumab (7 por ciento) en la semana 12. En conjunto, los pacientes con anticuerpos anti-natalizumab detectables no presentaron una probabilidad más elevada de experimentar un acontecimiento adverso o adverso grave incluso que aquellos que no presentaron anticuerpos anti-natalizumab detectables.

Dos pacientes experimentaron reacciones a la infusión; en ambos casos, el acontecimiento tuvo lugar durante la segunda infusión. Un paciente en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab experimentó síntomas de eritema y picores leves, y se determinó posteriormente que había dado positivo para los anticuerpos anti-natalizumab. Un paciente en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab experimentó síntomas de tos y picores leves. Estos síntomas se resolvieron sin tratamiento y se determinó posteriormente que el paciente había dado negativo para los anticuerpos anti-natalizumab detectables.

Aunque el criterio de valoración primario de la eficacia definido prospectivamente (remisión clínica definida como CDAI < 150 en la semana 6) fue significativamente superior desde el punto de vista estadístico respecto al placebo únicamente para el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab, se observó un beneficio significativo respecto al placebo para este resultado en 4 puntos de evaluación diferentes para el grupo de 3+3 mg/kg (semanas 4, 6, 8 y 12) y dos puntos de evaluación para el grupo de 6+6 mg/kg (semanas 4 y 8, con una tendencia al beneficio en la semana 12). Estos datos, combinados con las observaciones de que las proporciones de pacientes que experimentaron una respuesta clínica (definida como al menos una reducción de 70 puntos en el CDAI respecto a la línea basal) fueron significativamente superiores respecto al placebo para los tres grupos de natalizumab en los puntos de evaluación de la semana 4, 6 y 8, y en el punto de evaluación de la semana 12 para los dos grupos de tratamiento que recibieron dos infusiones de natalizumab, proporcionan una evidencia sólida para la eficacia de natalizumab en el tratamiento de la CD de moderada a intensamente activa. Además, los efectos beneficiosos del natalizumab en cuanto a la respuesta clínica y las tasas de remisión que se basan en las mejoras del CDAI se ven corroborados por mejoras significativas en la QOL relacionada con la salud, que se mide según el IBDQ, y la mejora en la proteína C reactiva en suero, un reactivo de fase aguda utilizado para cuantificar la inflamación generalizada.

Los niveles de dosificación de la saturación del receptor en el ensayo de CD son comparables con las dosificaciones del ensayo de EM y, por lo tanto, los niveles de saturación del receptor deberían ser comparables en el ensayo de CD. Los niveles de saturación del receptor en el ensayo de CD se asocian, por lo tanto, con una reducción de los niveles de inflamación, según demuestran los niveles de proteína C reactiva, y una mejora del bienestar general del paciente, según demuestra el CDAI.

No se identificaron problemas serios en cuanto a la seguridad para ninguno de los grupos de tratamiento de natalizumab. El porcentaje de pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-natalizumab detectables fue bajo y no se observaron acontecimientos adversos graves asociados con los anticuerpos anti-natalizumab detectables.

El presente estudio proporciona evidencias concluyentes sobre la eficacia y la tolerabilidad del antagonismo de la integrina alfa-4 por parte del natalizumab en el tratamiento de signos y síntomas clínicos de CD de moderada a grave. Además, la evidencia proporcionada por estos datos de que el antagonismo de la integrina alfa-4 es un mecanismo eficaz para tratar la CD hace surgir la posibilidad de que esta modalidad se pueda aplicar más ampliamente en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias crónicas.

Ejemplo 3

Efecto del natalizumab sobre los leucocitos activados circulantes en la enfermedad inflamatoria del intestino activa

El tráfico de subconjuntos de leucocitos participa en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Debido a que las integrinas alfa-4 son mediadores clave de la migración de los leucocitos a través del endotelio vascular, ya que se expresan en todos los leucocitos excepto en los neutrófilos, los efectos de una única infusión de 3 mg/kg de natalizumab (Antegren®) sobre subconjuntos de leucocitos circulantes básicos, células nulas (NK) y linfocitos T activados en pacientes con una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) activa. También se ha mostrado previamente que una única infusión de 3 mg/kg de natalizumab producía un aumento sostenido en los leucocitos circulantes de sangre periférica en animales y voluntarios sanos ("A six-month weekly intravenous toxicity study with Antegren™ in cynomolgous monkeys with a six-week recovery", Athena Report 1998, N.º 723-013-098). Sin embargo, no se sabía si el natalizumab podría presentar efectos diferenciales sobre subconjuntos de leucocitos, ya que todos los leucocitos excepto los neutrófilos expresan integrinas alpha-4.

Métodos. Se analizaron los leucocitos extraídos de sangre periférica de 30 pacientes con enfermedad de Crohn (CD; 18 natalizumab, 12 placebo) y 10 pacientes con colitis ulcerosa (CU; todos recibieron natalizumab - sin placebo) antes de la infusión y 1, 2, 4, 8 y 12 semanas después de la infusión mediante un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Se midieron los niveles de natalizumab en suero y las puntuaciones de actividad de la enfermedad en cada punto de evaluación.

Se evaluaron los cambios significativos en comparación con la línea basal ($p < 0,05$) y las correlaciones mediante ensayos de Wilcoxon y Spearman, respectivamente. Los ensayos de los rangos con signo de Wilcoxon para el análisis de los cambios en los subconjuntos de leucocitos se compararon con la línea basal dentro de los grupos de tratamiento ($p < 0,05$ denota significancia). Los ensayos de correlación de los rangos de Spearman se utilizaron para evaluar la correlación entre los parámetros de actividad de la enfermedad, los niveles de natalizumab y los subconjuntos de leucocitos en aquellos pacientes que recibieron natalizumab.

Se tomaron muestras de sangre venosa inmediatamente antes de la infusión de natalizumab/placebo y de nuevo en la semana uno, dos, cuatro, ocho y doce después de la infusión. Se utilizó el método de Lymphoprep™ (Nycomed, Dinamarca) para aislar los linfocitos de sangre periférica (PBL) antes del análisis con un clasificador celular activado por fluorescencia multicolor (FACS; Becton Dickenson, Oxford, Reino Unido) junto con un software Consort 30 (Amlot et al., 1996 Clin. Exp. Immunol. 105: 176-82). Los porcentajes de PBL que expresaban los siguientes marcadores se midieron utilizando análisis de FACS: CD19 (linfocito B), TCRαβ (linfocito T), CD3 (linfocito pan-T), TCRγδ (linfocito T), CD4 (linfocito T Th-1/colaborador), CD8 (linfocito T supresor/citotóxico) y CD16 (célula NK).

Se midieron los porcentajes de células TCRαβ que expresaban los antígenos de activación CD38, CD25 (una cadena del receptor de interleucina-2), CD26, CD69 y HLA-DR, además de subconjuntos de linfocitos T vírgenes (CD45RA) y de memoria (CD45RO) y "linfocitos T NK" ($CDS7^+/CD3^+$). También se midió el porcentaje de linfocitos T supresores/citotóxicos ($CD8^+$) que expresaban los antígenos de activación CD28 y HLA-DR.

Resultados. Los recuentos de eosinófilos, monocitos, linfocitos B y T se incrementaron todos significativamente durante un periodo ≥1 semana después de la administración de natalizumab. Los recuentos de linfocitos totales, tanto de linfocitos B como T, se incrementaron significativamente en comparación con los niveles de la línea basal. Los recuentos de neutrófilos y basófilos permanecieron sin cambios. Los linfocitos T que expresaban los marcadores de activación CD25, CD26, HLA-DR, CD8DR, CD8, CD28, CD45RO y CD45RA se incrementaron significativamente en comparación con la línea basal en un periodo ≥ 4 y 1 semana en pacientes con CU y CD, respectivamente. Los linfocitos T $CD38^+$ y $CD69^+$ se incrementaron en un periodo ≥ 1 semana únicamente en pacientes con CU. Las células NK permanecieron sin cambios tras la infusión en todos los pacientes y los linfocitos T de tipo NK ($CD57^+$) se incrementaron en la semana 1 únicamente en pacientes con CD. No se observaron cambios significativos en los linfocitos T gamma-delta (γδ) en pacientes con CD/CU. Los cambios en los subconjuntos de linfocitos T no se correlacionaron con la actividad de la enfermedad ni los niveles de natalizumab en suero. Los cambios en los leucocitos observados tras la administración de natalizumab no se detectaron tras la administración de placebo.

Los recuentos de linfocitos permanecieron elevados a las 4 semanas después de la infusión tanto en pacientes con enfermedad de Crohn ($p=0,002$) como en los pacientes con colitis ulcerosa ($p=0,02$), antes de volver a los valores previos al tratamiento en la semana 8 (Gordon et al., 2002 Aliment. Pharm. & Ther. 16: 699-706; y Gordon et al., 2001 Gastroenterology 121: 268-74).

El efecto del natalizumab sobre los monocitos y eosinófilos circulantes se muestra en las Figuras 9A y 9B. Se observó que los recuentos de neutrófilos y basófilos permanecieron sin cambios en todos los grupos de pacientes estudiados. Las Figuras 10 y 11 muestran los efectos de la administración de natalizumab sobre subconjuntos de linfocitos T circulantes específicos y células nulas en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Las barras de error denotan los estándares de desviación en cada gráfica.

No se detectaron cambios significativos en los subconjuntos de leucocitos básicos tras la infusión de placebo. La

administración de placebo a los 11 pacientes tratados con placebo se muestra en la Tabla 9. Se detectaron algunos cambios en los linfocitos que expresaban antígenos de activación en puntos de evaluación aislados únicamente en pacientes con enfermedad de Crohn (Tabla 10).

Tabla 9: subconjuntos de leucocitos en pacientes con enfermedad de Crohn tratados con placebo

Células del subconjunto x10^6/mL	**Semana 0**		**Semana 1**		**Semana 2**		**Semana 4**		**Semana 8**	
	Media	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***
Linfocitos	**,60**	*,33*	**,55**	*,36*	**,82**	*,67*	**,48**	*,29*	**,51**	*,31*
Neutrófilos	**,21**	*,75*	**,18**	*,48*	**,86**	*,36*	**,61**	*,26*	**,91**	*,15*
Eosinófilos	**,19**	*,16*	**,17**	*,13*	**,15**	*,13*	**,20**	*,12*	**,14**	*,10*
Basófilos	**,19**	*,30*	**,14**	*,09*	**,09**	*,07*	**,09**	*,03*	**,08**	*,05*
Monocitos	**,60**	*,33*	**,55**	*,36*	**,82**	*,67*	**,48**	*,29*	**,51**	*,31*

Tabla 9: valores medios (DT) de los subconjuntos de leucocitos tras la administración de placebo; sin diferencias significativas en ningún grupo en comparación con los valores de la línea basal (semana 0).

Tabla 10: marcadores de NK y linfocitos T en pacientes con enfermedad de Crohn tratados con placebo

Células del subconjunto x10^6/mL	**Semana 0**		**Semana 1**		**Semana 2**		**Semana 4**		**Semana 8**		**Semana 12**	
	Media	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***	**Media**	***DT***
Linfocitos	,36	*,57*	,12	*,57*	,83	*,08*	,34	*,98*	,28	*,74*	,62	*,84*
TCRαβ+	,99	*,53*	,81	*,56*	,28	*,88*	,98	*,84*	,95	*,79*	,17	*,81*
CD25+	,18	*,11*	,12	*,07*	,27	*,22*	,17	*,17*	,18	*,15*	,22	*,17*
CD26+	,49	*,32*	,38	*,27*	,80	*,61*	,54	*,49*	,54	*,55*	,58	*,43*
CD45RA+	,74	*,41*	,57	*,39*	,95	*,69*	,68	*,59*	,68	*,57*	,84	*,56*
CD45RO+	,42	*,20*	**,31**	***,18***	,50	*,27*	,39	*,24*	,42	*,35*	,50	*,33*
CD38+	,42	*,29*	**,31**	***,23***	,46	*,38*	,35	*,27*	,33	*,25*	,40	*,25*
CD69+	,14	*,20*	,67	*,71*	,13	*,12*	,05	*,04*	,12	*,22*	,10	*,08*
HLA-DR+	,19	*,10*	**,15**	***,08***	,25	*,20*	,16	*,11*	,17	*,10*	,22	*,16*
CD8+	,11	*,09*	**,09**	***,06***	,16	*,15*	,09	*,07*	,08	*,05*	,12	*,11*
CD8+CD28+	,21	*,11*	,16	*,11*	,30	*,20*	,22	*,21*	,20	*,18*	,23	*,14*
CD8+DR+	,11	*,09*	,09	*,06*	,16	*,15*	,09	*,07*	,08	*,05*	,12	*,11*
CD57+CD3+	,08	*,06*	,06	*,05*	,10	*,10*	**,07**	***,04***	,07	*,05*	10	*,15*
CD16+CD3-	,11	*,09*	,12	*,09*	,16	*,18*	,09	*,04*	,12	*,12*	,17	*,19*
TCRγδ+	,11	*,16*	,08	*,09*	,18	*,28*	,10	*,13*	,09	*,09*	**,11**	***,10***
KappaMAb+	,02	*,02*	,03	*,05*	,05	*,08*	,07	*,09*	**,03**	***,04***	,10	*,01*

Tabla 10: las columnas muestran los recuentos medios (*DT*) de los subconjuntos de linfocitos T y células de tipo NK de los pacientes tratados con placebo del estudio de Crohn en comparación con los valores de la línea basal (ensayo de los rangos con signo de Wilcoxon; $p<0,05$). Las diferencias significativas en comparación con la línea basal se muestran en negrita. Las desviaciones estándar para cada media se muestran con números en cursiva.

No se observó ninguna correlación significativa entre los recuentos de linfocitos totales y la puntuación de la actividad de la enfermedad ni en pacientes con enfermedad de Crohn ni en pacientes con colitis ulcerosa (Tablas 11 y 12), ni se observó ninguna correlación significativa entre subconjuntos de linfocitos individuales y la actividad de la enfermedad. No se detectó ninguna correlación significativa entre los niveles de natalizumab en suero y los cambios en los subconjuntos de leucocitos en las semanas uno, dos o cuatro después de la infusión. En casi todos los pacientes no se pudo detectar natalizumab a las ocho semanas. Por lo tanto, las correlaciones no se calcularon para este punto de evaluación.

Tabla 11: valores R de Spearman que comparan los subconjuntos de linfocitos y la actividad de la enfermedad

	Enfermedad de Crohn			Colitis ulcerosa		
Subconjuntos	**Semana 1**	**Semana 2**	**Semana 4**	**Semana 1**	**Semana 2**	**Semana 4**
Linfocitos	0,16	-0,37	-0,01	-0,63	-0,19	0,03
TCRαβ	0,26	-0,29	0,05	-0,59	-0,39	0
CD25	0,44	0,07	0,13	-0,39	-0,46	0,17
CD26	0,31	-0,22	-0,11	-0,39	-0,29	0,10
CD45RA	0,29	-0,25	0,19	-0,54	-0,39	0,51
CD45RO	0,32	-0,27	0,34	0,18	-0,17	-0,05
CD38	0,31	-0,08	0,01	-0,57	0,03	-0,05
CD69	-0,32	0,12	0,1 2	-0,15	0,28	0,12
HLA-DR	0,19	-0,05	-0,01	0,12	-0,13	0,15
CD8CD28	0,01	-0,17	-0,13	-0,18	-0,04	-0,17
CD8DR	0,11	-0,19	-0,18	-0,1	0,07	0,24
CD57	0,19	-0,08	-0,04	0,21	-0,15	0,15
CD16	-0,08	-0,3	-0,15	-0,19	0,1	-0,32
TCRγδ	0,34	0,14	-0,31	-0,63	-0,47	-0,66
Kappa Mab	-0,11	-0,02	-0,2	0,05	-0,27	0,19

Tabla 11: no se observó ninguna correlación significativa entre los recuentos de los subconjuntos de linfocitos y la puntuación de CDAI (pacientes con enfermedad de Crohn) o la puntuación de Powell-Tuck (colitis ulcerosa).

Tabla 12: valores R de Spearman que comparan los subconjuntos de linfocitos con el natalizumab en suero

	Enfermedad de Crohn			Colitis ulcerosa		
Subconjuntos	**Semana 1**	**Semana 2**	**Semana 4**	**Semana 1**	**Semana 2**	**Semana 4**
Linfocitos	0,03	0,49	0,64	0,1	-0,02	0,18
TCRαβ	-0,11	0,35	0,51	-0,04	0,28	-0,11
CD25	-0,09	0,03	0,26	0,25	-0,07	-0,25
CD26	-0,07	0,28	0,61	0,20	0,22	-0,14
CD45RA	0,19	0,29	0,62	-0,12	-0,25	-0,32
C**D45RO**	-0,16	0,32	0,34	0,37	0,08	0,39
CD38	0,06	0,18	-0,34	-0,01	-0,45	-0,43
CD69	0,02	0,26	0,57	0,2	-0,22	0,14
HLA-DR	0,05	0,13	-0,25	0,08	0,27	-0,07
CD8CD28	-0,18	0,16	0,41	0,25	0,07	0,32
CD8DR	0,4	0,16	0,004	0,08	0,3	-0,18
CD57	0,1	-0,06	-0,31	-0,08	0,03	0
CD16	0,22	0,19	-0,5	0,13	0,37	0,25
TCRγδ	0,002	-0,16	-0,2	0,21	0,61	0,6
Kappa MAb	-0,07	-0,27	0,29	0,41	0,45	-0,41

Tabla 12: sin correlación significativa entre la actividad de la enfermedad y los subconjuntos de linfocitos, excepto

para los recuentos de linfocitos totales en la semana 4 (p=0,04).

Basándose en los datos anteriores, una única infusión de 3 mg/kg de natalizumab produjo un incremento de los niveles circulantes de la mayoría, pero no todos, los subconjuntos de leucocitos en pacientes con IBD activa. Los recuentos de eosinófilos, monocitos y linfocitos circulantes se incrementaron significativamente por encima de los valores de la línea basal durante al menos cuatro semanas tras la infusión en la mayoría de pacientes. Una amplia gama de subconjuntos de linfocitos T circulantes se incrementaron significativamente por encima de los valores previos al tratamiento, particularmente aquellos que expresaban antígenos de activación. Sin embargo, los recuentos de células NK ($CD16^+/CD3^-$) no se vieron afectados por el natalizumab, y los linfocitos T $CD57^+$ se vieron afectados en un grado mucho menor por el natalizumab que otros subconjuntos de linfocitos T. Los linfocitos que expresaban el receptor de linfocitos T γδ tampoco se vieron afectados por el natalizumab, lo cual sugiere que las integrinas alpha-4 o bien no se expresan o se expresan con un nivel más bajo en estas células.

Por lo tanto, en pacientes con IBD activa, el natalizumab puede limitar el tráfico y mantener en circulación muchos leucocitos y subconjuntos de linfocitos activados. Al parecer las células NK, células γδ, neutrófilos y basófilos no se ven afectados por la administración de natalizumab, lo cual sugiere que son mediadores menos importantes en el tráfico de estos tipos de células.

REIVINDICACIONES

1. Natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a la integrina alfa-4 o a un dímero que comprende la integrina alfa-4 para su uso en el tratamiento de una inflamación patológica crónica provocada por la esclerosis múltiple, donde el natalizumab o el fragmento se debe administrar mensualmente durante un periodo de al menos 6 meses en una cantidad de 1 o 10 mg/kg de paciente.

2. Natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso de la reivindicación 1, donde el periodo de administración es de al menos 12 meses.

3. Natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso de la reivindicación 1 o 2, donde el natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a dímeros de la integrina alfa-4.

4. Natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el dímero de la integrina alfa-4 es alpha-4 beta-1.

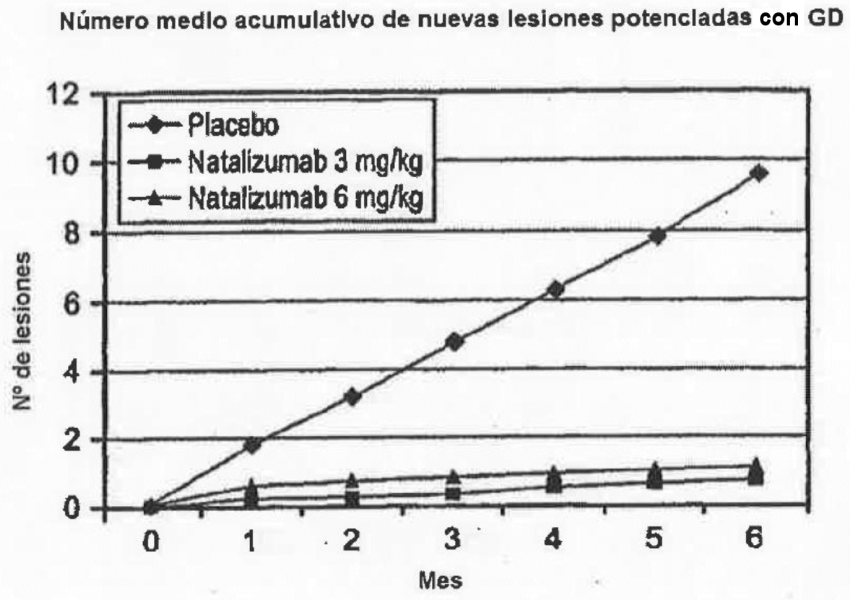
Número medio acumulativo de nuevas lesiones potenciadas con GD
Placebo
Natalizumab 3 mg/kg
Natalizumab 6 mg/kg
Nº de lesiones
0
2
4
6
8
10
12
0
1
2
3
4
5
6
Mes

FIG. 1

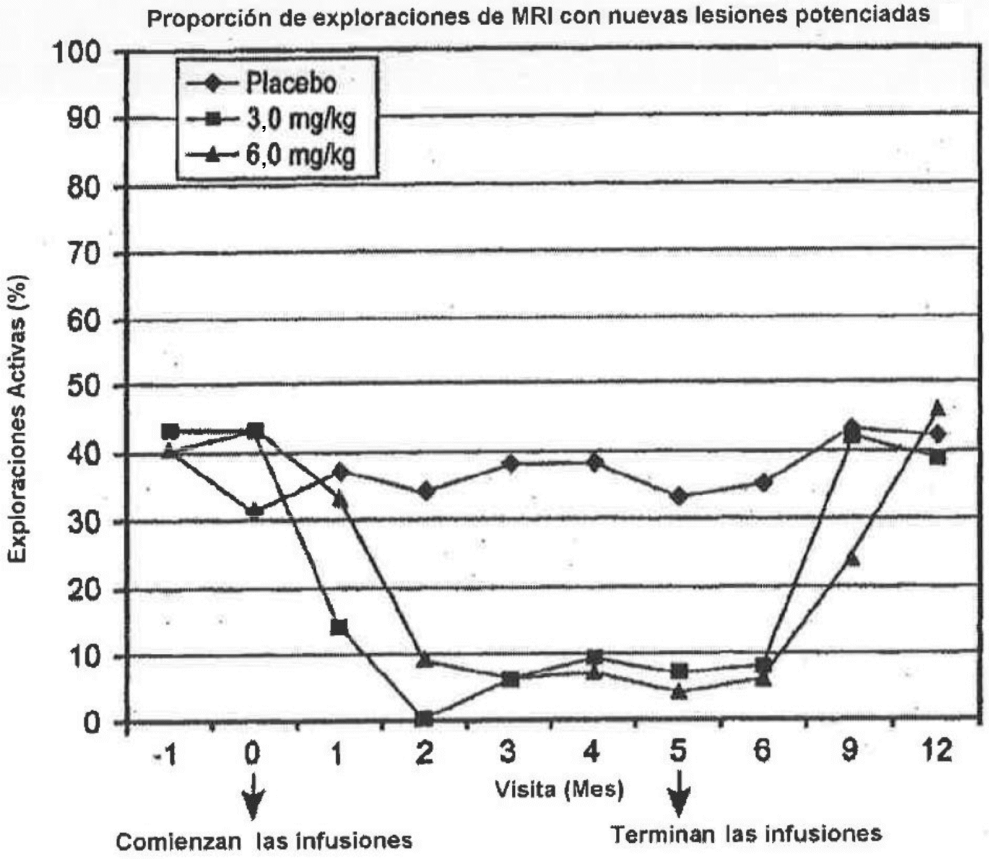
Proporción de exploraciones de MRI con nuevas lesiones potenciadas
Placebo
3,0 mg/kg
6,0 mg/kg
Exploraciones Activas (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
-1
0
1
2
3
4
5
6
9
12
Visita (Mes)
Comienzan las infusiones
Terminan las infusiones

FIG. 2

Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 3,0 mg/kg

	Mes 0							
Paciente	Pre-infusión	60 minutos	2 h	24 h	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
01	<0,13	65,0	74,7 µg/ml	43,4 µg/ml	11,6 µg/ml	4,6 µg/ml	4,9 µg/ml	2,3 µg/ml
02	<0,13	56,1	72,2	39,2	17,7	11,2	ND	3,6
03	<0,13	58,5	60,0	34,4	10,6	5,8	3,6	1,3
04	<0,13	77,9	97,3	54,1	16,2	7,2	2,3	0,2
05	<0,13	75,6	67,5	42,0	17,3	10,7	8,0	5,4
06	<0,13	72,0	73,7	ND	10,7	4,0	1,5	1,6
07	<0,13	16,9	30,7	23,7	13,0	ND	ND	3,5
08	<0,13	54,3	58,4	49,0	15,7	9,9	6,7	4,0
09	<0,13	82,7	74,2	62,6	18,6	ND	3,5	2,2
10	<0,13	84,3	84,1	64,2	22,7	10,7	7,3	3,9
11	<0,25	62,5	72,6	42,0	14,3	6,8	4,1	2,2
12	<0,25	102,7	80,6	82,1	25,5	13,7	5,8	3,5
13	<0,13	76,0	67,8	44,3	13,7	8,6	5,3	2,7
14	<0,13	66,4	70,2	36,5	11,0	6,3	3,9	2,0

	Mes 0							
	Pre-infusión	60 minutos	2 h	24 h	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
N	14	14	14	13	14	12	12	14
Media	0,0	67,9	70,3	47,5	15,6	8,3	4,7	2,7
DT	0,00	19,60	14,96	15,18	4,50	2,98	1,97	1,33

FIG. 3A

Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 3,0 mg/kg

				Mes 5			
Paciente	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Pre-infusión	60 min.	2 h	24 h
01	2,4 µ/ml	1,4 µg/ml	1,9 µg/ml	ND	ND	ND	ND
02	7,1	8,0	11,1	7,8	65,1	82,3	50,5
03	2,3	2,9	2,7	1,2	53,9	54,7	40,6
04	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	24,6	21,4	2,5
05	8,1	11,4	1,8	0,2	ND	ND	ND
06	1,4	1,8	1,9	2,0	81,9	90,3	51,9
07	1,7	2,5	2,2	2,6	36,0	62,7	22,2
08	4,5	5,7	2,0	4,7	76,0	65,0	ND
09	3,4	3,9	3,3	3,3	59,7	64,8	48,5
10	2,9	3,3	6,1	4,5	82,0	79,6	59,9
11	2,7	4,6	5,5	3,0	82,6	79,3	55,6
12	2,0	1,9	1,9	3,6	68,8	ND	65,2
13	4,3	4,3	3,6	5,0	74,9	55,4	47,0
14	2,1	1,6	1,9	3,0	70,3	63,0	35,5

				Mes 5			
SRN	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Pre-infusión	60 min,	2 h	24 h
N	14	14	14	13	12	11	11
Media	3,2	3,8	3,3	3,1	64,7	65,3	43,6
DT	2,19	2,98	2,74	2,11	18,51	18,61	18,03

FIG. 3B

Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 3,0 mg/kg

Paciente	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	33,8	21,4	10,3	8,1	0,4	<0,13	<0,13	ND	ND
03	21,3	9,4	4,7	5,1	<0,25	<0,13	<0,13	ND	ND
04	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,25	<0,13	<0,13	ND	ND
05	ND	ND	ND	0,2	<0,25	<0,13	<0,13	ND	ND
06	21,5	7,6	3,9	2,4	<0,13	<0,13	<0,13	ND	ND
07	ND	11,0	6,2	3,7	0,3	<0,13	ND	ND	ND
08	19,1	13,2	9,6	5,3	0,4	<0,13	<0,13	<0,13	ND
09	33,7	13,1	6,1	3,8	<0,13	ND	ND	ND	ND
10	29,9	16,8	ND	7,4	0,5	ND	ND	ND	ND
11	ND	18,4	10,5	6,6	0,7	<0,13	ND	ND	ND
12	ND	9,9	6,3	3,5	<0,13	<0,13	ND	ND	ND
13	22,1	13,3	9,1	4,6	<0,13	<0,13	ND	ND	ND
14	14,1	8,2	9,4	4,7	<0,13	ND	ND	ND	ND
SRN	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
N	9	12	11	13	13	10	6	1	0
Media	21,7	11,9	6,9	4,3	0,2	0,0	0,0	0,0	
DT	10,57	5,61	3,25	2,44	0,25	0,00	0,00		

FIG. 3C

Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 6,0 mg/kg

	Mes 0							
Paciente	Pre-infusión	60 min.	2 h	24 h	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
01	<0,25	104,8	155,3 µg/ml	110,0 µg/ml	36,3 µg/ml	16,8 µg/ml	11,4 µg/ml	11,0 µg/ml
02	<0,13	102,8	135,0	81,8	37,5	18,7	11,0	3,9
03	<0,13	121,1	96,3	68,4	22,9	19,9	11,4	6,6
04	<0,13	136,0	141,2	86,6	26,0	20,9	13,7	9,8
05	<0,13	163,8	138,6	84,4	29,4	17,5	14,0	9,6
06	<0,13	145,7	173,7	94,8	29,3	16,5	14,0	9,7
07	<0,25	173,5	164,0	110,0	33,9	ND	ND	ND
08	<0,13	135,8	143,0	105,8	20,9	17,6	15,0	10,9
09	<0,13	97,3	127,9	66,8	27,0	8,3	7,8	4,8
10	<0,13	149,2	111,2	103,2	37,0	21,4	11,9	4,8
11	<0,25	111,6	142,5	88,9	20,8	20,7	9,7	8,6
12	<0,13	147,6	135,0	95,5	43,9	28,0	19,4	9,9
13	<0,25	183,9	168,6	113,2	52,0	31,7	20,9	12,1
14	<0,13	140,2	129,2	109,2	36,9	21,0	12,2	7,9

	Mes 0							
	Pre-infusión	60 min.	2 h	24 h	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
N	14	14	14	14	14	13	13	13
Media	0,0	136,7	140,1	94,2	32,4	19,9	13,3	8,4
DT	0,00	26,72	21,18	15,38	8,97	5,61	3,63	2,64

FIG. 4A

Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 6,0 mg/kg

Paciente	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5			
				Pre-infusión	60 min.	2 h	24 h
01	10,7 µg/ml	ND µg/ml	2,4 µg/ml	ND	ND	ND	ND
02	6,8	8,2	9,6	10,3	ND	ND	ND
03	8,6	9,9	10,5	7,8	92,6	97,5	85,9
04	11,8	16,4	17,1	15,8	200,1	161,1	135,6
05	9,3	11,6	16,9	19,5	190,4	168,3	104,4
06	11,7	14,5	16,8	18,2	171,3	153,0	112,7
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	14,6	12,9	14,2	18,4	145,2	172,5	99,2
09	8,5	8,4	12,0	ND	103,0	107,5	44,9
10	9,0	16,3	18,1	10,9	114,3	141,4	103,0
11	11,8	14,2	13,3	14,5	135,7	109,4	93,8
12	11,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	1,6	<0,13	1,9	7,5	187,0	141,8	124,6
14	11,2	12,6	12,8	11,8	152,4	124,0	114,6

SRN				Mes 5			
	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Pre-infusión	60 min.	2 h	24 h
N	13	11	12	10	10	10	10
Media	9,8	11,4	12,1	13,5	149,2	137,7	101,9
DT	3,18	4,71	5,39	4,43	37,96	26,82	24,75

FIG. 4B

Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 6,0 mg/kg

Paciente	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
03	43,2	17,2	15,5	10,1	1,3	<0,13	<0,13	ND	ND
04	59,1	38,6	25,1	19,3	3,4	0,2	<0,13	ND	ND
05	46,0	29,3	21,3	24,8	6,5	0,3	0,2	ND	ND
06	78,9	42,9	25,1	17,4	2,9	<0,13	<0,13	ND	ND
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	50,1	26,0	24,7	21,2	ND	0,7	<0,13	<0,13	ND
09	32,2	30,2	16,6	9,3	1,1	<0,13	<0,13	ND	ND
10	50,7	34,3	17,0	13,1	2,1	<0,13	<0,13	<0,13	ND
11	34,0	30,0	23,7	22,5	4,6	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	48,1	31,9	19,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	44,8	32,3	15,5	13,6	2,6	ND	ND	ND	ND
	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
N	10	10	10	9	8	7	7	2	0
Media	48,7	31,3	20,4	16,8	3,1	0,2	0,0	0,0	
DT	13,20	6,93	4,08	5,56	1,79	0,26	0,08	0,00	

FIG. 4C

Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 0	Pre-infusión	N	14	13	14
		Media	9,82	8,06	7,56
		DT	5,331	2,192	3,135
		Mediana	8,3	7,7	6,7
		Mínimo	4,7	5,9	3,1
		Máximo	24,9	14,4	13,3
Mes 0	2-horas después de la infusión	N	14	14	14
		Media	8,21	99,11	100,97
		DT	3,567	10,557	4,884
		Mediana	7,5	102,4	102,1
		Mínimo	5,2	74,9	93,2
		Máximo	18,6	110,8	110,7

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 0	24-horas después de la infusión	N	12	12	13
		Media	9,30	99,09	98,93
		DT	7,328	9,052	12,079
		Mediana	6,7	99,9	97,4
		Mínimo	5,6	81,5	81,2
		Máximo	31,9	109,4	117,5
Semana 1		N	14	14	14
		Media	7,92	93,41	99,61
		DT	2,579	5,656	12,011
		Mediana	8,3	94,3	94,9
		Mínimo	3,5	82,8	83,5
		Máximo	13,3	100,9	120,8

FIG. 5A

Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Semana 2		N	12	14	13
		Media	8,98	88,28	97,37
		DT	2,991	7,494	14,377
		Mediana	8,4	88,0	97,9
		Mínimo	4,1	75,9	78,3
		Máximo	13,4	101,4	131,7
Semana 3		N	13	13	12
		Media	8,17	80,99	92,79
		DT	2,242	19,150	9,767
		Mediana	8,8	85,5	92,3
		Mínimo	4,9	24,5	74,7
		Máximo	12,0	99,3	110,9

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 1		N	14	13	13
		Media	8,87	82,48	85,58
		DT	3,808	11,272	8,491
		Mediana	8,4	84,1	84,6
		Mínimo	3,1	56,1	68,6
		Máximo	17,3	100,2	96,1
Mes 2		N	12	14	13
		Media	9,41	79,15	93,21
		DT	3,846	22,779	9,194
		Mediana	9,4	87,1	94,0
		Mínimo	4,7	7,3	75,8
		Máximo	19,5	96,6	104,2

FIG. 5B

Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 3		N	12	14	12
		Media	6,97	79,47	83,32
		DT	2,720	23,459	18,333
		Mediana	6,5	81,6	88,9
		Mínimo	3,3	8,9	29,2
		Máximo	11,4	104,5	96,3
Mes 4		N	10	14	11
		Media	8,38	77,81	95,51
		DT	3,400	25,375	15,794
		Mediana	7,1	76,0	93,6
		Mínimo	4,9	7,9	78,3
		Máximo	16,9	117,4	139,0

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 5	Pre-infusión	N	9	13	11
		Media	9,48	70,88	91,94
		DT	2,606	26,535	10,720
		Mediana	9,1	75,1	94,8
		Mínimo	6,1	9,0	75,4
		Máximo	15,6	115,0	106,9
Mes 5	2-Horas después de la infusión	N	9	11	10
		Media	11,03	92,09	99,19
		DT	6,203	8,267	10,200
		Mediana	7,6	95,0	97,4
		Mínimo	4,9	79,7	82,5
		Máximo	21,7	103,4	114,6

FIG. 5C

Niveles de saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 5	24-horas después de la infusión	N	8	12	10
		Media	7,50	92,04	89,08
		DT	2,660	15,256	32,364
		Mediana	6,4	94,6	95,9
		Mínimo	4,7	49,5	4,8
		Máximo	12,8	106,4	123,2
Semana 21		N	8	12	11
		Media	8,06	80,25	92,27
		DT	2,217	24,078	11,557
		Mediana	8,2	86,2	88,9
		Mínimo	4,3	5,1	77,3
		Máximo	11,7	94,6	112,9

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Semana 22		N	7	12	10
		Media	8,67	84,98	90,44
		DT	2,471	25,744	18,174
		Mediana	8,7	90,5	81,6
		Mínimo	5,1	6,2	73,5
		Máximo	12,0	101,7	127,8
Semana 23		N	7	10	10
		Media	9,16	82,89	97,24
		DT	2,950	27,649	23,374
		Mediana	8,7	90,2	90,9
		Mínimo	4,6	6,1	78,8
		Máximo	14,0	100,5	154,8

FIG. 5D

Niveles de saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 6		N	10	13	9
		Media	8,65	67,32	80,59
		DT	3,574	29,838	27,738
		Mediana	8,2	80,2	85,4
		Mínimo	4,4	6,4	10,0
		Máximo	16,7	102,5	106,2
Mes 7		N	10	12	8
		Media	7,69	42,10	80,46
		DT	1,281	24,011	27,664
		Mediana	7,7	41,1	67,2
		Mínimo	5,1	4,7	62,5
		Máximo	10,4	88,0	145,2

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 8		N	10	13	8
		Media	7,60	14,09	34,16
		DT	1,726	10,214	21,619
		Mediana	6,9	12,1	29,6
		Mínimo	6,0	6,2	11,8
		Máximo	10,7	45,0	59,6
Mes 9		N	5	7	7
		Media	9,52	5,88	9,45
		DT	2,701	2,246	4,644
		Mediana	9,0	5,6	7,7
		Mínimo	6,3	3,7	5,5
		Máximo	13,5	10,4	18,0

FIG. 5E

Niveles de saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 10		N	2	3	4
		Media	7,78	8,65	9,17
		DT	2,029	0,635	1,655
		Mediana	7,8	8,6	9,3
		Mínimo	6,3	8,0	7,1
		Máximo	9,2	9,3	11,0
Mes 12		N	1	1	1
		Media	8,80	6,04	6,61
		DT			
		Mediana	8,8	6,0	6,6
		Mínimo	8,8	6,0	6,6
		Máximo	8,8	6,0	6,6

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Terminacción temprana		N	0	1	1
		Media		94,51	32,29
		DT			
		Mediana		94,5	32,3
		Mínimo		94,5	32,3
		Máximo		94,5	32,3

FIG. 5F

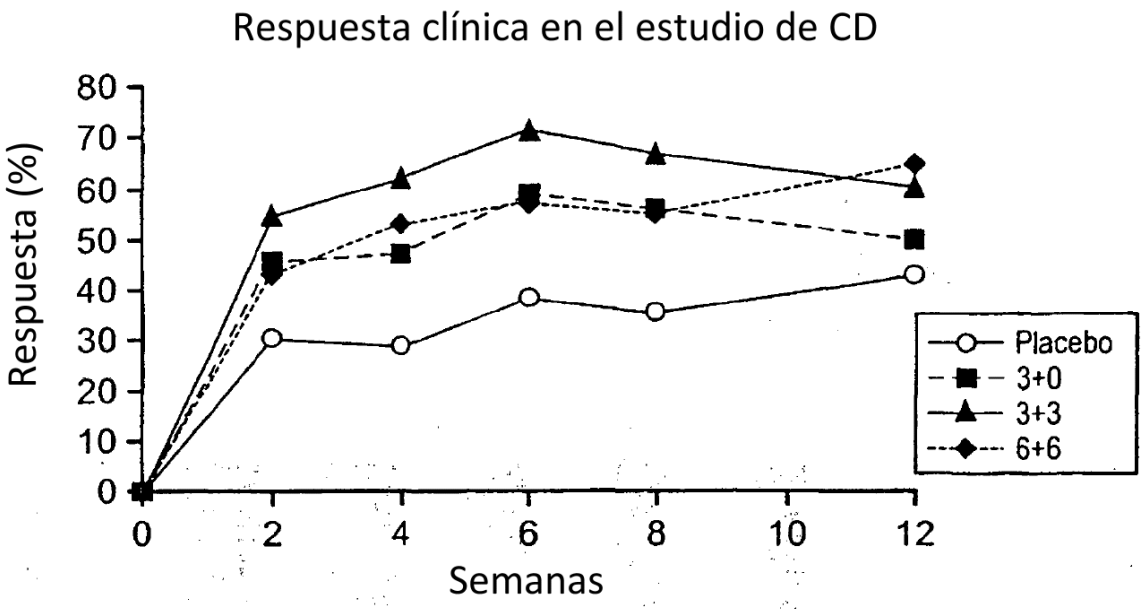
Respuesta clínica en el estudio de CD
Respuesta (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
Semanas
Placebo
3+0
3+3
6+6

FIG. 6

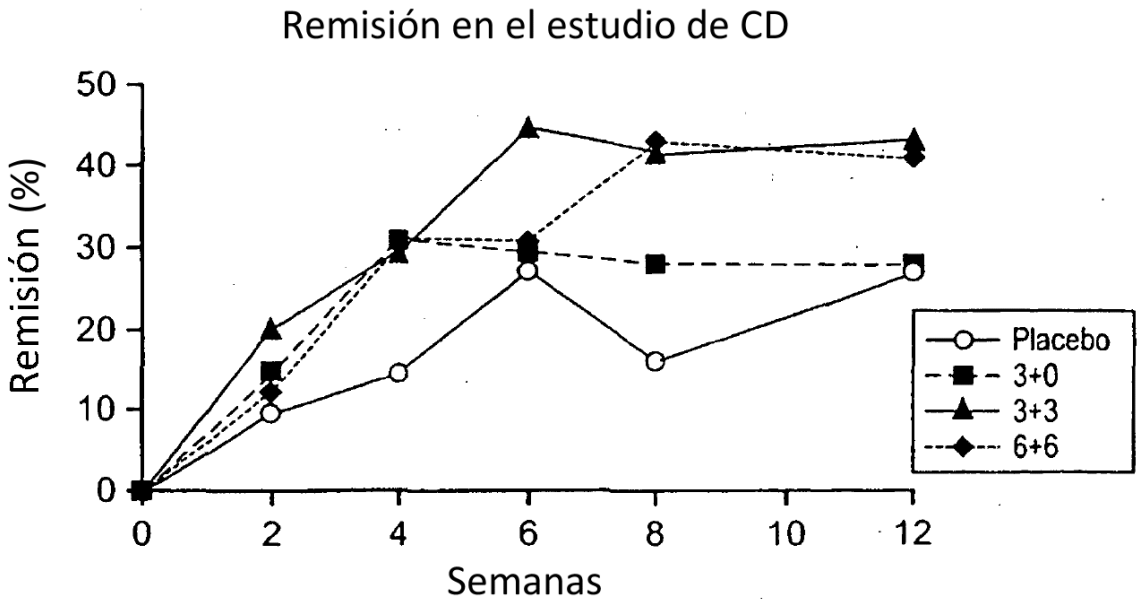
Remisión en el estudio de CD
Remisión (%)
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
Semanas
Placebo
3+0
3+3
6+6

FIG. 7

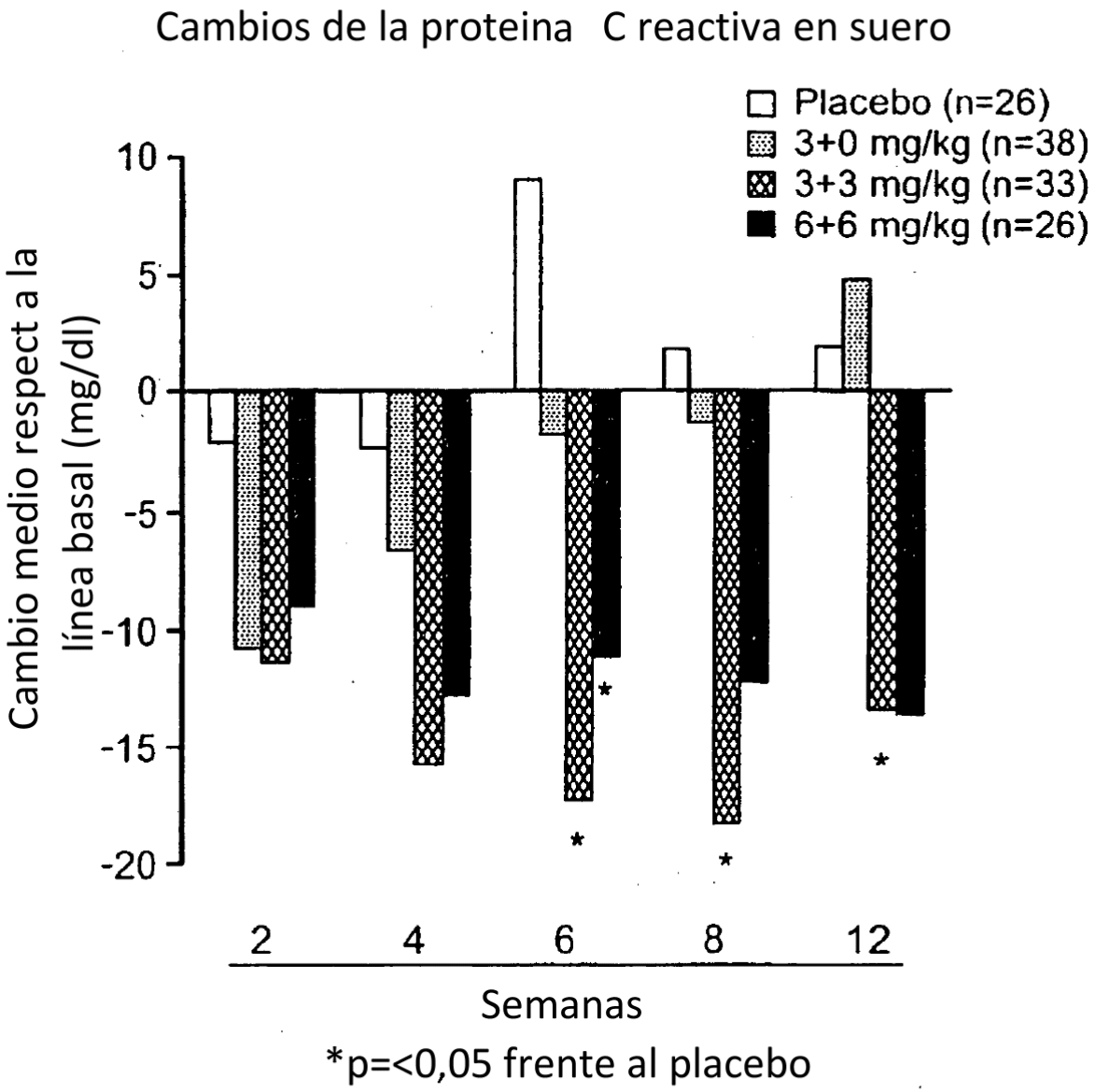
Cambios de la proteina C reactiva en suero
Placebo (n=26)
3+0 mg/kg (n=38)
3+3 mg/kg (n=33)
6+6 mg/kg (n=26)
Cambio medio respect a la línea basal (mg/dl)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
2
4
6
8
12
Semanas
*p=<0,05 frente al placebo

FIG. 8

Efecto de natalizumab sobre los eosinófilos circulantes
en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activas

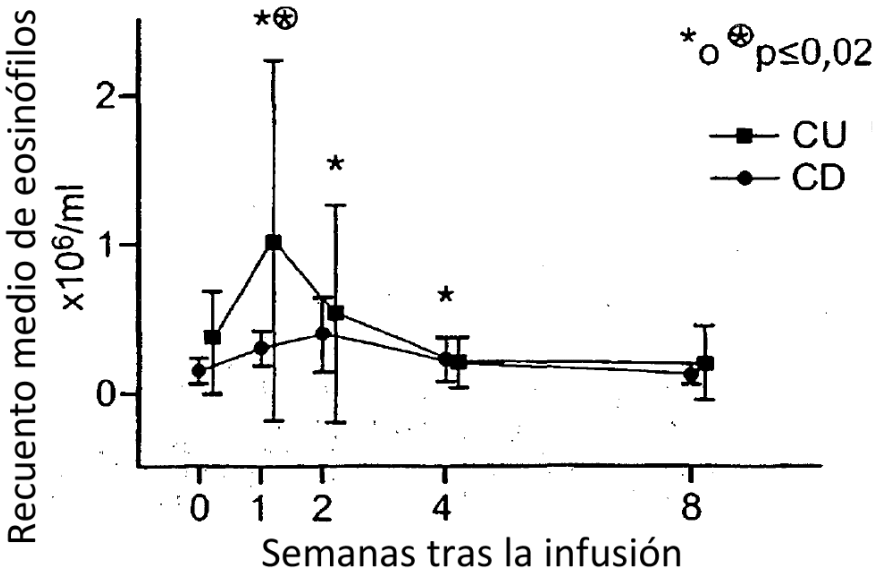

FIG. 9A

Efecto de natalizumab sobre los monocitos circulantes
en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa activas

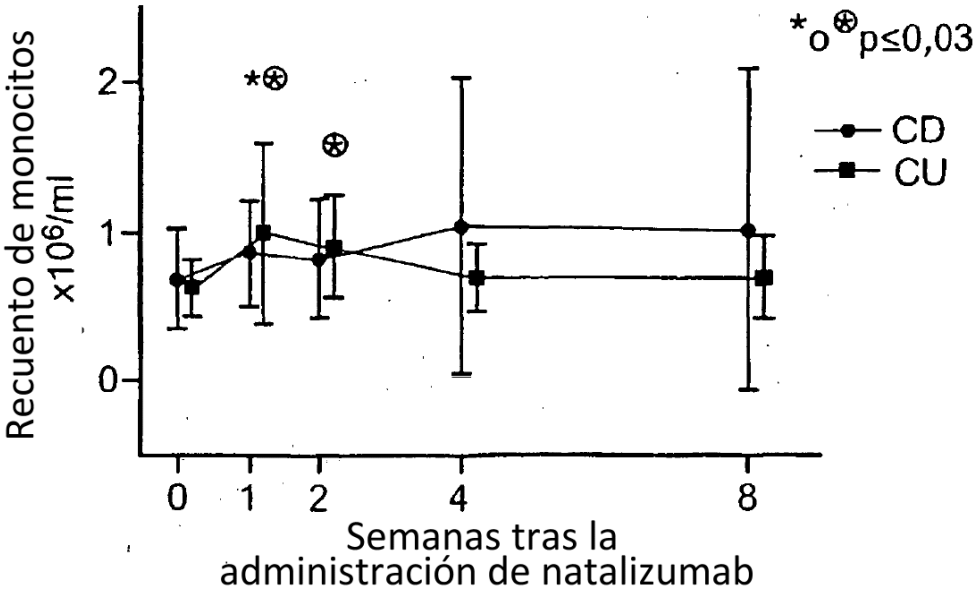

FIG. 9B

Efectos de natalizumab sobre las células TCRαβ⁺ que expresan antígenos de activación en pacientes con enfermedad de Crohn activa

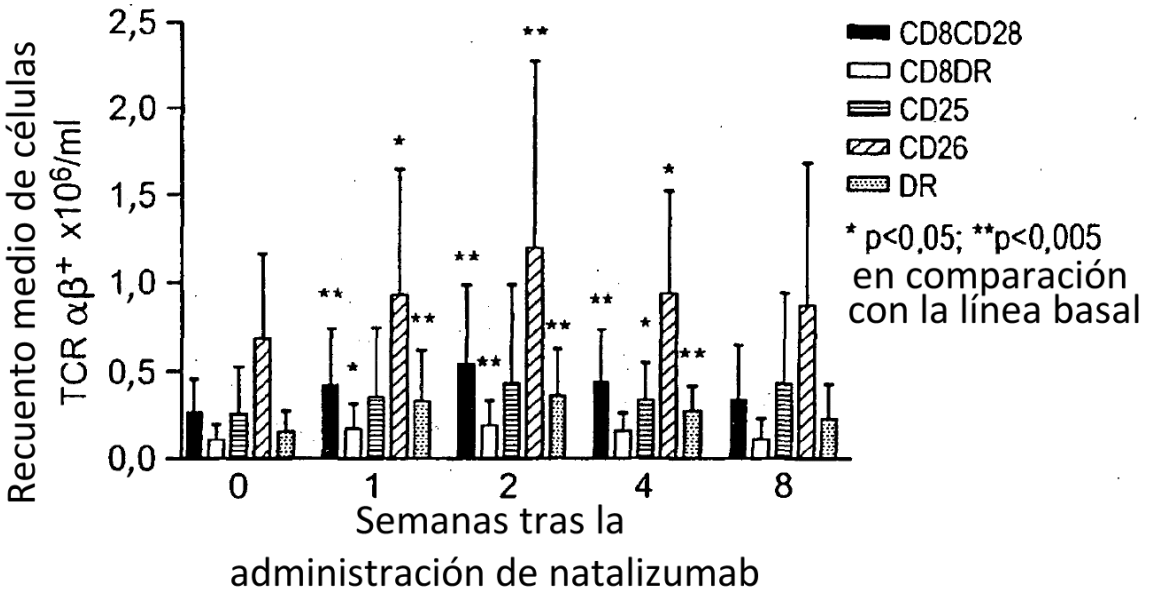

FIG. 10A

Efectos de natalizumab sobre las células TCRαβ⁺ que expresan antígenos de activación en pacientes con colitis ulcerosa activa

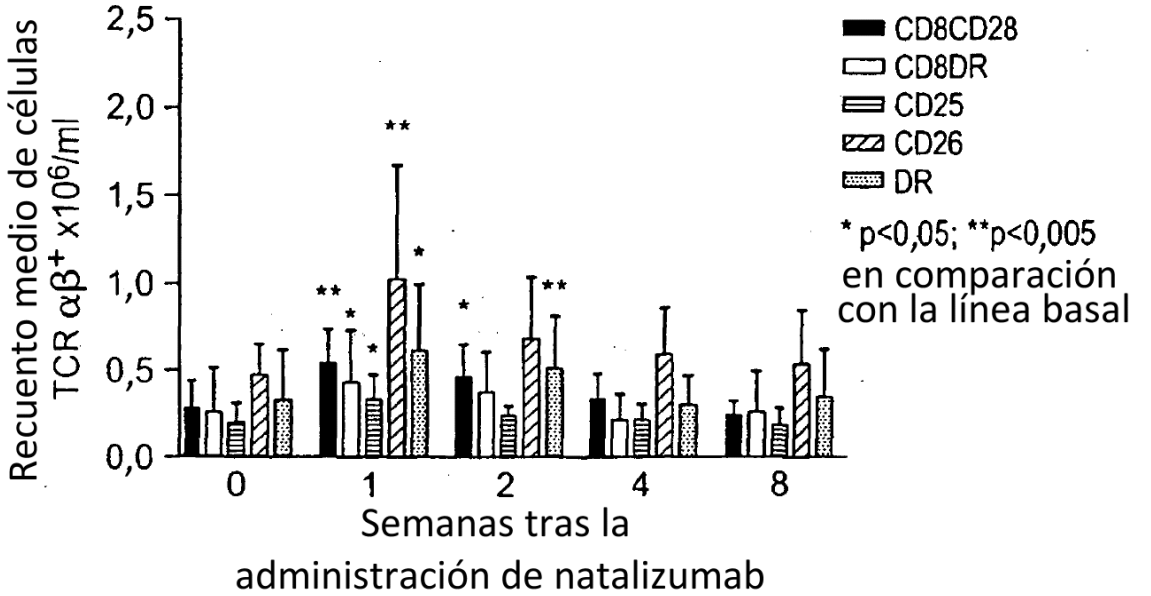

FIG. 10B

Efectos de natalizumab sobre las células TCRαβ+ que expresan antígenos de activación y marcadores vírgenes y de memoria en pacientes con enfermedad de Crohn activa

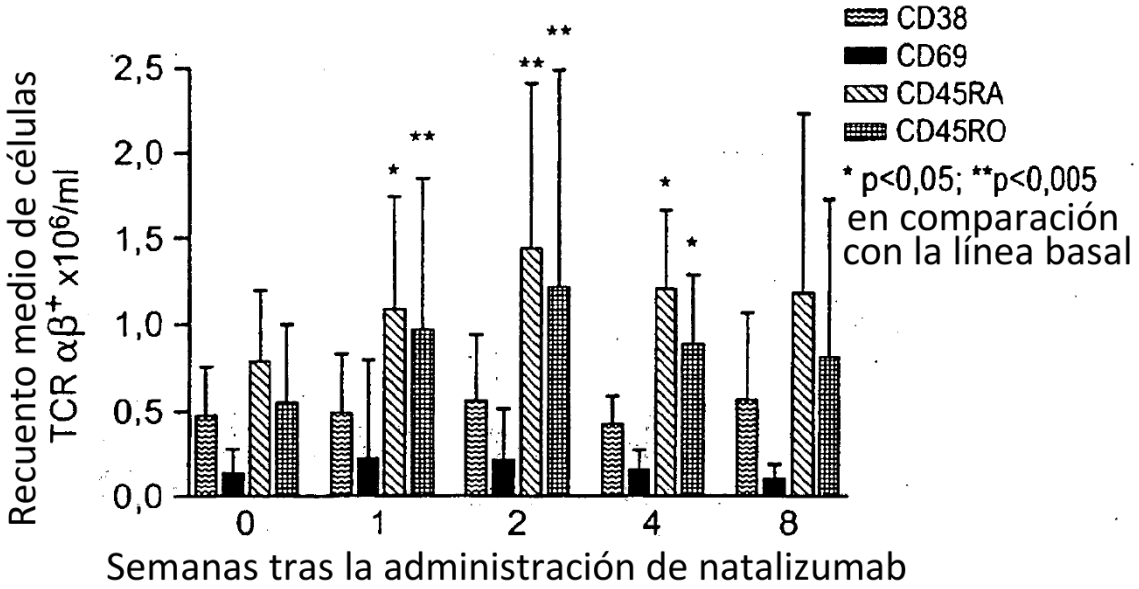

FIG. 10C

Efectos de natalizumab sobre las células TCRαβ+ que expresan antígenos de activación y marcadores vírgenes y de memoria en pacientes con colitis ulcerosa activa

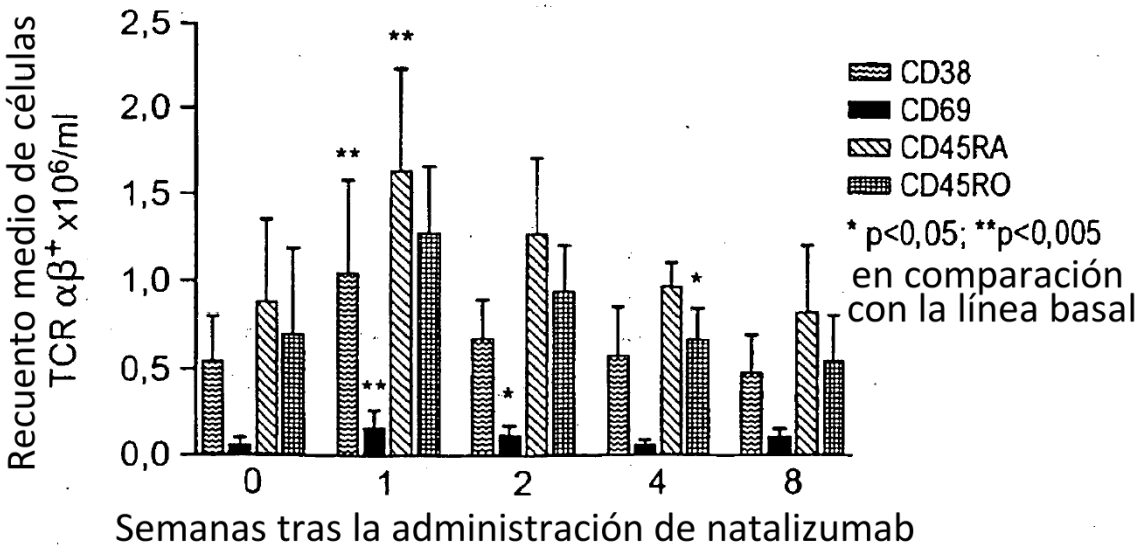

FIG. 10D

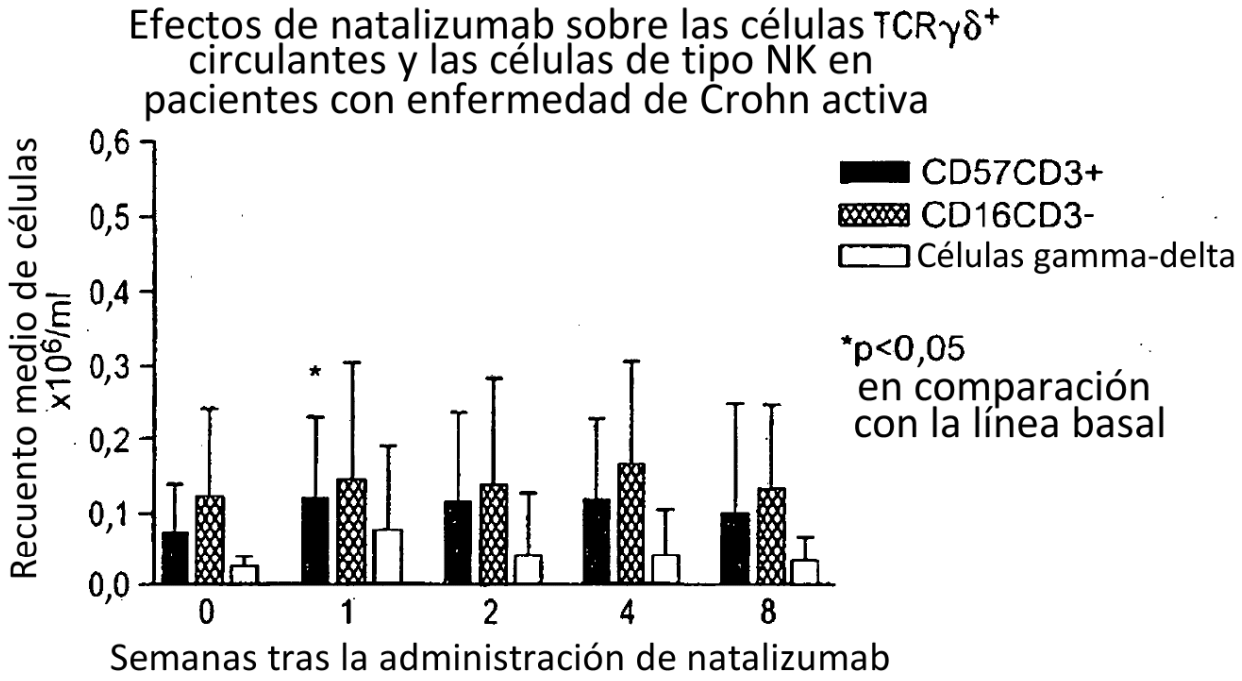

FIG. 11A

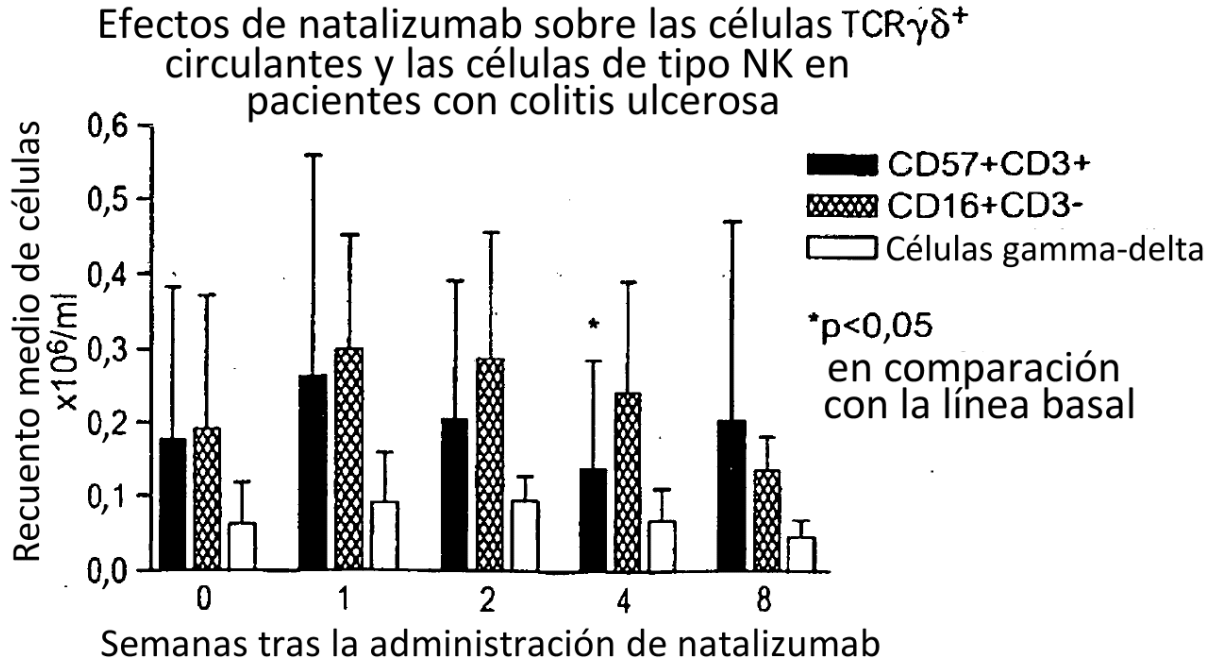

FIG. 11B