

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 480**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2009 E 09747765 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2279004**

54 Título: **Uso de biomarcadores para evaluar el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales con antagonistas de la integrina beta7**

30 Prioridad:

16.05.2008 US 54115 P

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

10.04.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GELZLEICHTER, THOMAS, RICHARD;
HIRARAGI, HAJIME;
STEFANICH, ERIC, GARY;
WANG, HONG y
WILLIAMS, MARNA BROMBERG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 533 480 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

Uso de biomarcadores para evaluar el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales con antagonistas de la integrina beta7

La presente invención se refiere a métodos para evaluar el efecto, la eficacia, la seguridad y / o la dosificación de agentes terapéuticos (o fármacos), como los antagonistas de la integrina beta7, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales. En particular, la presente invención se refiere a métodos de uso del nivel de linfocitos residentes en intestino o en la sangre periférica de un paciente, el nivel de ocupación de un fármaco sobre los linfocitos residentes en intestino, y / o el nivel de los receptores de la integrina beta7 en linfocitos residentes en intestino como indicadores ("biomarcadores") del efecto, la eficacia, la seguridad y / o la dosificación de agentes terapéuticos tales como antagonistas de la integrina beta7 para el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la evaluación de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento de un trastorno gastrointestinal con un antagonista de la integrina beta7, utilizando uno o más de estos biomarcadores. Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos de uso de tales biomarcadores para diseñar un tratamiento farmacológico y / o régimen de dosificación, o para el pronóstico.

Antecedentes de la invención

Con el fin de proteger el cuerpo contra sustancias extrañas, las células del sistema inmune circulan a través del cuerpo a través de la sangre periférica y se alojan en los ganglios linfáticos y los tejidos donde se concentra el antígeno. En general, hay dos sistemas distintos de residencia, la residencia periférica y la residencia en mucosa, que proporcionan la inmunidad, ya sea a los antígenos sistémicos o de las mucosas. Las células inicialmente activadas en sitios gastrointestinales se alojaran preferentemente en tejidos de la mucosa y los nodos linfáticos. Por contra, las células que se activan en los ganglios linfáticos periféricos viajan preferentemente a los sitios periféricos. (Butcher et al., *Adv Immunol* (1999)). Las células en circulación entran en los ganglios linfáticos y tejidos intestinales por extravasación a través de las vénulas endoteliales altas (HEV). Esto ocurre a través de interacciones entre moléculas de adhesión en la superficie de los linfocitos y los receptores (adresinas) en las HEV. (Butcher et al., *Adv Immunol* (1999)).

Las integrinas son receptores de la superficie celular heterodímeros alfa / beta implicados en numerosos procesos celulares desde la adhesión celular a la regulación de genes (Hynes, R.O., *Cell*, 1992, 69: 11-25; y Hemler, M.E., *Annu. Rev. Immunol.*, 1990, 8: 365-368). En el sistema inmune, las integrinas están implicadas en el tráfico de leucocitos, la adhesión e infiltración durante los procesos inflamatorios (Nakajima, H. et al, *J. Exp. Med.*, 1994, 179: 1145-1154). La expresión diferencial de las integrinas regula las propiedades adhesivas de las células y diferentes integrinas están implicadas en diferentes respuestas inflamatorias. (Butcher, C.E. et al., *Science*, 1996, 272: 60-66). Las integrinas que contienen beta7 (es decir, alfa4beta7 y alphaEbeta7) se expresan principalmente en monocitos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos, pero no en neutrófilos (Elices, M.J. et al., *Cell*, 1990, 60: 577-584). Los ligandos primarios para la integrina alfa4beta7 son las molécula de adhesión celular adresina de proteínas de la superficie endotelial de la mucosa (MAdCAM-1) y molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) (Makarem, R. et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 4005-4011). La unión de la integrina alfa4beta7 a la MAdCAM-1 y / o VCAM-1 expresada en las vénulas endoteliales altas (HEV) en sitios de inflamación según los informes, resulta en la firme adhesión de los leucocitos al endotelio; esta etapa de adhesión firme es seguida por la extravasación de las células en el tejido inflamado (Chuluyan, H.E. et al, *Springer Semin. Immunopathol.*, 1995, 16: 391 404). Un ligando principal para la integrina alphaEbeta7 (que se expresa en los linfocitos intraepiteliales (IEL)) es la E-cadherina, que se ha descrito que facilita la adherencia de las células portadoras de alphaEbeta7 a las células epiteliales. Mientras que la E-cadherina según lo descrito, no juega un papel en la residencia en el intestino, se cree que las interacciones entre E-cadherina y alphaEbeta7 juegan un papel en la inmovilización de los linfocitos en el epitelio intestinal.

EII es un grupo de afecciones inflamatorias, autoinmunes del intestino grueso, y en algunos casos, el intestino delgado. Las principales formas de EII son la enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Como una enfermedad autoinmune, EII se caracteriza por aumento de la infiltración de leucocitos en el tracto gastrointestinal, lo que conduce al engrosamiento del intestino y la destrucción celular. La inhibición de esta infiltración mediante el bloqueo de la residencia de leucocitos puede regular la inflamación y la destrucción celular asociada con la enfermedad. Según los informes, los linfocitos residentes en mucosa circulantes están alterados en los pacientes con inflamación del colon (Meenan et al. *Gut* 1997; 40: 241-246). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra alfa4beta7, MAdCAM-1, o VCAM-1 son moduladores eficaces, según se ha descrito, en modelos animales de enfermedades inflamatorias crónicas tales como la colitis (Viney et al., *J. Immunol*, 1996, 157: 2488 a 2497) y enfermedades intestinales inflamatorias (EII; Podolsky, D.K., *N. Eng. J. Med.*, 1991, 325: 928-937; Powrie, F. et al., *Ther. Immunol*, 1995, 2: 115-123).

La administración de anticuerpos monoclonales contra alfaE beta7 según se ha descrito, previene y mejora la colitis inducida por inmunización en ratones IL-2^{-/-}, lo que sugiere que el inicio y mantenimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal depende de la localización colónica de los linfocitos CD4⁺ de la lámina propia que expresan alfaE beta7 (Ludviksson et al., *J. Immunol*. 1999, 162 (8): 4975-82). Un anticuerpo anti-α4 (natalizumab) según se ha descrito tiene eficacia en el tratamiento de pacientes con EC (Sandborn et al., *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1912-

1925) y un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (MLN-02) según se ha descrito, es eficaz en pacientes con CU (Feagan et al., N. Engl. J. Med. 2005; 352: 2499-507). Estos resultados validan $\alpha 4\beta 7$ como una diana terapéutica y apoyan la idea de que la interacción entre $\alpha 4\beta 7$ y MAdCAM-1 media en la patogénesis de la EII. Por lo tanto, los antagonistas de la integrina beta7 son de gran potencial como un agente terapéutico en el tratamiento de la EII.

La patente US 2001/046496 describe un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra $\alpha 4\beta 7$, llamado ActImAB (PLD-02). En un ensayo clínico, LDP-02 se administra a los pacientes. Las muestras de sangre se analizan para detectar una "señal de $\alpha 4\beta 7$ " mediante la medición de la unión de ACT-1 marcado (el homólogo murino de LDP-02) a $\alpha 4\beta 7$ en un análisis FACS (véase, por ejemplo el párrafo [0070]. La "señal de $\alpha 4\beta 7$ " se pierde después de administración de LDP-02 y esto se interpreta como la saturación de los sitios de unión de $\alpha 4\beta 7$ y / o inhibición de la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de los linfocitos circulantes (párrafo [0006]).

Con el fin de diseñar terapias con un efecto deseado, la seguridad y / o eficacia, es importante para evaluar la capacidad de respuesta y el pronóstico de un paciente en respuesta al tratamiento con un agente terapéutico, tal como un antagonista de la integrina beta7. Por lo tanto, es deseable desarrollar un biomarcador que puede predecir y / o reastrear con exactitud de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento con un agente terapéutico. Tal predicción es esencial para el diseño de los regímenes de tratamiento eficaces para los pacientes humanos en los estudios de ensayos clínicos y tratamiento de enfermedades.

Resumen de la invención

La presente memoria descriptiva describe métodos para evaluar el efecto, la eficacia, la seguridad, el pronóstico y / o la dosificación de agentes terapéuticos (o fármacos), tales como antagonistas de la integrina beta7, para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal. En particular, la presente memoria descriptiva describe métodos para usar el nivel de linfocitos residentes en el intestino en la sangre periférica del paciente, el nivel de ocupación de un fármaco sobre los residentes en el intestino, y / o el nivel de receptores de integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino como indicadores (o biomarcadores) del efecto, la eficacia, la seguridad, el pronóstico, y / o dosificación de agentes terapéuticos tales como antagonistas de integrina beta7 para el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la evaluación de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento de un trastorno gastrointestinal con una antagonista de la integrina beta7, utilizando uno o más de estos biomarcadores. Adicionalmente, la presente especificación describe métodos de uso de tales biomarcadores para diseñar un tratamiento farmacológico y / o régimen de dosificación, o para el pronóstico.

En algunos aspectos, el nivel de un biomarcador antes del tratamiento del paciente con un agente terapéutico se compara con el nivel del mismo biomarcador durante y / o después del tratamiento del paciente, y un cambio (por ejemplo, aumento o disminución) en el nivel de este biomarcador en el paciente es indicativo del efecto, la eficacia, la seguridad y / o pronóstico del agente terapéutico, por ejemplo, un antagonista de la integrina beta7, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente. Además, tales métodos se pueden utilizar para diseñar un tratamiento de fármacos o régimen de dosificación para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente.

En un aspecto, la especificación describe un método para determinar la eficacia de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente, comprendiendo el método comparar la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con el antagonista de integrina beta7, a una cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia del antagonista para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente.

En otro aspecto, la especificación describe un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal al tratamiento con un antagonista de la integrina beta7, el método comprende comparar la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con el antagonista de integrina beta7, a la cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento es indicativo de la capacidad de respuesta de dicho paciente al tratamiento con dicho antagonista.

En otro aspecto, la especificación describe un método para determinar la dosificación de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente, comprendiendo el método el ajuste de la dosis del antagonista de integrina beta7 basado en una comparación de la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con una dosis del antagonista de integrina beta7, a una cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia o de la respuesta a la dosis del antagonista de la integrina beta7 para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente.

5 En otro aspecto, la especificación describe un método para determinar el régimen de dosificación de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente, comprendiendo el método el ajuste del régimen de dosis del antagonista de integrina beta7 basado en una comparación de la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con un régimen de dosificación del antagonista de integrina beta7, a una cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia de la capacidad de respuesta a o el régimen de dosificación del antagonista de la integrina beta7 para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente.

10 En un aspecto, el cambio de la cantidad de biomarcador es un aumento.

15 En otro aspecto, el cambio de la cantidad de biomarcador es una disminución.

En otro aspecto, la muestra es una muestra de sangre periférica del paciente.

20 En un aspecto, la cantidad de biomarcador en una muestra de sangre de dicho paciente después de recibir el antagonista de integrina beta7 se mide dentro de los 100 días después de recibir una primera dosis del antagonista de integrina beta7.

25 En otro aspecto, la cantidad de biomarcador en una muestra de sangre de dicho paciente después de recibir el antagonista de integrina beta7 se mide dentro de aproximadamente 50 días de la administración del antagonista de la integrina beta7. En aún otro aspecto, la cantidad de biomarcador en una muestra de sangre de dicho paciente después de recibir el antagonista de integrina beta7 se mide dentro de aproximadamente 24 horas después de administrar el antagonista de integrina beta7.

30 La presente invención proporciona un método para determinar la dosificación de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente, en el que dicho antagonista de la integrina beta7 es un anticuerpo anti-beta7, comprendiendo el método de ajuste de la dosis de antagonista de integrina beta7 basado en una comparación de la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con un régimen de dosis o dosificación del antagonista de integrina beta7, a una cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia o de la respuesta a la dosis o el régimen de dosificación del antagonista de la integrina beta7 para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente, y en el que el biomarcador se selecciona de un grupo que consiste de los linfocitos residentes en el intestino en la sangre periférica del paciente, ocupación de antagonista de la integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino, y los receptores de la integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino, en el que los linfocitos residentes en el intestino son un subgrupo distintivo de linfocitos identificados como CD4⁺CD45RA-β7^{alto}.

35 En una realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria del intestino.

40 En una realización adicional, la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU).

En otra realización, dicho paciente es un ser humano.

45 En un aspecto, dicha cantidad alterada es al menos aproximadamente el 30%, aproximadamente el 50%, alrededor de una vez, o aproximadamente tres veces mayor en la cantidad de dichos biomarcadores.

50 En un aspecto, el anticuerpo anti-integrina beta7 se administra en una cantidad de aproximadamente 1 mg / kg a 100 mg / kg.

55 En un aspecto adicional, dicha cantidad es de 5 mg / kg a 50 mg / kg.

En una realización, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de uno o más medicamentos.

60 En un aspecto adicional, el medicamento adicional es un agente inmunosupresor, un agente de control del dolor, un agente antidiarreico, un antibiótico, o una combinación de uno o más de dichos agentes.

En otro aspecto más, dicho agente inmunosupresor es la sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), metroidazol, ciprofloxacina, azatioprina o 6-mercaptopurina.

65 En otro aspecto, dicho otro medicamento es otro anticuerpo anti-integrina beta7.

- En un aspecto, el anticuerpo anti-integrina beta7 se administra parenteralmente en dicho paciente.
- 5 En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-integrina beta7 se administra en dicho paciente por vía intravenosa y / o subcutánea.
- En un aspecto, dicho anticuerpo anti-integrina beta7 se administra a una frecuencia de al menos una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, o 12 semanas.
- 10 En un aspecto adicional, dicho anticuerpo anti-integrina beta7 se administra semanalmente.
- En otro aspecto, dicho anticuerpo anti-beta7 se administra durante al menos 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, o 52 semanas.
- 15 En una realización, el anticuerpo es monoclonal.
- En otra realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
- En otra realización, dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
- 20 En un aspecto, dicho anticuerpo inhibe la interacción de una subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad de la integrina y / o un ligando de la integrina.
- En un aspecto, la segunda subunidad de integrina alfa 4 es una subunidad de la integrina, y en el que el ligando es MAdCAM, VCAM o fibronectina.
- 25 En un aspecto, la subunidad de integrina alfa 4 es de un ser humano.
- En un aspecto, la segunda subunidad de la integrina es la subunidad de integrina alfaE, y en el que el ligando es E-cadherina.
- 30 En un aspecto, el ligando es de un ser humano.
- En un aspecto, la subunidad de integrina alfaE es de humano.
- 35 En otro aspecto, el anticuerpo anti-integrina beta7 comprende tres secuencias de regiones hipervariables de cadena pesada (HVRH1-H3) y tres secuencias de regiones hipervariables de cadena ligera (HVR-L1-L3), en el que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariable (HVR) se selecciona del grupo que consiste en:
- 40 (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, en el que A1-A11 es RASESVDTYLH (Id. de Sec. N°: 1);
(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B8, en el que B1-B8 es KYASQSIG (Id. de Sec. N°: 2);
(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en el que alquilo C1-C9 es QQGNSLPNT (Id. de Sec. N°: 3);
(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en el que D1-D10 es GFFITNNYWG (Id. de Sec. N°: 4);
(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E17, en el que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (Id. de Sec. N°: 5);
y
45 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F11, en el que F1-F11 es MTGSSGYFDF (Id. de Sec. N°: 6).
- En otra realización más, el anticuerpo comprende seis regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste de HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde:
- 50 (i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos A1-A11, en el que A1-A11 es RASESVDTYLH (Id. de Sec. N°: 1); RASESVDLLH (Id. de Sec. N°: 7), RASESVDTLH (Id. de Sec. N°: 8), o RASESVDLLH (Id. de Sec. N°: 9) o una variante de los Id. de Sec. N°: 1, 7, 8 o 9, en donde el aminoácido A2 se selecciona entre el grupo formado por A, G, S, T, y V y / o el aminoácido A3 se selecciona entre el grupo que consiste en S, G, I, K, N, P, Q, R y T, y / o el aminoácido A4 se selecciona del grupo que consiste en E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N y R, y / o el aminoácido A5 se
55 selecciona del grupo que consiste en S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, y V, y / o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste en V, R, I, A, G, K, L, M, y Q, y / o el aminoácido A7 se selecciona entre el grupo que consiste en D, V, S, A, e, G, H, I, K, L, N, P, S y T, y / o el aminoácido A8 se selecciona de entre el grupo que consiste en D, G, N, E, T, P y S, y / o el aminoácido A9 se selecciona de entre el grupo que consiste en L, Y, I y M, y / o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste en L, A, I, M, y V y / o el aminoácido A11 se selecciona de entre el grupo
60 que consiste en H, Y, F, y S;
- (ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos B1-B8, en el que B1-B8 es KYASQSIG (Id. de Sec. N°: 2), RYASQSIG (Id. de Sec. N°: 20), o XaaYASQSIG (Id. de Sec. N°: 21), donde Xaa representa cualquier aminoácido, o una variante de los Id. de Sec. N°: 2, 20 o 21, en el que el aminoácido B1 se selecciona entre el grupo que consiste
65 en K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, y y Xaa (donde Xaa representa cualquier aminoácido), y / o el aminoácido B4 se selecciona del grupo que consiste en S y D, y / o el aminoácido B5 se selecciona entre el grupo que consiste en Q y

S, y / o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste en S, D, L, y R, y / o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste en I, V, E, y K;

5 (iii) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos C1-C9, en el que alquilo C1-C9 es QQGNSLPNT (Id. de Sec. N^o: 3) o una variante del Id. de Sec. N^o: 3, en donde el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste de N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, e Y;

10 (iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos D1-D10 en el que D1-D10 es GFFITNNYWG (Id. de Sec. N^o: 4);

15 (v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos E1-E17 en el que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (Id. de Sec. N^o: 5), o una variante del Id. de Sec. N^o: 5, en donde el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste en Y, F, V, y D, y / o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste en S y G, y / o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste en S e Y, y / o el aminoácido E12 se selecciona entre el grupo que consiste en N, T, A, y D, y / o el aminoácido 13 se selecciona del grupo que consiste de P, H, D y A, y / o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste en L y V, y / o el aminoácido 17 se selecciona entre el grupo que consiste en S y G; y

20 (vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos F2-F11 en el que F2-F11 es MTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 6) o RTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 19); o comprende la secuencia de aminoácidos F1-F11, en el que F1-F11 es AMTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 16), ARTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 17), o AQTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 18), o una variante de los Id. de Sec. N^o: 6, 16, 17, 18, o 19 en el que el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S, y / o el aminoácido F11 se selecciona de entre el grupo que consiste en F e Y.

25 En otro aspecto, el anticuerpo comprende además un marco, en el que el aminoácido en la posición marco 71 es R o A, y el aminoácido en la posición marco 73 es N o T, y el aminoácido en la posición marco 78 es F o A o L.

30 En otro aspecto, el anticuerpo comprende además la secuencia marco consenso de una cadena pesada humana subgrupo III que comprende una sustitución en la posición 71, 73 y / o 78.

En un aspecto, la sustitución es R71A, N73T, L78A o L78F.

35 En otro aspecto, una secuencia marco entre las posiciones E1-E1 de la secuencia HVR-H2 y las posiciones F1-F11 de HVR-H3 es HFR3-1-HFR3-31 y en donde HFR3-6 es A o R, HFR3-8 es N o T, y HFR3-13 es L o A o F.

En otro aspecto, la posición marco 71 de la cadena pesada comprende el aminoácido R o A, y / o la posición marco 73 de la cadena pesada comprende T o N, y / o la posición marco 78 de la cadena pesada comprende F o A o L. La secuencia comprende la posición marco 71 de la cadena pesada.

40 En una realización ejemplar, el anticuerpo comprende tres secuencias de la región hipervariable de la cadena pesada (HVR-H1-H3) y tres secuencias de la región hipervariable de la cadena ligera (HVR-L1-L3), en donde:

- 45 (i) HVR-L1 comprende el Id. de Sec. N^o: 7, Id. de Sec. N^o: 8 o Id. de Sec. N^o: 9;
 (ii) HVR-L2 comprende el Id. de Sec. N^o: 2;
 (iii) HVR-L3 comprende el Id. de Sec. N^o: 3;
 (iv) HVR-H1 comprende el Id. de Sec. N^o: 4;
 (v) HVR-H2 comprende el Id. de Sec. N^o: 5; y
 (vi) HVR-H3 comprende el Id. de Sec. N^o: 6 o Id. de Sec. N^o: 16 o Id. de Sec. N^o: 17 o Id. de Sec. N^o: 19.

50 En aún otro aspecto ejemplar, dicho anticuerpo humanizado comprende una región variable de secuencia de la cadena ligera del Id. de Sec. N^o: 24, y una secuencia de la región variable de la cadena pesada del Id. de Sec. N^o: 25.

55 En un aspecto, dicho anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada de Id. de Sec. N^o: 10 e Id. de Sec. N^o: 11, respectivamente.

60 En un aspecto, la especificación describe un método de diseño de un tratamiento con un agente candidato para un paciente humano diagnosticado con un trastorno inflamatorio gastrointestinal, que comprende la determinación de una dosis eficaz para el paciente humano basado en una dosis que aumenta efectivamente la cantidad de un biomarcador en la sangre periférica de un sujeto no humano en respuesta a un tratamiento con dicho agente candidato.

En un aspecto, dicho sujeto no humano es un mono.

65 En otro aspecto, la especificación describe un método para predecir el pronóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal en un paciente que comprende la comparación de una relación entre la cantidad de linfocitos residentes en

el intestino y la cantidad de linfocitos residentes en la periferia en una muestra de sangre de dicho paciente con una relación entre la cantidad de linfocitos residentes en el intestino y la cantidad de linfocitos periféricos en una muestra de sangre de un individuo sano, en el que una disminución en la proporción de dicho paciente en comparación con la del individuo sano es indicativo del pronóstico de la enfermedad.

5 En otro aspecto, la especificación describe un método de identificación de una población de linfocitos que comprenden los linfocitos que expresan la integrina alfaEbeta7 y linfocitos que expresan la integrina alfa4beta7, que comprende unir dichos linfocitos con un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende la secuencia de una región variable de la cadena ligera del Id. de Sec. N^o: 10, y una secuencia de la
10 región variable de la cadena pesada del Id. de Sec. N^o: 11.

En una realización, dichos linfocitos están en la sangre periférica de un paciente diagnosticado con una enfermedad intestinal inflamatoria.

15 En otro aspecto, dichos linfocitos están en los nódulos linfáticos y los tejidos del intestino de un paciente diagnosticado con una enfermedad intestinal inflamatoria linfático.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1 muestra subgrupos de linfocitos CD4⁺ en la sangre periférica de mono cynomolgus.

La figura 2 muestra la media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMab Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

25 La figura 3 muestra la media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} en sangre periférica después de 12 dosis subcutáneas de 15 o 50 mg / kg de rhuMab Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

30 La figura 4 muestra la media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{bajo} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMab Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

35 La figura 5 muestra la media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻beta7^{bajo} en sangre periférica después de 12 dosis subcutáneas de 15 o 50 mg / kg de rhuMab Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

40 La figura 6 muestra la media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{intermedio} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMab Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

45 La figura 7 muestra la media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{intermedio} en sangre periférica después de 12 dosis subcutáneas de 15 o 50 mg / kg de rhuMab Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

La Figura 8 muestra aumento transitorio del recuento en la sangre periférica de linfocitos memoria / efectoras "residentes en intestino" CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} después de la administración de rhuMab Beta7 - 4 dosis semanales IV de 25 mg / kg de rhuMab Beta7 o vehículo (recuentos absolutos,% LB).

50 La figura 9 (A-D) muestra la concentración en suero de rhuMab Beta7 (microgramos / microlitro) y la ocupación de los receptores β 7 en linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} de sangre periférica.

55 La figura 10 (A-D) muestra que el aumento transitorio en linfocitos memoria / efectoras "residentes en intestino" CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} en sangre periférica se correlaciona con la ocupación de los receptores β 7 en linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto}.

La Figura 11 muestra que rhuMab Beta7 inhibe la residencia in vivo de los linfocitos en el colon inflamado pero no en el bazo de ratones SCID CD45RB^{alto} reconstituido (modelo de colitis del ratón).

60 La figura 12A y 12B muestra la alineación de secuencias de las cadenas variables ligeras y pesadas para lo siguiente: secuencia consenso del subgrupo kappa I de la cadena ligera humana (Figura 12A, Id. de Sec. N^o: 12), secuencia consenso del subgrupo III de la cadena pesada humana (figura 12B, Id. de Sec. N^o: 13), región variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (figura 12A, Id. de Sec. N^o: 10), región variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (figura 12B, Id. de Sec. N^o: 11), y
65 variantes de anticuerpos humanizados: región variable de la cadena ligera humanizada hu504Kgraft (figura 12A, Id. de Sec. N^o: 14), región variable de la cadena pesada humanizada hu504Kgraft (figura 12B, Id. de Sec. N^o: 15), las

variantes hu504-5, hu504-16, y hu504-32 (las variaciones de aminoácidos de hu504Kgraft humanizado se indican en la figura 12A.) (cadena ligera) (Id. de Sec. N^o: 22-24, respectivamente, en orden de aparición) y la fig. 12B (cadena pesada) para las variantes hu504-5, hu504-16, y hu504-32 (Id. de Sec. N^o: 25).

- 5 La figura 13 muestra linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} (recuentos absolutos,% LB) en mono cynomolgus después de 12 dosis intravenosas o subcutáneas de vehículo.
- La figura 14 muestra linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} (recuentos absolutos,% LB) en mono cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 5 mg / kg de rhuMAb Beta7.
- 10 La figura 15 muestra linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} (recuentos absolutos,% LB) en mono cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 15 mg / kg de rhuMAb Beta7.
- La figura 16 muestra linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} (recuentos absolutos,% LB) en mono cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 50 mg / kg de rhuMAb Beta7.
- 15 La figura 17 muestra linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} (recuentos absolutos,% LB) en mono cynomolgus después de 12 dosis subcutáneas de 15 mg / kg de rhuMAb Beta7.
- 20 La figura 18 muestra linfocitos memoria / efectoras CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} (recuentos absolutos,% LB) en mono cynomolgus después de 12 dosis subcutáneas de 50 mg / kg de rhuMAb Beta7.
- La figura 19 muestra linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} en mono cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo ± DE); MOEF = moléculas de equivalente de fluorescencia.
- 25 La figura 20 muestra linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} en mono cynomolgus después de 12 dosis subcutáneas de 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo ± DE) = MOEF moléculas de equivalente de fluorescencia.
- 30 La figura 21 muestra linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{intermedio} en mono cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo ± DE); MOEF = moléculas de equivalente de fluorescencia.
- 35 La figura 22 muestra linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{intermedio} en monos cynomolgus después de 12 dosis subcutáneas de 15 o 50 mg / kg o 12 rhuMAb Beta7 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo ± DE); MOEF = moléculas de equivalente de fluorescencia.
- La figura 23 muestra la media (± DE) de las concentraciones séricas de rhuMAb β7 tras cuatro dosis semanales en bolo IV de 5 o 25 mg / kg de rhuMAb β7 en monos cynomolgus.
- 40 La figura 24 muestra la media real (± DE) de concentraciones en suero de 4 animales de recuperación y las concentraciones séricas pronosticados por el modelo de rhuMAb β7 tras cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg / kg de rhuMAb β7 en monos cynomolgus.
- 45 La figura 25 muestra los subgrupos de células T CD4 en sangre periférica de mono cynomolgus.
- La figura 26 muestra la media (± DE) de recuentos absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} en sangre periférica (expresadas como porcentaje de la línea basal antes de la dosis) después de cuatro dosis semanales de bolo IV de vehículos o 5 o 25 mg / kg de rhuMAb β7 en monos cynomolgus.
- 50 La figura 27 muestra la media (± DE) de recuentos absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{intermedio} en sangre periférica (expresadas como porcentaje de la línea basal antes de la dosis) después de cuatro dosis semanales en bolo IV de vehículos o 5 o 25 mg / kg de rhuMAb β7 en monos cynomolgus.
- 55 La figura 28 muestra recuentos individuales absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ beta7^{alto} en sangre periférica (expresados como porcentaje de la línea basal antes de la dosis) después de cuatro dosis semanales en bolo IV del vehículo o 25 mg / kg de rhuMAb β7 en monos cynomolgus.
- 60 La figura 29 muestra la media (± DE) de recuentos absolutos de linfocitos en sangre periférica (expresado como porcentaje de la línea basal antes de la dosis) después de cuatro dosis semanales en bolo IV de vehículos, 5 o 25 mg / kg de rhuMAb β7 en monos cynomolgus.
- 65 La figura 30 muestra la media (± DE) de recuentos absolutos de células T CD3⁺ en sangre periférica (expresado como porcentaje de la línea basal antes de la dosis) después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β7 a cada grupo de monos cynomolgus.

La figura 31 muestra la media (\pm DE) de recuentos absolutos de células B CD20⁺ en sangre periférica (expresado como porcentaje de la línea basal antes de la dosis) después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a cada grupo de monos cynomolgus.

5 La figura 32A muestra la relación entre concentraciones en suero de rhuMAb β 7 y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 23).

10 La figura 32B muestra la relación entre concentraciones en suero de rhuMAb β 7 y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 24).

15 La figura 32C muestra la relación entre concentraciones en suero de rhuMAb β 7 y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 25).

20 La figura 32D muestra la relación entre concentraciones en suero de rhuMAb β 7 y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 26).

25 La figura 33 muestra la relación entre concentraciones en suero de rhuMAb β 7 y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7.

La figura 34A muestra la relación entre células T CD4⁺ de memoria/efectoras absolutas (CD45RA⁻) que expresan β 7^{alto} y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 23).

30 La figura 34B muestra la relación entre células T CD4⁺ de memoria/efectoras absolutas (CD45RA⁻) que expresan β 7^{alto} y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 24).

35 La figura 34C muestra la relación entre células T CD4⁺ de memoria/efectoras absolutas (CD45RA⁻) que expresan β 7^{alto} y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 25).

40 La figura 34D muestra la relación entre células T CD4⁺ de memoria/efectoras absolutas (CD45RA⁻) que expresan β 7^{alto} y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} no ocupadas en sangre periférica a lo largo del tiempo en monos cynomolgus después de cuatro dosis semanales en bolo IV de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 (Animal 26).

La figura 35 muestra la media de recuentos absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} en sangre periférica.

45 La figura 36 muestra la media de recuentos absolutos de células T CD8⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} en sangre periférica.

La figura 37 muestra la media de recuentos absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{intermedio} en sangre periférica.

La figura 38 muestra la media de recuentos absolutos de células T CD8⁺ CD45RA⁻ β 7^{intermedio} en sangre periférica.

50 La figura 39 muestra la relación entre las concentraciones en suero de rhuMAb β 7 y células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} que expresan β 7 disponibles en sangre periférica.

55 La figura 40 muestra la relación entre serum concentrations of rhuMAb β 7 y células T CD8⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} que expresan β 7 disponibles en sangre periférica.

Descripción detallada de la realización preferida

I. Definiciones

60 Tal como se usa en el presente documento, con respecto a la respuesta del paciente o la capacidad de respuesta del paciente, el término "predicción" o "predecir" se utiliza aquí para referirse a la probabilidad de que un paciente responda favorable o desfavorablemente a un fármaco o conjunto de fármacos. En un aspecto, la predicción se refiere a la medida de esas respuestas. En un aspecto, la predicción se refiere a la probabilidad de que un paciente va a sobrevivir o mejorar después del tratamiento, por ejemplo el tratamiento con un agente terapéutico particular, por ejemplo el anticuerpo integrina anti- β 7, y por un cierto período de tiempo sin recurrencia de la enfermedad. Por ejemplo, los métodos de predicción descritos pueden usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento

5 escogiendo las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos de predicción descritos son herramientas valiosas para predecir si un paciente es probable que responda favorablemente a un régimen de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración de un agente o combinación terapéutica dada, la intervención quirúrgica, tratamiento con esteroides, etc., o si la supervivencia a largo plazo del paciente, después de un régimen terapéutico es probable.

10 "Tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula a tratar, y se puede realizar ya sea para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de síntomas, disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión o la mejora de pronóstico.

15 "Régimen de tratamiento" se refiere a una combinación de dosis, frecuencia de administración, o la duración del tratamiento, con o sin adición de un segundo medicamento.

"Régimen de tratamiento eficaz" se refiere a un régimen de tratamiento que ofrecerá respuesta beneficiosa a un paciente que recibe el tratamiento.

20 "Modificación de un tratamiento" se refiere a los cambios en el régimen de tratamiento incluyendo, cambio de dosis, frecuencia de administración, o la duración del tratamiento, y / o adición de un segundo medicamento.

25 La "respuesta del paciente" o "capacidad de respuesta del paciente" puede evaluarse usando cualquier criterio que indique un beneficio al paciente, incluyendo, sin limitación, (1) inhibición, en cierta medida, de la progresión de la enfermedad, incluyendo ralentización y detención completa; (2) reducción en el número de episodios y / o síntomas de la enfermedad; (3) reducción en el tamaño de la lesión; (4) inhibición de la enfermedad (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la infiltración de células en órganos y / o tejidos periféricos adyacentes; (5) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la propagación de la enfermedad; (6) disminución de la respuesta autoinmune, que puede, pero no tiene por qué, provocar la regresión o la ablación de la lesión de la enfermedad; (7) alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; (8) aumento del tiempo de la presentación libre de enfermedad después del tratamiento; y / o (9) disminución de la mortalidad en un punto determinado de tiempo tras el tratamiento. El término "respuesta" se refiere a una respuesta medible, incluyendo la respuesta completa (RC) y la respuesta parcial (RP).

35 Por "respuesta completa" o "RC" se refiere a la desaparición de todos los signos de inflamación o la remisión en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que la enfermedad se ha curado.

Por "respuesta parcial" o "RP" se refiere a una disminución de al menos el 50% en la severidad de la inflamación, en respuesta al tratamiento.

40 Una "respuesta beneficiosa" de un paciente al tratamiento con un antagonista de integrina beta7 y una redacción similar se refiere al beneficio clínico o terapéutico recibido por un paciente en riesgo de o que sufre de un trastorno inflamatorio gastrointestinal como resultado del tratamiento con el antagonista, tal como un anticuerpo anti-integrina beta7. Tal beneficio incluye respuestas celulares o biológicas, una respuesta completa, respuesta parcial, una enfermedad estable (sin progresión o recidiva), o una respuesta con una recaída posterior del paciente o como resultado del tratamiento con el antagonista.

"Un paciente mantiene la capacidad de respuesta a un tratamiento" cuando la capacidad de respuesta del paciente no disminuye con el tiempo durante el curso de un tratamiento.

50 El término "diagnóstico" se utiliza aquí para referirse a la identificación o clasificación de un estado, enfermedad o condición molecular o patológica. Por ejemplo, "diagnóstico" puede referirse a la identificación de un tipo particular de trastorno inflamatorio gastrointestinal, y más particularmente, la clasificación de un subtipo particular de trastorno inflamatorio gastrointestinal, por la implicación de tejido / órgano (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino), o por otras características (por ejemplo, una subpoblación de pacientes que se caracteriza por la capacidad de respuesta a un tratamiento, tal como a un tratamiento con un antagonista de la integrina beta7).

55 El término "pronóstico" se utiliza aquí para referirse a la predicción de la probabilidad de síntomas de la enfermedad, incluyendo, por ejemplo, la recurrencia, reaparición, y resistencia a los medicamentos, de un trastorno inflamatorio gastrointestinal.

60 El término "muestra", como se usa aquí, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad molecular y / o celular que se va a caracterizar y / o identificar, por ejemplo en base a características físicas, bioquímicas, químicas y / o fisiológicas. Por ejemplo, la frase "muestra de la enfermedad" y variaciones de la misma se refiere a cualquier muestra obtenida de un sujeto de interés que se espera o se sabe que contiene la entidad celular y / o molecular que va a ser caracterizada. La muestra puede obtenerse a partir de un tejido del sujeto de interés o de la sangre periférica del sujeto.

"Un antagonista de la integrina beta7" o "antagonista de beta7" se refiere a cualquier molécula que inhibe una o más actividades biológicas o bloquea la unión de la integrina beta7 con una o más de sus moléculas asociadas. Los antagonistas de la invención se pueden utilizar para modular uno o más aspectos de los efectos asociados a beta7, incluyendo pero sin limitarse a la asociación con la subunidad de integrina alfa 4, la asociación con la subunidad de integrina alfaE, la unión de la integrina alfa4beta7 a MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina y la unión de la integrina alfaEbeta7 a E-cadherina. Estos efectos se pueden modular mediante cualquier mecanismo biológicamente relevante, incluyendo la interrupción de la unión del ligando a la subunidad beta7 o a la integrina dimérica alfa4beta7 o alfaEbeta, y / o mediante la interrupción de la asociación entre las subunidades alfa y beta de la integrina de tal manera que se inhibe la formación de la integrina dimérica. En un aspecto, el antagonista beta7 es un anticuerpo anti-integrina beta7 (o anticuerpo anti-beta7). En una realización, el anticuerpo anti-integrina beta7 es un anticuerpo anti-integrina beta7 humanizado y más particularmente un anticuerpo recombinante humanizado monoclonal anti-beta7 (o rhuMAb beta7). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-beta7 de la presente invención son anticuerpos antagonistas anti-integrina beta7 que inhiben o bloquean la unión de la subunidad beta7 con la subunidad de integrina alfa 4, la asociación con la subunidad de integrina alfaE, la unión de la integrina alfa4beta7 a MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina y la unión de la integrina alfaEbeta7 a E-cadherina.

Por "subunidad beta7" o "subunidad $\beta 7$ " se entiende la subunidad humana de la integrina $\beta 7$ (Erle et al., (1991) J. Biol. Chem. 266: 11009 a 11016). La subunidad beta7 se asocia de con la subunidad de integrina alfa 4, tal como la subunidad alfa4 humana (Kilger y Holzmann (1995) J. Mol. Biol. 73: 347-354). Al parecer, la integrina alfa4beta7 se expresa en una mayoría de linfocitos maduros, así como una pequeña población de timocitos, células de médula ósea y mastocitos. (Kilshaw y Murant (1991) Eur. J. Immunol. 21: 2591-2597; Gurish et al., (1992) 149: 1964-1972; y Shaw, S.K. y Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7: 335). La subunidad beta7 también se asocia con la subunidad alfaE, tal como la subunidad alfaE de la integrina humana (Cepek, K. L., et al. (1993) J. Immunol. 150: 3459). La integrina alfaEbeta7 se expresa en los linfocitos epiteliales intraintraintestinales (IEL) (Cepek, K.L. (1993) supra).

Por "subunidad alfaE" o "subunidad de integrina alfaE" o "subunidad alfaE" o "subunidad alfaE de integrina" o "CD103" se entiende una subunidad de la integrina que se encuentra asociada con la integrina beta7 en linfocitos intraepiteliales, que la integrina alfaEbeta7 media la unión de los IEL al epitelio intestinal que expresa e-cadherina (Cepek, K.L. et al (1993) J. Immunol. 150: 3459; Shaw, S.K. y Brenner, M.B. (1995) Semin Immunol. 7: 335).

"MAdCAM" o "MAdCAM-1" se usan indistintamente en el contexto de la presente invención y se refieren a la molécula de adhesión celular-1 adhesina de proteínas de la mucosa, que es un polipéptido de cadena sencilla que comprende una cola citoplásmica corta, una región transmembrana y una secuencia extracelular compuesta de tres dominios de tipo inmunoglobulina. El DNAC de MAdCAM-1 murino, humanos y de macaco ha sido clonado (Briskin, et al., (1993) Nature, 363: 461-464; Shyjan et al., (1996) J. Immunol. 156: 2851 a 2857).

"VCAM-1" o "molécula de adhesión celular vascular-1" o "CD106" se refiere a un ligando de alfa4beta7 y alfa4beta1, expresada en el endotelio activado e importante en las interacciones de leucocitos del endotelio tales como la unión y trans migración de leucocitos durante la inflamación.

"CD45" se refiere a una proteína de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Las PTP se sabe que son moléculas de señalización que regulan una variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, ciclo mitótico, y la transformación oncogénica. Esta PTP contiene un dominio extracelular, un solo segmento transmembrana y dos dominios catalíticos en tándem intracitoplasmáticos, y por lo tanto pertenece al receptor de tipo PTP. Este gen se expresa específicamente en las células hematopoyéticas. Este PTP ha demostrado ser un regulador esencial de la señalización del receptor de antígeno de células B y T. Funciona a través de la interacción directa con los componentes de los complejos de receptor de antígeno, o mediante la activación de varias quinasas de la familia Src necesarias para la señalización del receptor de antígeno. Este PTP también suprime las quinasas JAK, y por lo tanto funciona como un regulador de la señalización del receptor de citoquinas. Se han descrito cuatro variantes de corte y empalme alternativo de transcripciones de este gen, que codifican isoformas distintas. (Tchilian E.Z., Beverley P.C. (2002) "CD45 in memory and disease" Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 50 (2): 85-93. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, et al., (2004) "Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation." Leuk. Lymphoma 44 (9): 1477-1481.

Existen varias isoformas de CD45: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R (ABC). CD45 también está altamente glicosilado. CD45R es la proteína más larga y migra a 200 kDa cuando se aísla a partir de células T. Las células B también expresan CD45R con glicosilación más pesada, con lo que el peso molecular de 220 kDa, de ahí el nombre B220; isoforma de células B de 220 kDa. La expresión de B220 no se limita a las células B y también puede expresarse en células T activadas, en un subconjunto de células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. Stanton T, Boxall S, Bennett A, et al. (2004). CD45 variant alleles: possibly increased frequency of a novel exon 4 CD45 polymorphism in HIV seropositive Ugandans." Immunogenetics 56 (2): 107-10.

Los "linfocitos residentes en intestino" se refieren a un subgrupo de los linfocitos que tienen la característica de residir selectivamente en los ganglios linfáticos y tejidos intestinales pero no en los ganglios linfáticos y tejidos periféricos. Este subgrupo de linfocitos se caracteriza por un patrón de expresión única de una combinación de múltiples moléculas de superficie celular, incluyendo, pero sin limitarse a, la combinación de CD4, CD45RA y Beta7.

5 Típicamente, al menos dos subgrupos de linfocitos CD4⁺ de sangre periférica pueden subdividirse en base a los marcadores de CD45RA y Beta7, las células CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto}, y CD4⁺ CD45RA⁻β7^{bajo}. Las células CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} residen preferentemente en los ganglios linfáticos y tejidos intestinales, mientras que las células CD4⁺ CD45RA⁻β7^{bajo} residen preferentemente en los ganglios linfáticos y tejidos periféricos (Rott et al. 1996; Rott et al. 1997;. Williams et al. 1998;. Rose et al. 1998;. Williams y Butcher 1997; Butcher et al. 1999). Los linfocitos residentes en intestino son, por tanto, un subgrupo distintivo de linfocitos identificados como células CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en un ensayo de citometría de flujo. Los métodos de identificación de este grupo de linfocitos son bien conocidos en la técnica y también descritos en detalle en los Ejemplos de la presente solicitud.

15 Tal como se utiliza aquí con respecto a un marcador de superficie celular, el símbolo "+" indica una expresión positiva de un marcador de superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos CD4⁺ son un grupo de linfocitos que tienen CD4 expresada sobre sus superficies celulares.

20 Tal como se utiliza aquí con respecto a un marcador de superficie celular, el símbolo "-" indica una expresión negativa de un marcador de superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos CD45RA⁻ son un grupo de linfocitos que no tienen CD45RA expresada en sus superficies celulares.

25 Tal como se utiliza aquí con respecto a la expresión de un marcador de superficie celular, el símbolo "bajo" indica un nivel relativamente bajo de expresión de un marcador de superficie celular en los linfocitos, mientras que "alto" indica un nivel relativamente alto de expresión de una marcador de superficie celular en los linfocitos. En una citometría de flujo, la intensidad de β7^{alto} es al menos aproximadamente 10 o 100 veces mayor que la de β7^{bajo}. Por lo tanto, según lo previsto en el presente documento en realizaciones ejemplares, los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻β7^{bajo} y CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto}, se localizan en porciones distintas de una trama de puntos o histograma de una citometría de flujo, donde el eje X es la intensidad de la expresión de CD45AR y el eje Y es la intensidad de la expresión de Beta7.

30 Los "linfocitos residentes en la periferia" se refieren a un subgrupo de los linfocitos que tienen la característica de residir en los ganglios linfáticos y tejidos periféricos y no residen en los ganglios linfáticos y tejidos intestinales. En una realización ejemplar, como se explicó anteriormente, los linfocitos residentes en la periferia son un grupo distintivo de linfocitos identificados como células CD4⁺ CD45RA⁻β7^{bajo} en un ensayo de citometría de flujo. Los métodos de identificación de este grupo de linfocitos son conocidos en la técnica y se describen en detalle en la presente solicitud.

35 Una "cantidad" o "nivel" de biomarcador puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en realizaciones ejemplares, la "cantidad" o "nivel" de los linfocitos residentes en el intestino, que se asocia con la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con antagonista de integrina beta7 es un nivel detectable en una muestra biológica, preferiblemente en una muestra de sangre periférica. La cantidad de linfocitos residentes en el intestino se puede cuantificar por métodos conocidos por el experto en la técnica y descritos por esta invención, tales como análisis de citometría de flujo.

45 En algunas realizaciones, una cantidad "elevada" o "aumentada" del nivel de un marcador biológico, es decir, en comparación con una cantidad de referencia / comparador del biomarcador. El aumento es preferiblemente mayor que aproximadamente el 10%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 30%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 100%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 300% como una función del valor de la cantidad de referencia o comparador. Por ejemplo, una cantidad de referencia o comparador puede ser la cantidad de un biomarcador antes del tratamiento y, más particularmente, puede ser la cantidad de línea basal o pre-dosis.

55 Por ejemplo, en una realización, una "cantidad" o "nivel" de linfocitos residentes en el intestino denota un aumento suficiente en el número de linfocitos tales que un experto en la técnica consideraría el aumento de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores. El aumento es preferiblemente mayor que aproximadamente el 10%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 30%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 100%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 300% como una función del valor de la cantidad de referencia / comparador de linfocitos.

60 En algunas realizaciones, una "disminución" de la cantidad o nivel de un biomarcador, es en comparación con una cantidad de referencia / comparador del biomarcador. La disminución es preferiblemente menor que aproximadamente el 10%, preferiblemente menor que aproximadamente el 30%, preferiblemente menor que aproximadamente el 50%, preferiblemente menor que aproximadamente el 100%, preferiblemente menor que aproximadamente el 300% como una función del valor de la cantidad de referencia o comparador. Por ejemplo, una cantidad de referencia o comparador puede ser la cantidad de un biomarcador antes del tratamiento y, más particularmente, puede ser la cantidad de línea basal o pre-dosis.

65

Por ejemplo, un "tratamiento que aumenta efectivamente la cantidad de los linfocitos residentes en el intestino" se refiere a un tratamiento que aumenta suficientemente en el número de linfocitos de tal manera que un experto en la técnica consideraría el aumento de significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores. El aumento es preferiblemente mayor que aproximadamente el 10%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 30%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 100%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 300% como una función del valor de la cantidad de referencia / comparador de linfocitos antes del tratamiento.

La frase "no cambia sustancialmente" tal como se usa aquí, denota un grado insignificante de cambios de tal manera que un experto en la técnica no considera que el cambio sea de significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, la cantidad de linfocitos). El cambio es preferiblemente menor que aproximadamente el 10%, preferiblemente menor que aproximadamente el 5%, preferiblemente menor que aproximadamente el 1%.

Los "trastornos inflamatorios gastrointestinales" son un grupo de trastornos crónicos que causan inflamación y / o ulceración en la membrana mucosa. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y la colitis infecciosa), mucositis (por ejemplo, la mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y la esofagitis. En una realización preferida, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria del intestino.

La "Enfermedad Inflamatoria del Intestino" o "EII" se usa indistintamente en el presente documento para referirse a las enfermedades del intestino que causan inflamación y / o ulceración e incluye sin limitación la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

La "enfermedad de Crohn (EC)" o "colitis ulcerosa (CU)" son enfermedades intestinales inflamatorias crónicas de etiología desconocida. La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa, puede afectar cualquier parte del intestino. La característica más prominente de la enfermedad de Crohn es el engrosamiento granular, edematoso de color rojizo-púrpura de la pared intestinal. Con el desarrollo de la inflamación, estos granulomas a menudo pierden sus bordes y se integran con el tejido circundante. La diarrea y la obstrucción del intestino son las características clínicas predominantes. Como en la colitis ulcerosa, el curso de la enfermedad de Crohn puede ser continuo o recurrente, leve o grave, pero a diferencia de la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn no es curable por resección del segmento afectado del intestino. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Crohn requieren cirugía en algún momento, pero la posterior recaída es común y el tratamiento médico continuo es habitual.

La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo desde la boca hasta el ano, aunque normalmente aparece en las regiones ileocólicas, del intestino delgado o colon-anorrectales. Histopatológicamente, la enfermedad se manifiesta por granulomas discontinuos, abscesos de las criptas, fisuras y úlceras aftosas. El infiltrado inflamatorio está mezclado, y consta de linfocitos (tanto células T y B), células plasmáticas, macrófagos y neutrófilos. Hay un aumento desproporcionado de células plasmáticas macrófagos y neutrófilos secretoras de IgM e IgG.

Los medicamentos antiinflamatorios sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) son útiles para tratar ligeramente la enfermedad de Crohn activa del colon y se prescriben comúnmente para mantener la remisión de la enfermedad. Metroidazol y ciprofloxacina son similares en eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente útiles para tratar la enfermedad perianal. En casos más severos, los corticosteroides son eficaces para tratar las exacerbaciones activas e incluso pueden mantener la remisión. La azatioprina y la 6-mercaptopurina también han demostrado éxito en pacientes que requieren la administración crónica de corticoesteroides. También es posible que estos medicamentos puedan desempeñar un papel en la profilaxis a largo plazo. Desafortunadamente, no puede haber un retardo muy largo (hasta seis meses) antes de inicio de la acción en algunos pacientes. Los fármacos antidiarreicos también pueden proporcionar alivio sintomático en algunos pacientes. La terapia nutricional o dieta elemental pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes y favorecer una mejoría sintomática de la enfermedad aguda, pero no inducir remisiones clínicas sostenidas. Los antibióticos se utilizan en el tratamiento de sobrecrecimiento bacteriano secundario en intestino delgado y el tratamiento de las complicaciones piogénicas.

"La colitis ulcerosa (CU)" afecta el intestino grueso. El curso de la enfermedad puede ser continuo o recurrente, leve o grave. La lesión más temprana es una infiltración inflamatoria con formación de abscesos en la base de las criptas de Lieberkuhn. La coalescencia de estas criptas distendidas y rotura tiende a separar la mucosa suprayacente de su suministro de sangre, lo que conduce a la ulceración. Los síntomas de la enfermedad incluyen calambres, dolor abdominal bajo, sangrado rectal, y las descargas frecuentes y sueltas que consisten principalmente en sangre, pus y mucosidad con partículas fecales escasas. Una colectomía total puede ser necesaria para la colitis ulcerosa continua aguda, grave o crónica,.

Las características clínicas de la CU son muy variables, y el inicio puede ser insidioso o abrupto, y pueden incluir diarrea, tenesmo y sangrado rectal recurrente. Con participación fulminante de todo el colon, puede aparecer

megacolon tóxico, una emergencia que pone la vida en peligro. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, pioderma gangrenoso, uveítis, y eritema nudoso.

El tratamiento de la CU incluye sulfasalazina y los fármacos que contengan salicilato relacionados sobre los casos leves y medicamentos corticosteroides en casos severos. La administración tópica de cualquiera de los salicilatos o corticoides es a veces eficaz, sobre todo cuando la enfermedad se limita al intestino distal, y se asocia con una disminución de efectos secundarios en comparación con el uso sistémico. Las medidas de apoyo, como la administración de agentes de hierro y antidiarreicos se indican a veces. La azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato a veces también se prescriben para su uso en los casos dependientes de corticosteroides refractarios.

Una "dosis eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" se refiere a un solo animal, más preferiblemente un mamífero (incluyendo a los animales no humanos tales como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas, y primates no humanos) para los que se desea el tratamiento. Más preferiblemente, el paciente en el presente documento es un humano.

El término "sujeto no humano" se refiere a un solo animal no humano, más preferiblemente un mamífero (incluyendo tales animales no humanos como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos).

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, de longitud completa o anticuerpos monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe en mayor detalle en este documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y / o madurado por afinidad.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, donde la porción retiene preferiblemente al menos una, preferiblemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con la parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y así retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, de modulación de la vida media del anticuerpo, la función CCDA y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de tal anticuerpo puede comprender el brazo de unión a antígeno ligado a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

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

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y / o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular correspondiente o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 a 6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, la región marco (FR) de residuos de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles

hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en ellos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un humano y / o se ha realizado utilizando cualquiera de las técnicas para hacer anticuerpos humanos como se describe aquí. Estas técnicas incluyen la selección de bibliotecas de cribaje combinatorias derivadas de humanos, tales como bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) y Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133 - 4137 (1991)); usando líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp 55 -93 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987), y Boerner et al., *J. Immunol.* 147: 86 (1991)); y la generación de anticuerpos monoclonales en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90 : 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)). Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno de un animal no humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y / o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando tinción azul de Coomassie, o preferiblemente con tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

El término "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se usa aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y / o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). Un número de delineaciones de la región hipervariable están en uso y se incluyen en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencias y son los más utilizados (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales Chothia, y son utilizados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-h35b (numeración de Kabat)
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Numeración Chothia)
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H93	H101-H101

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

Los residuos "marco" o residuos "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí.

Un "marco consenso humano" es un marco que representa el residuo de aminoácido que ocurre más frecuentemente en una selección de secuencias marco de inmunoglobulina humana VL o VH. Generalmente, la selección de secuencias de inmunoglobulina humana VL o VH es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. En una realización, para la VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al. En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee la(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos CDR y / o marco se describe en: Barbas et al. *Proc. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1996); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); y Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente la misma", como se usa aquí, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia / comparador) de tal manera que un experto en la técnica considerará la diferencia entre los dos valores a tener poca o ninguna actividad biológica y / o relevancia estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente menor que aproximadamente el 50%, preferiblemente menor que aproximadamente el 40%, preferiblemente que aproximadamente el 30%, preferiblemente que aproximadamente el 20%, preferiblemente que aproximadamente el 10% en función del valor de anticuerpo de referencia / comparador.

"La afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una relación de interacción 1: 1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente más rápido al antígeno y tienden a permanecer unidos más tiempo. Una variedad de métodos de medición de la afinidad de unión son conocidos en la técnica, cualquiera de los cuales puede ser usado para los propósitos de la presente invención.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada una cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab)_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de unir el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y el sitio de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab₂ difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en la que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4^a ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en este documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo desnudo" para los propósitos del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o radiomarcador.

El término "región Fc" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y variantes de regiones Fc. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define generalmente por comprender a partir de un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al carboxilo-terminal de la misma. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o por ingeniería recombinante de ácidos nucleicos que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender las poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpo sin residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

A menos que se indique lo contrario, en el presente documento la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), que se incorpora expresamente en este documento por referencia. El "índice de la UE como en Kabat" se refiere a la numeración UE de residuos del anticuerpo IgG1 humano.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren la región Fc para combinarse con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden analizarse usando diversos ensayos como por ejemplo, los descritos en el presente documento.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de secuencia nativa de IgG1 humana (alotipos no A y A); región Fc de secuencia nativa IgG2 humana; región Fc de secuencia nativa IgG3 humana; y la región Fc de secuencia nativa de IgG4 humana, así como variantes naturales de las mismas.

Una "variante de región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de la modificación de al menos un aminoácido, preferiblemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, la variante de región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o para la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa

o en la región Fc del polipéptido parental. La variante de la región Fc en este documento poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y / o con una región Fc de un polipéptido parental, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de homología con la misma, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% de homología con los mismos.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2. Los dominios constantes de cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "CCDA" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos a una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la CCDA, las células NK, expresan de Fc γ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad CCDA de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo CCDA in vitro, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad CCDA de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USa)* 95: 652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora CCDA. Ejemplos de leucocitos humanos que median CCDA incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo preferidas las CMSP y las células NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de la misma, por ejemplo, de la sangre o CMSP como se describe en el presente documento.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la revisión M. en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)), y regula la homeostasis de inmunoglobulinas. Los anticuerpos con la mejora de la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), y el aumento de la vida media, se describen en el documento WO00 / 42072 (Presta, L.) y US2005 / 0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ellos que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434 (numeración de residuos Eu). La variante preferida de anticuerpo que comprende la región Fc con unión a FcRn mejorado comprende las sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc del mismo (numeración de residuos Eu).

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv ver Plückerthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv de los anticuerpos HER2 se describen en el documento WO93 / 16185; Patente de EE.UU. N° 5.571.894; y la Patente de EE.UU. N° 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los

dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, PE 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993).

5 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee la(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. Bio / Technology 10: 779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y / o marco se describe en: Barbas et al. Proc. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169: 147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154 (7): 3310-9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

15 Un anticuerpo con "variante de secuencia de aminoácidos" en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere del anticuerpo principal de la especie. Normalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70% de homología con el anticuerpo principal de la especie, y preferiblemente, serán al menos aproximadamente un 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% homólogos con el anticuerpo principal de la especie. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y / o adiciones en ciertas posiciones dentro de o adyacente a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo principal de la especie. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, variante de anticuerpo desamidada), una variante básica, un anticuerpo con una extensión del líder amino-terminal (por ejemplo, VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo con un residuo de lisina en C-terminal en una o dos cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye combinaciones de las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y / o ligeras. La variante de anticuerpo de interés particular en el presente documento es el anticuerpo que comprende una extensión del líder en amino terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo, que comprende opcionalmente además otra diferencia en la secuencia de aminoácidos y / o de glicosilación en relación con el anticuerpo principal de la especie.

20 Un anticuerpo con "variante de glicosilación" en el presente documento es un anticuerpo con una o más porciones de hidratos de carbono unidos al mismo que difieren en una o más porciones de hidratos de carbono unidos a un anticuerpo principal de la especie. Ejemplos de variantes de glicosilación en el presente documento incluyen anticuerpos con una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unido a una región Fc de los mismos, un anticuerpo con una o dos porciones de hidratos de carbono unidas a una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo sin hidratos de carbono unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de alteraciones de glicosilación. Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacárido puede estar unida a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el residuo 299 (298, numeración de residuos de Eu).

30 El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y / o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y / o variantes de los mismos.

35 El término "citoquina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimuladora del folículo (FSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral- α y - β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento I y -II similar a la insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimuladores de colonias (CSF) como el CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de macrófagos granulocitos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral como el TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza aquí, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

65 El término "agente inmunosupresor" como se utiliza aquí para la terapia adyuvante se refiere a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunológico del sujeto que está siendo tratado en el presente

documento. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan negativamente o suprimen la expresión de auto-antígenos, o enmascaran los antígenos MHC. Ejemplos de tales agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5- sustituidas (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.665.077); Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); ganciclovir; tacrolimus; glucocorticoides como el cortisol y aldosterona; agentes antiinflamatorios tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa; un inhibidor de la 5-lipoxigenasa; o un antagonista del receptor de leucotrienos; antagonistas de purinas, como azatioprina o micofenolato mofetil (MMF); agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina; 6 mercaptopurina; esteroides como corticosteroides o glucocorticoides o análogos de glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluyendo SOLU-MEDROL®, succinato sódico de metilprednisolona y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como el metotrexato (oral o subcutáneo); agentes contra la malaria, como la cloroquina e hidroxicloroquina; sulfasalazina; leflunomida; citocinas o anticuerpos receptores de citocinas o antagonistas que incluyen anticuerpos anti-interferón-alfa, -beta, o -gamma anticuerpos anti-factor de necrosis antitumoral (TNF) alfa (infiximab (REMICADE®) o adalimumab), anticuerpos anti-TNF-alfa inmunoadhesina (etanercept), anticuerpos anti-TNF-beta, anticuerpos anti-interleucina-2 (IL-2) y anticuerpos anti-receptor de IL-2, y anticuerpos y antagonistas anti-receptor de interleucina-6 (IL-6); anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; globulina anti-linfocitos heteróloga; anticuerpos pan-T, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4 / CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (WO 90/08187 publicado 26 de julio 1990); estreptoquinasa; factor de crecimiento desoxispergualina (TGF-beta); estreptodomas; RNA o DNA del huésped; FK506; RS-61443; clorambucilo; desoxispergualina; rapamicina; receptor de células T (Cohen et al., Patente de Estados Unidos N° 5.114.721.); Fragmentos de receptor de células T (Offner et al., Science, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; laneway, Nature, 341: 482 (1989); y WO 91/01133); Antagonistas de BAFF tales como anticuerpos o inmunoadhesinas BAFF o BR3 y antagonistas zTNF4 (para su revisión, véase Mackay y Mackay, Trends Immunol., 23: 113-5 (2002) y también ver la definición más abajo); agentes biológicos que interfieren con las señales colaboradoras de células T, tales como anti-receptor de CD40 o anti-ligando de CD40 (CD154), incluido los anticuerpos de bloqueo para el ligando CD40-CD40 (por ejemplo, Durie et al., Science, 261: 1328-1330 (1993); Mohan et al, J. Immunol, 154: 1470-1480 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck et al., Science, 265: 1225-7 (1994)); y anticuerpos del receptor de células T (PE 340.109) como T10B9.

II. Descripción detallada

A. Antagonistas de integrina beta7

La presente especificación describe métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente para el tratamiento de los antagonistas de la integrina beta7. Ejemplos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con la integrina beta7, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y quiméricos o versiones humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada de la integrina beta7 que reconoce el ligando pero no produce efecto, inhibiendo así competitivamente la acción de la integrina beta7.

Otro potencial antagonista de integrina beta7 es una construcción de RNA o de DNA antisentido preparado utilizando la tecnología antisentido, en la que, por ejemplo, una molécula de RNA o DNA antisentido actúa para bloquear directamente la traducción de RNAm mediante la hibridación al RNAm diana y evitando la traducción de proteínas. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de formación de triple hélice o DNA o RNA antisentido, ambos métodos se basan en la unión de un polinucleótido al DNA o RNA. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia de polinucleótido que codifica la integrina beta7 en el presente documento, se utiliza para diseñar un oligonucleótido de RNA antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de DNA se diseña para ser complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988); Dervan et al., Science, 251: 1360 (1991)), evitando así la transcripción y la producción de la integrina beta7. El oligonucleótido de RNA antisentido hibrida con el RNAm in vivo y bloquea la traducción de la molécula de RNAm en la proteína integrina beta7 (antisentido - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, Fla., 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden entregarse a las células de forma que el RNA o DNA antisentido se puede expresar in vivo para inhibir la producción del polipéptido PRO. Cuando se utiliza DNA antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y 10 posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Otros antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el ligando de unión o sitio de unión a molécula, bloqueando así la actividad biológica normal de la integrina beta7. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, péptidos preferentemente solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de RNA. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia al RNA diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión de ribozima específicos dentro de una diana potencial de RNA pueden ser identificados mediante técnicas conocidas. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT N° WO 97/33551 (publicado el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que promueve la formación de triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación PCT N° WO 97/33551. Estas pequeñas moléculas se pueden identificar mediante cualquiera de los ensayos de cribado discutidos anteriormente y / o por cualquier otra técnica de detección bien conocida por los expertos en la técnica.

Los ensayos de cribado para antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejos con la integrina beta7 codificada por los genes identificados en el presente documento, o interfieren de otra manera con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña.

Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

B. Anticuerpos anti-integrina beta7

En un aspecto, los antagonistas de integrina beta7 son anticuerpos anti-Beta7. Anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecíficos y heteroconjugados, etc., como se describe a continuación.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se generan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde los animales se sangran y se analiza el suero para el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y / o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también se pueden hacer en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como alumbre se usan adecuadamente para mejorar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de DNA recombinante (patente US n° 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma

parentales no fusionadas (también referido como pareja de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las pareja de fusión de células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como los derivados de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE.UU., y SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8 -653 disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Va., EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard descrito en Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980). Una vez las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y / o actividad deseada son identificados, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como tumores ascíticos en un animal por ejemplo, mediante inyección ip de las células en ratones. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El DNA que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede colocarse en vectores de expresión, que luego son transfectedos en células huésped tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de DNA que codifican el anticuerpo incluyen Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992).

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348: 552-554 (1990), Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) por mezcla aleatoria de cadenas (Marks et al., Bio / Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El DNA que codifica el anticuerpo puede modificarse para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de secuencias del dominio constante de la cadena ligera y cadena pesada humana (CH y CL) por las secuencias murinas homólogas (patente U.S. nº 4.816.567; y Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia de codificación de inmunoglobulina con la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptido que no es una inmunoglobulina pueden sustituir los dominios constantes de un anticuerpo, o pueden sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio que tiene especificidad de combinación de antígeno para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

Los anticuerpos anti-Beta7 ejemplares son Fib504, Fib 21, 22, 27, 30 (Tidswell, M. J. Immunol. agosto de 1997 1; 159 (3): 1497-505) o derivados humanizados de los mismos. Los anticuerpos humanizados de Fib504 se describen

en detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 20060093601 (expedida como Patente de EE.UU. Nº 7.528.236), cuyo contenido se incorpora por referencia en su totalidad (véase también la discusión más adelante).

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-integrina beta7 de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, anticuerpos murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Los métodos para anticuerpos no humanos humanizados son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que por lo general se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDR de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser usados en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo es para uso terapéutico humano. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia del dominio V humano que es más cercana a la del roedor se identifica y la región marco humana (FR) dentro de ella aceptada por el anticuerpo humanizado (Sims et al, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método utiliza una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)). Es importante también que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Se contemplan Varias formas de un anticuerpo anti-integrina beta7 humanizada. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agente(s) citotóxico(s) con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Los anticuerpos anti-Beta7 humanizados ejemplares incluyen, pero no se limitan a rhuMAb Beta7, que es un anticuerpo monoclonal humanizado frente a la subunidad $\beta 7$ de la integrina y se deriva del anticuerpo monoclonal FIB504 de rata anti subunidad $\beta 7$ de ratón / humano (Andrew et al., 1994 *J. Immunol.* 1994; 153: 3847-61). Se ha

diseñado para incluir los marcos de de cadena pesada y de cadena ligera $\kappa 1$ de inmunoglobulina humana (Ig)G1 y es producida por células de ovario de hámster chino. Este anticuerpo se une a dos integrinas, $\alpha 4\beta 7$ (Holzmann et al. 1989 Cell, 1989; 56: 37-46; Hu et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 8254-8) y $\alpha E\beta 7$ (Cepek et al., 1993 J. Immunol. 1993; 150: 3459-70), que regulan el tráfico y la retención de los subgrupos de linfocitos en el tracto gastrointestinal y están involucrados en las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), como la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). RhuMAb Beta7 es un potente bloqueador in vitro de la interacción celular entre $\alpha 4\beta 7$ y sus ligandos (molécula de adhesión celular-1 adreína de proteínas de la mucosa [MAdCAM]-1, molécula de adhesión celular vascular [VCAM]-1, y fibronectina), así como la interacción entre $\alpha 4\beta 7$ y su ligando (E-cadherina). RhuMAb Beta7 se une de manera reversible, con alta afinidad similar a $\beta 7$ a los linfocitos de conejos, de monos cynomolgus y de seres humanos. También se une a $\beta 7$ de ratón con alta afinidad. La secuencia de aminoácidos y la fabricación y el uso de rhuMAb Beta7 y sus variantes se describen en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20060093601 (expedida como Patente de EE.UU. N° 7.528.236), cuyo contenido se incorpora en su totalidad.

Las Figs. 12A y 12B representan el alineamiento de secuencias de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras para lo siguiente: secuencia consenso de la cadena ligera humana del subgrupo kappa I (Figura 12A, Id. de Sec. N°: 12), secuencia consenso de la cadena pesada humana del subgrupo III (figura 12B, Id. de Sec. N°: 13), dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (figura 12A, Id. de Sec. N°: 10), dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (figura 12B, Id. de Sec. N°: 11), y variantes de anticuerpos humanizados: dominio variable de la cadena ligera de hu504Kgraft humanizado (figura 12A, Id. de Sec. N°: 14), dominio variable de la cadena pesada de hu504Kgraft humanizado (figura 12B, Id. de Sec. N°: 15), las variantes hu504-5, hu504-16, y hu504-32 (las variaciones de aminoácidos de hu504Kgraft humanizado se indican en la figura 12A) (cadena ligera) (Id. de Sec. N°: 22-24, respectivamente, en orden de aparición) y la fig. 12B (cadena pesada) para las variantes hu504-5, hu504-16, y hu504-32 (Id. de Sec. N°: 25).

4. Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362: 255-258 (1993); Brüggemann et al., Year in Inmuno. 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. n° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); Patente de EE.UU. N° 5.545.807; y WO 97/17852.

Alternativamente, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty et al., Nature 348: 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de DNA monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, revisada en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos de genes V pueden utilizarse para la presentación de fagos. Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) aisló una gama diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una diversidad de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véase, también, la Patente de EE.UU. N° 5.565.332 y 5.573.905.

Como se ha discutido anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante células B activadas in vitro (véanse las Patentes de EE.UU. N° 5.567.610 y 5.229.275).

5. Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias existen ventajas de usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación, y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se producían mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ fragmentos (Carter et al, *Bio / Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra aproximación, los fragmentos F(ab')₂ se puede aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185; Patente de EE.UU. N° 5.571.894; y la Patente de EE.UU. N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

6. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de la integrina beta7 como se describe aquí. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TAT con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo de anti-integrina Beta7 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), así como para enfocar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa TAT. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TAT. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., *Nature* 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, y en Trauneker et al., *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_{H2}, y C_{H3}. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los DNA que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales resulta en rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen ningún efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadena deseada.

En una realización preferida de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se da a conocer en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

Según otra aproximación descrita en la Patente de EE.UU. N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3}. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituye por

5 cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena lateral grande en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

10 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirijan células del sistema inmune a células no deseadas (patente US n° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373, y PE 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

15 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando uniones químicas. Brennan et al., Science 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que anticuerpos intactos se cortan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB): Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

25 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de E. coli, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de E. coli y se sometió a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos. También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido producidos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de una sola cadena de dímeros Fv (sFv). Véase Gruber et al, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

45 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

50 7. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirijan células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de EE.UU. N° 4.676.980], y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; PE 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

60 8. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y / o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que los anticuerpos se unen. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión de antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión

recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión de antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminal a la región Fc. Las anticuerpos multivalentes preferidos de la presente invención comprenden (o consisten en) tres a alrededor de ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la(s) cadena(s) de polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido puede comprender VD1- (X1)_n- VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido pueden comprender: VH-CH1-enlazante flexible-VH-CH1- cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende además preferiblemente al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente aquí puede, por ejemplo, comprender entre aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9. Diseño de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, a fin de mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (CCDA) y / o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y / o muerte celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) aumentada. Véase Caron et al., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. *Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo se puede diseñar para que tenga regiones Fc duales y de ese modo pueda tener mejorada la capacidad de lisis por complemento y CCDA. Véase Stevenson et al., *Anticancer Drug Design* 3: 219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, uno puede incorporar un epítipo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión al receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la vida media en suero in vivo de la molécula de IgG.

10. Inmunoconjugados

El antagonista o anticuerpo utilizado en los presentes métodos está opcionalmente conjugado a otro agente, tal como un agente citotóxico, o citocina.

La conjugación normalmente se logrará a través de un enlace covalente, la naturaleza exacta de los cuales será determinada por la molécula localizadora y el sitio de unión en el antagonista de integrina beta7 o polipéptido de anticuerpo. Típicamente, un agente no peptídico se modifica mediante la adición de un enlazante que permite la conjugación al anticuerpo anti-integrina beta7 a través de sus cadenas laterales de aminoácidos, cadenas de carbohidratos o grupos reactivos introducidos en el anticuerpo mediante modificación química. Por ejemplo, un fármaco puede estar unido a través del grupo ε-amino de un residuo de lisina, a través de un grupo α-amino libre, mediante intercambio de disulfuro a un residuo de cisteína, o por oxidación de los 1,2-dioles en una cadena de carbohidratos con ácido periódico para permitir la fijación de fármacos que contienen diversos nucleófilos a través de un enlace de base de Schiff. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.256.833. Agentes modificadores de proteínas incluyen reactivos amina-reativos (por ejemplo, ésteres reactivos, isotiocianatos, aldehídos, y haluros de sulfonilo), reactivos tiol-reativos (por ejemplo, derivados de haloacetilo y maleimidias), y reactivos ácido carboxílico y aldehído-reativos. Los antagonistas de integrina beta7 o polipéptidos de anticuerpos se pueden unir covalentemente a los agentes peptídicos mediante el uso de reactivos de entrecruzamiento bifuncionales. Los reactivos heterobifuncionales se usan más frecuentemente y permiten el acoplamiento controlado de dos proteínas diferentes a través del uso de dos porciones reactivas diferentes (por ejemplo, amina reactiva más tiol, yodoacetamida o maleimida). El uso de tales agentes de entrecruzamiento es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Brinkley, supra, y en la Patente de Estados Unidos N° 4.671.958. También se pueden emplear enlazantes peptídicos. En la alternativa, un polipéptido de anticuerpo anti-integrina beta7 puede enlazarse a una porción peptídica mediante la preparación de un polipéptido de fusión.

Ejemplos de otros agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales incluyen de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)-propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)

hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil) etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de fluor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

11. Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti-integrina beta7 descritos en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y / o tensoactivos que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); Patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545.; y WO97 / 38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles pueden ser generados mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Ver Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484 (1989).

12. Vectores, células huésped y métodos recombinantes para la producción de anticuerpos

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-beta7 o agentes polipeptídicos descritos en la presente invención, vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y técnicas recombinantes para la producción de los anticuerpos.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se puede aislar e insertar en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del DNA) o para la expresión. En otra realización, el anticuerpo puede producirse mediante recombinación homóloga, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. 5.204.244, incorporada específicamente en este documento por referencia. El DNA que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.534.615 depositada el 9 de julio 1996 y se incorpora específicamente en este documento por referencia.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del DNA en los vectores en el presente documento son las células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen las eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como Escherichia, por ejemplo, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, por ejemplo, Salmonella typhimurium, Serratia, por ejemplo, Serratia marcescens, y Shigella, así como Bacilli tales como B. subtilis y B. licheniformis (por ejemplo, B. licheniformis 41P descrito en DD 266.710 publicado el 12 de abril 1989), Pseudomonas tales como P. aeruginosa, y Streptomyces. Un huésped de clonación E. coli preferido es E. coli 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31.537), y E. coli W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo de integrina anti-Beta7. Saccharomyces cerevisiae, o la levadura del pan, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como Schizosaccharomyces pombe; huéspedes de Kluyveromyces tales como, por ejemplo, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12.424), K. bulgaricus (ATCC 16.045), K. wickerhamii (ATCC 24.178), K. waltii (ATCC 56.500), K. drosophilum (ATCC 36.906), K. thermotolerans, y K. marxianus; yarrowia (EP 402.226); Pichia pastoris (EP 183.070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244.234); Neurospora crassa; Schwanniomyces tales como Schwanniomyces occidentalis; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, y Aspergillus tales como A. nidulans y A. niger.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-Beta7 glicosilado derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado

numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivas de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se pueden utilizar aquí como el virus según la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino / -DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); Células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con la expresión antes descrita o vectores de clonación para la producción de anticuerpos anti-integrina beta7 y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-integrina beta7 de esta invención pueden cultivarse en una variedad de medios de cultivo. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), las patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469, WO 90/03430, WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y / u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede también incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, los restos de partículas, bien células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio / Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, los restos celulares se descongelan en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente primero se concentran utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, un Amicon o unidad de ultrafiltración Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes inesperados.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la técnica de purificación preferida la cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli (estirenodivinil) benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden alcanzarse con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la

purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar. Después de cualquier paso de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizada a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, a partir de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

10 C. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que comprenden los agentes terapéuticos, antagonistas o anticuerpos de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas o otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y / o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no interceden adversamente entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en cantidades combinadas que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsulas de poli (metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición de, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γetil-L-glutamato, acetato no degradable de etileno-vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C., resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Estrategias racionales se pueden idear para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es intermolecular por formación de enlace S-S a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz específica de polímero.

60 D. Métodos de tratamiento

Los antagonistas de la integrina beta7, como los anticuerpos (y agentes terapéuticos auxiliares) anti-beta7 de la invención son administrados por cualquier vía adecuada, incluyendo vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

Además, el anticuerpo se administra de forma adecuada por infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es puntual o crónica.

5 Los agentes terapéuticos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no es necesario, el agente terapéutico se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores discutidos anteriormente. Éstos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración como las que se han utilizado anteriormente en esta memoria o aproximadamente del 1 al 99% de las dosificaciones empleadas hasta el momento.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un antagonista de beta7 de la invención (cuando se utiliza sólo o en combinación con otros agentes tales como los agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y curso de la enfermedad, si el agente se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y a discreción del médico tratante. El antagonista de beta7, como un anticuerpo anti-beta7, se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 mg/kg a 15 mg/kg de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantendrá hasta que ocurra la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 15 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg o 50 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se pueden administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, al menos una vez cada semana o al menos una vez cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, diez, doce semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis de anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis bajas. Un ejemplo de régimen de dosificación comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. Dependiendo del resultado deseado del tratamiento, el paciente puede tratarse durante al menos aproximadamente 1, 2, 6, 12, 24, 36 o 52 semanas.

El estándar de cuidado de los sujetos con CU activa moderada - activa severa consiste en una terapia con dosis estándar de: un aminosalicilato, un corticosteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y/ o azatioprina. La terapia con un antagonista de la integrina beta7, como un anticuerpo anti-integrina beta7 como se describe en el presente documento se traducirá en una mejora en la remisión de la enfermedad (control rápido de la enfermedad y/ o remisión prolongada), y/ o la respuesta clínica, superior a la conseguida con el estándar de cuidado para esos estados.

En un aspecto, el tratamiento para la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agente terapéutico, como un anticuerpo anti-integrina beta7, y que comprende además la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un segundo fármaco, que es un inmunosupresor, un agente de control del dolor, un agente antidiarreico, un antibiótico o una combinación de los mismos.

En un aspecto de ejemplo, dicho fármaco secundario se selecciona de entre el grupo que consiste en un aminosalicilato, un corticosteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina. En otro aspecto ejemplar, dicha medicina secundaria es otro antagonista de la integrina beta7, como otro anticuerpo anti-integrina beta7 o un anticuerpo contra una citoquina.

Todos estos segundos fármacos se pueden usar en combinación unos con otros o sólo uno de ellos con el primer fármaco, de modo que la expresión "segundo fármaco" como se usa en el presente documento no quiere decir que es el único fármaco adicional al primer fármaco, respectivamente. Así, el segundo fármaco no tiene que ser un solo fármaco, sino que puede constituir o comprender más de uno de estos fármacos.

Estos segundos fármacos como se establece en el presente documento se utilizan generalmente en las mismas dosis y vías de administración, como se han utilizado aquí anteriormente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis hasta este momento. Si se utilizan tales segundos fármacos, opcionalmente, se utilizan en cantidades

menores a las que se usarían si el primer fármaco no estuviera presente, especialmente en las dosificaciones posteriores a la dosificación inicial con el primer fármaco, a fin de eliminar o reducir los efectos secundarios causados por el mismo. Por ejemplo, la terapia con un anticuerpo anti-integrina beta7 en el presente documento permite la administración discontinua o interrumpida de esteroides.

La administración combinada en este documento incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferiblemente hay un periodo de tiempo, en la que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

La administración combinada de un segundo fármaco incluye la co-administración (administración simultánea), utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferiblemente hay un periodo de tiempo, en la que ambos (o todos) los agentes activos (fármacos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

E. Uso de biomarcadores para evaluar el tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales con antagonistas de la integrina beta7

La presente memoria descriptiva describe métodos para evaluar el efecto, eficacia, seguridad, pronóstico y/ o la dosificación de agentes terapéuticos (o fármacos), como los antagonistas de la integrina beta7, para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal. En particular, la presente memoria descriptiva describe métodos para usar el nivel en sangre periférica del paciente de linfocitos residentes en el intestino, el nivel de ocupación de un fármaco en los linfocitos residentes en el intestino, y/ o el nivel de receptores de integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino como indicadores (o "biomarcadores") del efecto, eficacia, seguridad, pronóstico y/ o dosificación de agentes terapéuticos como los antagonistas de integrina beta7 para el tratamiento de los trastornos inflamatorios gastrointestinales. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la evaluación de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento de un trastorno gastrointestinal con un antagonista de la integrina beta7, utilizando uno o más de estos biomarcadores. Adicionalmente, la presente especificación describe métodos de utilización de tales biomarcadores para diseñar un tratamiento farmacológico y/ o régimen de dosificación, o para el pronóstico.

En algunos aspectos, el nivel de un biomarcador antes del tratamiento del paciente con un agente terapéutico se compara con el nivel del mismo biomarcador durante y/ o después del tratamiento del paciente, y un cambio (por ejemplo, aumento o disminución) en el nivel de este biomarcador en el paciente es indicativo del efecto, eficacia, seguridad y/ o pronóstico del agente terapéutico, por ejemplo un antagonista de la integrina beta7, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente. Además, tales métodos de la presente invención pueden utilizarse para diseñar un tratamiento o régimen de dosificación de fármacos para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente.

1. Predicción y/ o seguimiento de la respuesta

En un aspecto, la especificación describe un método para determinar la eficacia de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente, y el método comprende comparar la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con el antagonista de integrina beta7, con una cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia del antagonista para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente.

En otro aspecto, la especificación describe un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal al tratamiento con un antagonista de la integrina beta7, y el método comprende comparar la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con el antagonista de integrina beta7, a la cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento es indicativo de la capacidad de respuesta de dicho paciente al tratamiento con dicho antagonista. En un aspecto particular, la presente especificación describe un método para predecir si un paciente diagnosticado de un trastorno inflamatorio gastrointestinal será sensible a un tratamiento que comprende la administración de un antagonista de beta7. El método comprende comparar la cantidad de linfocitos residentes en el intestino en una muestra de sangre del paciente después del tratamiento con la cantidad de linfocitos residentes en el intestino antes del tratamiento, en el que una cantidad elevada después del tratamiento con el antagonista de integrina beta7 indica que el paciente responde al tratamiento.

La medición de la cantidad de marcadores biológicos, incluyendo los linfocitos residentes en el intestino en sangre periférica del paciente, la ocupación del antagonista de integrina beta7 en linfocitos residentes en el intestino, y los receptores de la integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino, ofrece la ventaja de predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con antagonistas de beta7 en una etapa temprana durante el curso del tratamiento,

como por ejemplo, justo después de recibir la primera dosis de antagonista de beta7. Por lo tanto, ni el paciente ni el médico del paciente necesitan esperar hasta que se complete el tratamiento para averiguar si el tratamiento ofrece algún beneficio para el paciente.

5 En un aspecto, el método de predicción de la capacidad de respuesta al tratamiento con un antagonista de beta7 comprende a) obtener una muestra de sangre de un paciente antes del tratamiento, b) medir la cantidad de biomarcador en la muestra de sangre, c) administrar un antagonista de integrina beta7 al paciente, d) obtener una muestra de sangre del paciente después de recibir el antagonista de integrina beta7, e) medir la cantidad de biomarcadores en la muestra de sangre y f) comparar la cantidad de biomarcadores en b) y la cantidad de biomarcadores en e). Si se observa una diferencia elevada entre la cantidad en b) y e), el paciente será sensible al tratamiento.

15 Para establecer una línea de base pre-tratamiento del nivel de los biomarcadores, la medición de la cantidad de biomarcadores en múltiples puntos de tiempo antes de que el tratamiento se prefiera, por ejemplo, al menos 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 días antes del tratamiento. En una realización ejemplar, se mide la cantidad de los linfocitos residentes en el intestino en la muestra de sangre del paciente a los 5, 10, 20, 30, 60 días antes del tratamiento. Se calculan los valores promedio de la cantidad medida en cada punto y se utilizarán como nivel basal pre-tratamiento de los linfocitos residentes en el intestino.

20 Para predecir la respuesta del paciente al tratamiento con antagonistas de la integrina beta7, la cantidad de biomarcadores en la sangre de los pacientes se puede determinar en cualquier punto dado durante el curso del tratamiento, preferiblemente en la primera etapa durante el curso del tratamiento, por ejemplo, pero no se limita a, dentro de aproximadamente 8 horas, 12 horas, 1, 2, 4, 10, 20, 50, 100, 300 o 500 días después de que el paciente haya recibido la primera dosis, preferiblemente de 1 a 50 días después de que el paciente haya recibido la primera dosis. En una realización, se determina la cantidad de biomarcadores en un solo punto de interés durante el curso del tratamiento. El valor obtenido en el punto de medida se compara con el nivel de la línea de base pre-tratamiento para generar el valor diferencial para este punto. En otra realización, se mide la cantidad de biomarcadores en múltiples puntos de tiempo (por ejemplo, al menos 2, 4, 6, 8, 10, 16, 20, 40 puntos) durante el curso del tratamiento. El valor obtenido en cada punto puede compararse con el nivel basal pre-tratamiento para generar el valor diferencial para cada punto de medición. La respuesta al tratamiento se evaluará en base al análisis de estos valores diferenciales.

35 Los linfocitos residentes en el intestino se identifican por los niveles de expresión de una combinación de biomarcadores, por ejemplo, pero no se limitan a, CD4, CD45RA y Beta7, utilizando las técnicas disponibles en la materia, por ejemplo, el análisis por citometría de flujo (FACS), etc. El subconjunto de población de linfocitos con diferentes patrones de expresión de estos marcadores se identifica con las técnicas estándar utilizadas en la materia, como la citometría de flujo (FACS).

40 La selección celular activada por fluorescencia (FACS) proporciona un método para la clasificación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, célula a célula, en base a las características específicas de dispersión de luz y fluorescencia de cada célula. Es un instrumento científico útil, ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de las señales fluorescentes a partir de células individuales, así como una separación física de las células de particular interés. La suspensión de células es arrastrada al centro de una estrecha corriente de líquido que fluye rápidamente. El flujo está dispuesto de manera que existe una gran separación entre las células en relación con su diámetro. Un mecanismo de vibración hace que la corriente de células se separe en gotitas individuales. El sistema se ajusta de modo que hay una baja probabilidad de que haya más de una célula en una gotita. Justo antes de que el flujo se transforme en gotas, el flujo pasa a través de una estación de medición de fluorescencia, en la que se mide la característica de fluorescencia de interés de cada célula. Un anillo de carga eléctrica está situado justo en el punto donde el flujo se rompe en gotitas. En base a la medición de intensidad de fluorescencia realizada inmediatamente antes, se sitúa una carga en el anillo y la carga opuesta queda atrapada en la gotita, a medida que se forma. Las gotitas cargadas luego caen a través de un sistema de deflexión electrostática que desvía las gotas en contenedores en base a su carga. En algunos sistemas, la carga se aplica directamente al flujo y la gotita que se forma conserva la carga del mismo signo que la corriente. Entonces se devuelve la corriente a una posición neutra después de que la gota se forme.

55 Los datos generados por un citómetro de flujo pueden representarse gráficamente en una sola dimensión para producir un histograma, o en diagramas de puntos bidimensionales o incluso en tres dimensiones. Las regiones en estos gráficos se pueden separar de forma secuencial, en base a la intensidad de fluorescencia, mediante la creación de una serie de extracciones de subconjuntos, denominadas "puertas". Existen protocolos específicos de creación de puertas con fines diagnósticos y clínicos. Los gráficos se hacen a menudo en escalas logarítmicas. Debido a que las señales de los espectros de emisión de diferentes colorantes fluorescentes se solapan en los detectores, se deben compensados por vía electrónica así como computacionalmente. A menudo, los datos acumulados con el citómetro de flujo puede reanalizarse en otro lugar, liberando la máquina para que otras personas la usen (Loken MR. "Immunofluorescence techniques in Flow Cytometry and Sorting": 341-53 Wiley (1990).

65

Típicamente, en una muestra de sangre de un paciente humano, se pueden distinguir tres subgrupos de linfocitos de sangre periférica CD4⁺ por citometría de flujo con los biomarcadores de la presente invención: las células CD45RA⁻ β7^{alto}, que se sitúan preferiblemente en los ganglios linfáticos y tejidos intestinales, las células CD45RA⁻ β7^{bajo}, que se sitúan preferentemente en los ganglios linfáticos y tejidos periféricos, y las células CD45RA⁺ β7^{intermedio}, que se localizan de forma no preferente en los ganglios linfáticos y los tejidos intestinales y periféricos. Por lo tanto, los linfocitos residentes en el intestino se pueden identificar al menos por ser CD4⁺ y CD45RA⁻ β7^{alto}, u otros marcadores de la superficie celular o combinación de los mismos, tales como CD8⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en una citometría de flujo. Estos tres subgrupos de linfocitos se localizan en distintas porciones de un gráfico de puntos o histograma de un análisis FACS y por lo tanto son distinguibles para un experto en la materia.

La cantidad de linfocitos residentes en el intestino pueden cuantificarse de diversas maneras en la materia. Se pueden calcular recuentos absolutos en forma de porcentaje de los niveles basales antes de la dosis de los linfocitos CDR4⁺ residentes en el intestino en cada momento, en las muestras obtenidas de un paciente. También se pueden calcular los recuentos absolutos para cada subconjunto respectivo de linfocitos, que serán iguales a los recuentos absolutos de linfocitos (un valor obtenido a partir de mediciones de hematología que se expresa en linfocitos por microlitro de sangre periférica) por el porcentaje de linfocitos seleccionados para cada subconjunto (obtenido a partir de análisis de citometría de flujo). Los linfocitos residentes en el intestino también se pueden cuantificar mediante recuento de anticuerpos, que son recuentos absolutos como porcentaje del recuento de anticuerpos de referencia obtenidos antes de administrar la dosis, calculado como el recuento de anticuerpos dividido por la media de los recuentos absolutos previos a la dosis. Como control, la cantidad de otro subconjunto de linfocitos, tales como la cantidad de linfocitos de localización periférica también puede cuantificarse para la misma muestra en cada punto de tiempo.

La cantidad de ocupación del antagonista de la integrina beta 7 en los linfocitos residentes en el intestino y la cantidad de receptores de integrina beta 7 en los linfocitos residentes en el intestino también se pueden medir usando las técnicas conocidas en la materia y que se describen en los Ejemplos de la presente solicitud.

Un tratamiento que probablemente proporcionará una respuesta beneficiosa para el paciente debería aumentar significativamente la cantidad de linfocitos residentes en el intestino en la sangre del paciente sin aumentar sustancialmente la cantidad de linfocitos de localización periférica en la muestra de sangre del paciente. Preferiblemente, el tratamiento debe aumentar la cantidad de biomarcadores en al menos aproximadamente un 30%, 50%, o en 1, 2, 3, 4, o 5 veces, 1, 2, 4, 6, 8, 20, 30, 50, 100 días después del tratamiento en comparación con el nivel basal previo al tratamiento. En una realización particular, un aumento de al menos 3 o 5 veces es indicativo de una respuesta eficaz al tratamiento.

En otro aspecto, la presente memoria describe un método de pronóstico para predecir la probabilidad de respuesta beneficiosa de un paciente diagnosticado con un trastorno inflamatorio gastrointestinal a un tratamiento que comprende administrar un antagonista de la integrina beta7 a dicho paciente, que comprende comparar la cantidad de biomarcadores en una muestra de sangre de dicho paciente después de recibir el antagonista de la integrina beta7 con la de antes del tratamiento, y en el que una cantidad elevada de biomarcadores en la muestra de sangre después de recibir el antagonista de integrina beta7 es indicativo de una probabilidad de respuesta beneficiosa.

Al igual que en la predicción de la capacidad de respuesta a un tratamiento, la cantidad de biomarcadores en sangre periférica se puede utilizar para predecir la probabilidad de una respuesta beneficiosa a largo plazo. La respuesta beneficiosa incluye, pero no se limita a, reducción o eliminación de uno o más de los síntomas típicos del trastorno inflamatorio gastrointestinal, tales como, dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, movimiento intestinal frecuente, fiebre, fatiga y pérdida de peso, o lograr la remisión parcial o total de la enfermedad. La cantidad de linfocitos residentes en el intestino en la muestra de sangre del paciente se puede cuantificar con los mismos métodos descritos en este documento. Un tratamiento que probablemente proporcione respuestas beneficiosas a largo plazo para el paciente debería aumentar significativamente la cantidad de biomarcadores en la sangre del paciente sin aumentar sustancialmente la cantidad de linfocitos de localización periférica. Preferiblemente, el tratamiento aumenta la cantidad de biomarcadores en al menos aproximadamente 1, 3, 5, 8, 10 veces, 1, 2, 4, 6, 8, 20, 30, 50, 100 días después de que se administre al paciente la primera dosis de antagonista de la integrina beta7 en comparación con el nivel de línea de base pre-tratamiento.

En otro aspecto, la presente memoria describe un método de monitorización de la capacidad de respuesta de un paciente diagnosticado con un trastorno inflamatorio gastrointestinal a un tratamiento con un antagonista de integrina beta7 que comprende el seguimiento de la cantidad de biomarcadores en la sangre periférica de dicho paciente durante dicho tratamiento, en el que una cantidad elevada sostenida en comparación con la fase previa al tratamiento es indicativa de que se mantiene la capacidad de respuesta a dicho tratamiento. En particular, el nivel de línea de base pre-tratamiento de la cantidad de biomarcadores en un paciente sometido a ensayo se calcula como se describe en el presente documento. Para seguir la capacidad de respuesta del paciente a un tratamiento con un antagonista de la integrina beta7, se puede medir la cantidad de biomarcadores en una muestra de sangre del paciente en cualquier punto dado durante el curso del tratamiento y, preferiblemente, en múltiples puntos a lo largo del curso del tratamiento. Por ejemplo, se mide la cantidad de biomarcador al menos cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 días dependiendo de la duración de la tratamiento o la eficacia deseada del tratamiento. La

respuesta al tratamiento en reacción a un evento relacionado también se puede seguir utilizando este enfoque. Por ejemplo, la cantidad de los biomarcadores en la muestra de sangre del paciente se puede medir inmediatamente después de la administración de un segundo fármaco o del inicio de un cambio de dosificación, o cualquier cambio en el estado físico o mental de los pacientes, etc. Idealmente, debe observarse un nivel elevado mantenido de los linfocitos residentes en el intestino para una capacidad mantenida de respuesta al tratamiento. Si el nivel de biomarcadores disminuye en algún punto durante el tratamiento o en reacción a ciertos eventos relacionados, es indicativo de que el paciente muestra una respuesta reducida al tratamiento. El régimen de tratamiento debe modificarse en consecuencia para mantener una cantidad elevada de los biomarcadores.

La presente especificación también describe un método de modificación de un tratamiento con un antagonista de beta7 para un paciente al que se le ha diagnosticado un trastorno inflamatorio gastrointestinal que comprende: a) un seguimiento de la capacidad de respuesta de dicho paciente a dicho tratamiento con el método descrito anteriormente; y b) cambiar dicho tratamiento de manera que se mantenga una elevada cantidad de dichos linfocitos.

La presente invención incluye un método para determinar la dosificación o régimen de dosificación de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente, y el método comprende un ajuste de la dosis o un régimen de dosificación del antagonista de integrina beta7 basado en una comparación de la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después o durante el tratamiento con una dosis o régimen de dosificación del antagonista de integrina beta7, con una cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia o de la capacidad de respuesta a la dosis o régimen de dosificación del antagonista de la integrina beta7 para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente.

2. Diseño de regímenes de tratamiento

El desarrollo de fármacos es un proceso complejo y costoso. El coste de llevar un nuevo medicamento al mercado se estima en entre 800 millones y 1 billón de dólares. Menos del 10% de los fármacos en ensayos clínicos de fase I llegan a la fase de aprobación. Dos razones clave por las que los fármacos fallan en las últimas etapas son la falta de comprensión de la relación entre la respuesta a la dosis y los problemas de seguridad no previstos. Ante este escenario, es fundamental contar con herramientas que ayuden a predecir cómo funcionará un medicamento *in vivo* y ayudar en el éxito de un candidato terapéutico clínico (Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK /PD Testing Drug Discovery and Development (2006)).

La farmacocinética (PK) caracteriza las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco. La farmacodinámica (PD) define la respuesta fisiológica y biológica al fármaco administrado. Los modelos de PK/ PD establecen enlaces matemáticos y teóricos entre estos dos procesos y ayuda a predecir mejor la acción del fármaco. Los modelos integrados de PK/ PD y el diseño de ensayos asistido por ordenador a través de la simulación se están incorporando en muchos de los programas de desarrollo de fármacos y están teniendo un impacto cada vez mayor (Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK /PD Testing Drug Discovery and Development (2006)).

El análisis de PK/ PD se realiza normalmente en todas las etapas del proceso de desarrollo de fármacos. Dado que el desarrollo es cada vez más complejo, costoso en tiempo y económicamente, las empresas buscan hacer un mejor uso de los datos de PK/ PD para eliminar los candidatos imperfectos al principio e identificar aquellos con las mejores posibilidades de éxito clínico. (Lakshmi Kamath, supra).

Las aproximaciones de modelado de PK/ PD han demostrado ser útiles para la determinación de relaciones entre la respuesta de biomarcadores, los niveles de fármacos y los regímenes de dosificación. El perfil de PK/ PD de un fármaco candidato y la capacidad para predecir la respuesta a éste de un paciente son críticos para el éxito de los ensayos clínicos. Los recientes avances en técnicas de biología molecular y la mejor comprensión de las dianas de diversas enfermedades han validado los biomarcadores como buenos indicadores clínicos de la eficacia terapéutica de un fármaco. Los ensayos de biomarcadores ayudan a identificar una respuesta biológica a un candidato a fármaco. Una vez que un biomarcador está validado clínicamente, se pueden realizar modelos con eficacia en simulaciones de prueba. Los biomarcadores tienen el potencial de alcanzar la condición de sustituto que algún día pueda suplir a los resultados clínicos en el desarrollo de fármacos. (Lakshmi Kamath, supra).

La cantidad de los biomarcadores en sangre periférica se puede utilizar para la identificación de la respuesta biológica a un tratamiento con antagonistas de la integrina beta7 y por lo tanto puede funcionar como un buen indicador clínico de la eficacia terapéutica de un tratamiento candidato.

La presente invención incluye un método de diseño de un tratamiento con un agente candidato para un paciente humano diagnosticado con un trastorno inflamatorio gastrointestinal, que comprende la determinación de la dosis eficaz para el paciente humano en base a una dosis que aumenta efectivamente la cantidad de un biomarcador en sangre periférica de un sujeto no humano en respuesta a un tratamiento con dicho agente candidato, en el que el

biomarcador se selecciona de un grupo que consiste en linfocitos residentes en el intestino en la sangre periférica del paciente, ocupación de dicho agente terapéutico en los linfocitos residentes en el intestino, y los receptores de integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino.

5 En una realización de ejemplo, un método para diseñar un tratamiento con un antagonista de integrina beta7 para un paciente humano diagnosticado con un trastorno inflamatorio gastrointestinal, comprende: a) medir la cantidad de biomarcadores en la muestra de sangre de un sujeto no humano en respuesta a un tratamiento candidato que comprende la administración de una dosis candidata de un antagonista de la integrina beta7 a dicho sujeto no humano, b) determinar si la dosis candidata puede aumentar efectivamente la cantidad de biomarcadores en sangre periférica de dicho sujeto no humano; c) la identificación de una dosis que aumenta efectivamente la cantidad de los biomarcadores en la sangre periférica de dicho sujeto no humano; y d) la determinación de una dosificación eficaz para un paciente humano en base a la dosis identificada.

15 En una realización, el método de la presente invención se utiliza para identificar las dosis candidatas que potencialmente proporcionan una respuesta beneficiosa deseable en un estudio de ensayo clínico de fase II y/ o de fase III.

20 La muestra de sangre del sujeto no humano analizado se recoge antes de recibir el tratamiento candidato en ensayo clínico de Fase I y se establece un nivel basal de los biomarcadores en la sangre periférica del sujeto como se describe en la Sección E1 de la solicitud. El sujeto no humano analizado recibe, a continuación, un tratamiento candidato que comprende la administración de una dosis candidata de un antagonista de integrina beta7 al sujeto evaluado. La muestra de sangre se recoge de nuevo del sujeto en cualquier otro momento deseado durante el curso del tratamiento como se describe en la Sección E1, o después de que termine el tratamiento. La cantidad de los biomarcadores en respuesta al tratamiento candidato en primer lugar se comparan con la línea de base de pretratamiento para determinar el valor diferencial en comparación con la línea de base pre-tratamiento para el tratamiento candidato. Si el tratamiento candidato da lugar a un aumento significativo en la cantidad de biomarcadores, por ejemplo al menos del 50%, 1, 2, 3, 5, 8 o 10 veces mayor, la dosis será seleccionada como una dosis candidata para el diseño del tratamiento de los ensayos clínicos en Fase II o Fase III. Los linfocitos residentes en el intestino pueden identificarse utilizando técnicas estándar en la materia y se describen en E1 de la presente solicitud, en particular por los marcadores de superficie celular, como CD45AR, CD4 (CD8) y beta7. La cantidad de biomarcadores puede cuantificarse a través de las aproximaciones disponibles en la materia y que se describen en la Sección E1.

35 El procedimiento anteriormente descrito puede utilizarse múltiples veces para probar la pureza de tratamientos candidatos, especialmente la pureza de las dosis candidatas. La dosificación candidata da lugar al aumento óptimo en la cantidad de linfocitos y de entre las dosis candidatas analizadas se seleccionará para el diseño del tratamiento en los ensayos clínicos de Fase II o III. En una realización, puede analizarse en el mismo sujeto no humano la pureza de varias dosis candidatas. Después de la finalización de un tratamiento candidato, el efecto residual del tratamiento se examinará usando los métodos de la presente solicitud, por ejemplo, examinando si la cantidad de los biomarcadores vuelve al nivel basal pre-tratamiento. Después de que la cantidad de biomarcadores vuelva al nivel basal pre-tratamiento, puede aplicarse otro tratamiento candidato al mismo sujeto para ver su efecto sobre los linfocitos residentes en el intestino. En otra realización, la pureza del tratamiento candidato puede probarse en múltiples sujetos al mismo tiempo, proporcionando cada tratamiento candidato a cada sujeto. Puede ser necesario analizar múltiples sujetos para el mismo régimen candidato para eliminar la diferencia individual entre sujetos en respuesta al mismo tratamiento.

50 La dosis candidata seleccionada en los ensayos clínicos de Fase I se utilizará para diseñar la dosis óptima para los ensayos clínicos de Fase II y III utilizando las aproximaciones convencionales en la materia, lo que incluye, pero no limitado al modelado de PK/ PD. El modelado tradicional de PK/ PD en el desarrollo de fármacos define parámetros tales como la concentración de la dosis del fármaco, los efectos de exposición al fármaco, la vida media del fármaco, las concentraciones de fármaco a lo largo del tiempo y los efectos de los fármacos a lo largo del tiempo. Cuando se utilizan más ampliamente, las técnicas cuantitativas tales como el modelado de fármacos, el modelado de la enfermedad, el modelado de ensayos y el modelado del mercado pueden apoyar el proceso de desarrollo completo, lo que resulta en mejores decisiones a través de la consideración explícita del riesgo y una mejor utilización de los conocimientos. Hay disponible una variedad de herramientas de modelado de PK/ PD para los investigadores de desarrollo de fármacos, por ejemplo, WinNonlin y el Knowledgebase Server (PKS) desarrollado por Pharsight, Inc. de Mountain View, California.

60 F. Biomarcador de la respuesta al tratamiento de otros agentes candidatos

La cantidad de biomarcadores también puede utilizarse para predecir la capacidad de respuesta a un tratamiento con un agente terapéutico candidato que no sea antagonista de integrina beta7. En particular, los métodos para predecir el resultado de un tratamiento con un antagonista de integrina beta7 descrito en este documento se pueden utilizar de la misma manera para: 1) la predicción de si un paciente será sensible a un tratamiento que comprende la administración al paciente de un agente terapéutico candidato; 2) predecir la probabilidad de que el tratamiento sea beneficioso; 3) el seguimiento de la respuesta del paciente al tratamiento y 4) la modificación del tratamiento con el

agente terapéutico candidato. La cantidad de biomarcadores también puede utilizarse para diseñar un tratamiento con un agente terapéutico candidato que no sea antagonista de la integrina beta7 usando los métodos descritos anteriormente.

- 5 Preferiblemente, el agente candidato tiene un efecto beneficioso en los pacientes con una enfermedad inflamatoria intestinal, como un agente inmunosupresor como el descrito en este documento. Más preferiblemente, el agente inhibe la infiltración de linfocitos residentes en el intestino al intestino del paciente, ya sea directa o indirectamente.

G. Predicción del pronóstico

10 Además de predecir la capacidad de respuesta al tratamiento, la cantidad de biomarcadores también es útil para predecir el pronóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal.

15 La presente descripción incluye por lo tanto un método para predecir el pronóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal en un paciente que comprende: a) la medición de una relación entre la cantidad de linfocitos residentes en el intestino y la cantidad de linfocitos periféricos en una muestra de sangre de dicho paciente y b) medir la relación entre la cantidad de linfocitos residentes en el intestino y la cantidad de linfocitos periféricos en una muestra de sangre de un individuo sano, en el que un cambio en la relación de dicho paciente en comparación con la del individuo sano es inductivo del pronóstico de la enfermedad.

20 Con el fin de predecir el pronóstico, se obtienen muestras de sangre de un número de individuos sanos. La cantidad de linfocitos residentes en el intestino, específicamente las células CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} se miden con los métodos de la presente invención. La cantidad de linfocitos periféricos (CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{bajo}) también se mide en las mismas muestras de sangre. La relación de la cantidad de linfocitos residentes en el intestino frente a la cantidad de linfocitos periféricos, se calcula a continuación en cada muestra de sangre. Se establece una proporción promedio de referencia para las personas sanas en base a la relación de cada individuo sano. Esta relación de línea de base se utiliza como control para distinguir si se observa una disminución en la proporción en un paciente examinado. Entonces se obtiene una muestra de sangre del paciente analizado y se calcula la relación de la cantidad de linfocitos residentes en el intestino frente a la cantidad de linfocitos periféricos. Si se observa un cambio significativo (aumento o disminución) en la proporción del paciente en comparación con la línea de base control, de al menos aproximadamente un 30%, 50%, 100%, 200% de cambio, el paciente tendrá probablemente mal pronóstico, por ejemplo, una baja probabilidad de remisión, alta probabilidad de recurrencia, empeoramiento o resistencia a los medicamentos.

35 H. Método de identificación de una población de linfocitos

El anticuerpo anti-integrina beta7 humanizado, rhuMAb Beta7, se une a la subunidad de integrina beta7 independientemente de su pareja de unión. Por lo tanto, rhuMAb Beta7 se une a la beta7 cuando está solo o asociado con alfa4 o alfaE. Por lo tanto, este anticuerpo y sus variantes son buenos marcadores para identificar una población de linfocitos que comprenden los linfocitos que expresan la integrina alfaE-beta7 y/ o la integrina alfa4-beta7. En una realización preferible, la población de linfocitos identificada comprende linfocitos que expresan la integrina alfaE-beta7, linfocitos que expresan la integrina alfa4-beta7 y linfocitos que expresan tanto la integrina alfa4-beta7 como alfaE-beta7. Esto es diferente de los anticuerpos anti-beta7 existentes en la materia, tales como act1 (Meenan et al., supra), que sólo puede unirse a la subunidad beta7 cuando está conectada a alfa4.

45 La presente especificación describe un método de identificación de una población de linfocitos que comprende linfocitos que expresan la integrina alfaE-beta7 y / o alfa4-beta7, que comprende la unión de dichos linfocitos a un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera de Id. de Sec. N^o: 10, y una secuencia de la región variable de la cadena pesada de Id. de Sec. N^o: 11.

50 En un aspecto, el método se utiliza para identificar los linfocitos que expresan beta7 en la sangre periférica de un paciente. En particular, se recoge la muestra de sangre del paciente y puede identificarse la población de linfocitos que comprende células que expresan la integrina alfaE-beta7, células que expresan la integrina alfa4-beta7 y células que expresan ambas, y aislarse mediante el uso de citometría de flujo con beta7, CD4 y CD45AR como marcadores de superficie celular.

55 En otro aspecto, el método se utiliza para visualizar una población de linfocitos que comprende células que expresan la integrina alfaE-beta7 y células que expresan la integrina alfa4-beta7 en los ganglios linfáticos y los tejidos del intestino de un paciente a través de un procedimiento estándar utilizado en la técnica, tales como la tinción inmunohistoquímica con rhuMAb beta7.

60 El método aquí descrito es particularmente útil para la detección de la población de linfocitos estrechamente relacionados con el desarrollo y progreso de las enfermedades inflamatorias intestinales. La población identificada, especialmente la población obtenida a partir de sangre periférica de un paciente, se puede utilizar como un

65

biomarcador para predecir la capacidad de respuesta del paciente a un tratamiento, así como el diseño de regímenes de tratamiento, como se describe en las secciones E y F.

La anterior especificación escrita se considera suficiente para permitir a un experto en la materia poner en práctica la invención. La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones depositadas, puesto que las realizaciones depositadas pretenden ilustrar solamente ciertos aspectos de la invención y cualquier realización que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta invención. El depósito del presente material no constituye la admisión de que la descripción aquí contenida es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe ser interpretada como una limitación del alcance de las reivindicaciones. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se entiende que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o situación específicos estará dentro de las capacidades de un experto ordinario en la materia a la vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Otros detalles de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Las descripciones de todas las citas de la especificación se incorporan expresamente en el presente documento como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estudio de seguridad y toxicocinético de 12 semanas con rhuMAb Beta7 administrado semanalmente por vía intravenosa y subcutánea en monos *Cynomolgus* con una fase de recuperación de 15 semanas y una fase de extensión para evaluar la reversión de los efectos farmacodinámicos

1. Resumen

El rhuMAb Beta7 es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-integrina $\beta 7$ humana que se une a las integrinas $\alpha \beta 7$ y $\alpha 4 \beta 7$. Las células que expresan estas integrinas se han asociado con enfermedades inflamatorias del intestino tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Feagan et al. 2005, Sandborn et al., 2005). El rhuMAb Beta7 se ha investigado como un potencial agente terapéutico para las enfermedades mediadas por el sistema inmune, como la enfermedad inflamatoria intestinal. El propósito de este estudio fue evaluar la seguridad, toxicocinética y farmacodinámica del rhuMAb Beta7 cuando se administra semanalmente mediante una inyección intravenosa (IV) o inyección subcutánea (SC) a monos *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) durante al menos 12 semanas y evaluar la reversibilidad, la persistencia y la aparición tardía de efectos relacionados con los fármacos después de una recuperación de 15 semanas. Además, se observaron los subgrupos de animales con dosis control, media y los alta por un período adicional (durante una fase de extensión) antes de la necropsia para evaluar la reversión de los efectos farmacodinámicos.

Los monos *cynomolgus* vírgenes se asignaron a seis grupos (7 animales/ sexo/ grupo en los Grupos 1, 3, 4, 5 y 6 y 5 animales/ sexo en el Grupo 2). A los animales del Grupo 1 se les proporcionó un total de 12 dosis semanales de vehículo a través de inyección IV y SC. A los animales de los Grupos 2-6 se les dio un total de 12 dosis semanales de rhuMAb Beta7 a 5 mg/ kg IV (Grupo 2), 15 mg/ kg IV (Grupo 3), 50 mg/ kg IV (Grupo 4), 15 mg/ kg SC (Grupo 5), o 50 mg/ kg SC (Grupo 6), respectivamente. Después de la fase de dosificación de 12 semanas, se practicó la necropsia a 3 machos y 3 hembras de cada grupo de dosis el día de estudio 80, que fue 2 días después de la dosis final. El resto de animales se observaron durante 15 semanas adicionales durante la fase de recuperación. Al final de la fase de recuperación (el día de estudio 184), se practicó la necropsia a 2 animales/ sexo/ grupo. Después de la necropsia de la recuperación de 15 semanas, los animales restantes (2 machos y 1 hembra de cada uno de los Grupos 1 y 3, y 2 machos y 2 hembras de cada uno de los Grupos 4, 5 y 6) se observaron para evaluar la reversión de los efectos PD. Los parámetros PD se siguieron durante esta fase de extensión y los resultados se utilizaron para determinar el final de la fase en vida del estudio.

Tres subgrupos de linfocitos $CD4^+$ de sangre periférica, subdivididos de acuerdo a sus propiedades de residencia, se siguieron por citometría de flujo como marcadores PD exploratorios: las células $CD4^+ CD45RA^- \beta 7^{alto}$, $CD45RA^- \beta 7^{bajo}$ y $CD45RA^+ \beta 7^{intermedio}$ (ver Figura 1). Las células $CD45RA^- \beta 7^{alto} CD4^+$ son fenotípicamente similares a los linfocitos de memoria / efectores humanos y de ratón que residen preferentemente en los ganglios linfáticos y los tejidos intestinales, mientras que las células $CD4^+ CD45RA^- \beta 7^{bajo}$ son fenotípicamente similares a los linfocitos de memoria / efectores humanos y de ratón que residen preferentemente en ganglios linfáticos y tejidos periféricos (Rott et al. 1996, Rott et al 1997, Williams et al 1998, Rose et al. 1998, Williams y Butcher 1997, Butcher et al. 1999). Las células $CD4^+ CD45RA^+ \beta 7^{intermedio}$, fenotípicamente similares a los linfocitos vírgenes humanos y de ratón, se desplazan sin preferencia aparente tanto por los ganglios linfáticos intestinales como periféricos (Rott et al. 1996, Rott et al. 1997, Williams et al. 1998, Rosé et al. 1998, Williams y Butcher 1997, Butcher et al. 1999).

Los valores promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ aumentaron aproximadamente de 4 a 5 veces respecto a los niveles de referencia durante la fase de dosificación, después de la administración IV de 5 mg/ kg de rhuMab Beta7. La administración de 15 mg/ kg o 50 mg/ kg de rhuMab Beta7 (IV o SC) dio como resultado incrementos ligeramente mayores (de aproximadamente de 5 a 6 veces) en los valores promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ durante la fase de dosificación, en comparación con el valor inicial los niveles. En general, la mayoría de los animales que recibieron 15 o 50 mg/ kg (IV o SC) había sufrido efectos PD durante la fase de dosificación, a diferencia de la mayoría de los animales en el grupo de dosis de 5 mg/ kg. Los animales que recibieron vehículo no mostraron cambios sustanciales en los valores promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica. Los valores promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$ y linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{bajo}}$ no eran sustancialmente diferentes en macacos dosificados con vehículo o rhuMab Beta7. Estos hallazgos son consistentes con el mecanismo de acción propuesto del rhuMab Beta7: la inhibición del desplazamiento de los linfocitos $\beta 7$ positivos a través del intestino, a través de la prevención de la unión de $\alpha 4\beta 7$ a sus ligandos. A través de este mecanismo propuesto es esperable que se acumulen los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en la circulación periférica.

Al final de la fase de recuperación de 15 semanas (el día de estudio 184), los valores de linfocitos CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ CD4⁺ volvieron a los niveles basales en todos los animales que recibieron dosis IV de 5 mg/ kg de rhuMab Beta7 (10 de 10). En los grupos en los que se administró una dosis de 15 o 50 mg/ kg IV de rhuMab Beta7, el número de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ regresó a los niveles basales en 7 de 13 y 2 de 14 animales, respectivamente. En los grupos que recibieron dosis de 15 o 50 mg/ kg SC de rhuMab Beta7, los valores de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ volvieron a los niveles basales en 6 de 14 y 1 de 14 animales, respectivamente. Por lo tanto, la tasa de retorno de los valores absolutos de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ a los niveles basales parecía ser dependiente de la dosis. Al final de la fase de extensión PD (el día de estudio 288), todos los monos cynomolgus restantes en el estudio (n = 3 en el grupo que recibió 15 mg/ kg IV y n = 4 en cada uno de los grupos que recibieron 50 mg/ kg IV, 15 mg/ kg SC, o 50 mg/ kg SC) mostraron reversión de los efectos de PD (retorno a los niveles basales de linfocitos CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ CD4⁺).

Además, los efectos PD parecen estar en relación con la farmacocinética, ya que la reversibilidad observada y la vuelta a los niveles basales de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ se correlacionó con la eliminación de rhuMab Beta7 y la reversibilidad parecía ser dependiente de la dosis.

La variabilidad entre animales en los mismos grupos de dosis en la tasa de retorno de los efectos PD a los niveles previos a la dosis correlacionó con cambios en la eliminación de rhuMab Beta7.

2. Seguridad, toxicocinética y farmacodinámica

La seguridad, toxicocinética, y farmacodinámica del rhuMab Beta7 se evaluó durante su administración semanal mediante inyección intravenosa (IV) o por inyección subcutánea (SC) a monos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) durante al menos 12 semanas y se evaluó la reversibilidad, la persistencia y la aparición tardía de efectos relacionados con los fármacos después de una recuperación de 15 semanas. Además, se observaron subgrupos de animales de los grupos de dosis control, media y alta durante un período adicional antes de la necropsia (durante una fase de extensión) para evaluar la reversión de los efectos farmacodinámicos.

2.1 Material de Ensayo

El rhuMab Beta7, lote M3-TOX165, fue proporcionado por Genentech como un líquido claro a una concentración de 150 mg/ ml (1,3 ml por vial). Antes de su uso en el estudio, el agente de ensayo se almacenó en un refrigerador regulado para mantener un rango de temperatura entre 2°C y 8°C.

El vehículo, vehículo rhuMab Beta7, lote M3-TOX166, fue proporcionado por Genentech como un líquido claro en viales de 25 ml. Antes de su uso en el estudio, el vehículo se almacenó en un refrigerador regulado para mantener un rango de temperatura entre 2°C y 8°C.

2.2 Especies

Monos cynomolgus vírgenes machos y hembras (*Macaca fascicularis*) con origen en la Isla Mauricio, se obtuvieron de Covance Research Products, Inc. (Harrisburg, Pensilvania). Los animales se aclimataron durante aproximadamente 4 semanas antes de que comenzara la dosificación.

Inicialmente se aclimataron 47 machos y 47 hembras para su posible uso en este estudio. Los datos recogidos durante la aclimatación (fase antes de la dosis) se utilizaron para eliminar animales de su consideración para la selección en el estudio para producir una variación mínima. Se asignaron al estudio 40 monos cynomolgus macho y 40 hembra utilizando un procedimiento informático diseñado para lograr el equilibrio de peso corporal en los grupos.

2.3 Diseño del estudio

5 Este estudio constaba de tres fases: una fase de 12 semanas de dosificación, una fase de recuperación de 15 semanas y una fase de extensión. La fase de dosificación de 12 semanas terminó en la necropsia el día de estudio 80, 2 días después de la administración de la última dosis de rhuMAb Beta7. La fase de recuperación de 15 semanas siguió a la fase de dosificación de 12 semanas y terminó en la necropsia en el día de estudio 184. Después de la fase de recuperación de 15 semanas, hubo un período adicional (una fase de extensión hasta el día de estudio 288) para evaluar la reversión de los efectos PD. El diseño completo del estudio se resume en la Tabla 1.

Tabla 1

Resumen del estudio					
Grupo	Vía de administración	Nº / Sexo ^a	Nivel de dosis ^b (mg/kg/dosis)	Conc.Dosis ^b (mg/ml)	Volumen dosis ^b (ml/kg/dosis)
1 (control) ^c	IV / SC	7/ M, 7/ F	0	0	0,33
2 (bajo)	IV	5/ M, 5/ F	5	15	0,33
3 (medio)	IV	7/ M, 7/ F	15	45	0,33
4 (alto)	IV	7/ M, 7/ F	50	150	0,33
5 (medio) ^d	SC	7/ M, 7/ F	15	45	0,33
6 (alto) ^d	SC	7/ M, 7/ F	50	150	0,33

IV = intravenosa; SC = subcutánea.
^a Tras una fase de dosificación de 12 semanas (2 días después de la dosis final), 3 animales/ sexo/ grupo fueron sacrificados. Los animales restantes fueron sometidos a una fase de recuperación. Tras una fase de recuperación de 15 semanas, 2 animales/ sexo/ grupo fueron sacrificados. Dos animales/ sexo/ grupo de los grupos 4, 5 y 6, y 2 machos y 1 hembra/ grupo de los grupos 1 y 3 fueron observados durante un período adicional antes de la necropsia para evaluar la reversión de los efectos PD. Se siguieron los parámetros de PD durante esta fase de extensión y los resultados se utilizaron para determinar el momento de finalización.
^b A los animales se les administró una dosis en los días de estudio 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 y 78.
^c Los animales del grupo 1 recibieron vehículo (control) mediante inyecciones intravenosas y SC.
^d Los grupos 5 y 6 sólo recibieron inyecciones subcutáneas de rhuMAb Beta7

10 2.5 Administración de las dosis

Los animales recibieron 12 inyecciones IV semanales a través de la vena safena o inyección SC en los días de estudio 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 y 78. Los puntos de inyección de las dosis SC se documentaron. Las dosis se determinaron en base al último peso corporal registrado. Se administraron a los animales dosis en volúmenes de 0,33 ml por kg de peso corporal. Las inyecciones IV fueron seguidas de una solución salina de aproximadamente 1 ml.

Estas desviaciones se documentaron y no afectan a la interpretación de los resultados PD.

20 2.6 Recogida de muestras de sangre para PD

Las muestras de sangre (aproximadamente 1 ml) para el análisis PD se recogieron de cada animal por punción venosa de la vena femoral una vez durante la fase previa a la dosis (aproximadamente 6 días antes de la iniciación de la dosis), antes de la dosificación en el día de estudio 1, en el día de estudio 2 (24 horas después de la primera dosis), antes de la dosificación en los días de estudio 15, 29, 43, 57, 71 y 78, y el día de estudio 80 antes de la necropsia. Durante la fase de recuperación de 15 semanas (R), se recogieron muestras en los días de estudio 92 (R13), 106 (R27), 120 (R41), 134 (R55), 148 (R69), 162 (R83), y 184 (R105). Durante la fase de extensión, se tomaron muestras de sangre de todos los animales que sobrevivieron cada dos semanas, comenzando el día de estudio 190 (R111) hasta el día de la necropsia final, éste incluido (día de estudio 288), para evaluar la reversión de los efectos PD.

2.7 Procesado de la muestra de sangre para PD

Las muestras para el análisis PD se empaquetaron con paquetes de gel refrigerados para mantener un rango de temperatura de aproximadamente 2°C-15°C durante al menos 72 horas y se enviaron a Genentech en el día de la recogida.

2.8 Ensayos de citometría de flujo para PD

40 Tres subgrupos de linfocitos CD4⁺ en sangre periférica fueron evaluados por citometría de flujo como biomarcadores PD exploratorios: las células CD45RA⁻ β7^{alto} (fenotípicamente similares a los linfocitos CD4⁺ de memoria/ efectores humanos que se encuentran preferentemente en los ganglios linfáticos y tejidos intestinales), las células CD45RA⁻ β7^{bajo} (fenotípicamente similares a los linfocitos CD4⁺ de memoria/ efectores humanos que se encuentran preferentemente en los ganglios linfáticos y los tejidos periféricos), y las células CD45RA⁺ β7^{intermedio} (fenotípicamente similares a los linfocitos CD4⁺ vírgenes humanos que se localizan de forma no preferente en los

ganglios linfáticos y los tejidos intestinales y periféricos) (Rott et al. 1996, Rott et al. 1997, Williams et al. 1998, Rose et al., 1998, Williams y Butcher 1997, Burcher et al. 1999). Un gráfico de citometría de flujo representativo de los subgrupos de linfocitos CD4⁺ en monos cynomolgus se presenta en la Figura 1. Los subgrupos de linfocitos CD8⁺ en sangre periférica (linfocitos CD8⁺ CD45RA⁻ β7^{alto}, CD45RA⁻ β7^{bajo} y CD45RA⁺ β7^{intermedio}) se examinaron de manera similar, pero no se utilizaron en las evaluaciones de PD.

2.8.1 Ensayo de Expresión: Evaluación de los subgrupos de linfocitos que expresan β7 en sangre periférica

Los linfocitos CD4⁺ o CD8⁺ CD45RA⁻ β7^{alto}, CD45RA⁻ β7^{bajo}, y CD45RA⁺ β7^{intermedio} se evaluaron mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-β7 no bloqueante (9D8) que se une a β7 en presencia del rhuMab Beta7. La configuración del panel para el análisis de muestras de sangre completa se presenta en la Tabla 2. Todos los anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences (BD; San Jose, CA) con la excepción de la estreptavidina-alofococianina (SA-APC), que se adquirió de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) y la 9D8-biotina, que fue proporcionado por Genentech.

Tabla 2

Configuración del panel de sangre completa para medir los linfocitos que expresan β7		
Tubo	Antígeno Marcadores y fluorocromos	Tipos de células identificadas
1	IgG-FITC, IgG-PE, CD4-PerCP-Cy5.5, SA-APC	Isotipo utilizado para clasificar la población en CSS y FSC, y establecer las marcas de cuadrante
2	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD4-PerCP-Cy5.5, 9D8-biotina / SA-APC ^a	subgrupos de células de linfocitos CD4 ⁺ que expresan α4 y β7
3	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD8- PerCP-Cy5.5, 9D8-biotina / SA-APC ^a	subgrupos de células de linfocitos CD8 ⁺ que expresan α4 y β7

APC = alofococianina; FITC = isotiocianato de fluoresceína; FSC = dispersión frontal; IgG = inmunoglobulina G; PE = ficoeritrina; PerCP-Cy5.5 = proteína clorofil-peridina - cianina-5.5; SA = estreptavidina; SSC = dispersión lateral.

^ala 9D8-biotina se incubó en primer lugar, antes de añadir SA-APC.

Para todas las muestras de sangre total, se llevó a cabo el ensayo de citometría de flujo de acuerdo con el procedimiento 55656-43. Para cada muestra, los tubos 2 y 3 se incubaron primero con una concentración saturante de 9D8-biotina. Los tubos control de configuración del instrumento de (control de isotipo y manchas individuales) y los tubos de ensayo (tubos 1, 2 y 3) se prepararon manualmente. Después de la primera incubación, se añadieron 2 ml de solución de lisis para lisar los glóbulos rojos, seguido de un ciclo de lavado de las células. Para la segunda incubación, las muestras (tubos 2 y 3) se incubaron con concentraciones saturantes de anticuerpos monoclonales conjugados fluorescentes, frente a CD4 (clon L200) (Tubo 2) o CD8 (clon SK1) (Tubo 3), junto con CD45RA (Clon 5H9) y CD49d (clon 9F10), o los anticuerpos de control de isotipo (Tubo 1). Cada uno de los anticuerpos indicado anteriormente, con la excepción de los anticuerpos de control de isotipo, mostraron reacción cruzada con los leucocitos de monos cynomolgus. También se añadió SA-APC a los tubos 1, 2, y 3 para detectar los anticuerpos biotinilados. Las incubaciones se realizaron en la oscuridad en hielo húmedo durante 30 + 5 minutos. Se realizó una serie de etapas de lavado y luego las células se resuspendieron en tampón fijador. Las muestras se mantuvieron a 2°C - 4 °C durante un mínimo de 30 minutos y se analizaron el mismo día.

El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur® (BD, número de serie E2020). Se analizaron veinticinco mil eventos de linfocitos utilizando un gráfico de dispersión frontal (FSC)/ dispersión lateral (SSC). El análisis de los datos se basó en los linfocitos seleccionados mediante FSC/ SSC y también en los linfocitos seleccionados mediante CD4⁺/ SSC^{bajo} o linfocitos seleccionados mediante CD8⁺/ SSC^{bajo} utilizando el software Pro CellQuest (BD CellQuest Pro, versión 5.2.1). Se generaron citogramas de flujo para establecer la fracción de células positivas para cada marcador de superficie celular.

Las subpoblaciones β7 se analizaron como un porcentaje de células CD4⁺ seleccionadas o células CD8⁺ seleccionadas, y por separado, como media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI). Para analizar los niveles relativos de β7 en la superficie celular de las células CD4⁺ y células CD8⁺, se calcularon las moléculas de equivalencia de fluorescencia solubles (MOEF) multiplicando el GMFI de cada población con una curva estándar generada usando cuentas SpheroTech (SpheroTech, Inc.; Lake Forest, IL). El GMFI y el porcentaje de células seleccionadas se siguieron durante todo el estudio para examinar el efecto del componente de prueba en cada uno de los tres subgrupos de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. El recuento absoluto de células se calculó para cada muestra en cada momento, en base al recuento de linfocitos por microlitro de sangre periférica (proporcionado por Covance).

2.8.2 Ensayo de ocupación: linfocitos CD45RA-β7^{alto} disponibles en sangre periférica

La ocupación de β7 en los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} y linfocitos CD8⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} se midió utilizando un anticuerpo bloqueante anti-β7 (componente de prueba marcado con fluorescencia, rhuMab Beta7) que no se une en

presencia de concentraciones de saturación de rhuMAb Beta7. Se utilizó el conjugado fluorescente Herceptin®, un anticuerpo IgG1 humanizado, como control de isotipo de rhuMAb Beta7.

5 La configuración del panel para el análisis de las muestras de sangre completa se presenta en la Tabla 3. Todos los anticuerpos se adquirieron de BD, con la excepción del Herceptin-Alexa 647 y rhuMAb Beta7-Alexa 647, que los proporcionó Genentech.

Tabla 3

Configuración del panel de sangre completa para medir la ocupación de $\beta 7$ en los linfocitos		
Tubo	Antígeno Marcadores y fluorocromos	Características de la muestra
1	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, Her-Alx647	Her-Alx647 se utilizó como control de isotipo para rhuMAb Beta7
2	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb Beta7-Alx647	insaturado, para detectar la ocupación de $\beta 7$
3	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb Beta7-Alx647	saturado con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rhuMAb Beta7
Alx647 = Alexa 647; FITC = isotiocianato de fluoresceína; Her = Herceptin; PE = ficoeritrina; PerCP = proteína clorofil-peridina		

10 Las muestras de sangre se tiñeron según el procedimiento 55656-50, con concentraciones a saturación de los siguientes conjugados de anticuerpo: CD4 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC; clon M-T477), CD45RA conjugados con ficoeritrina (PE; clon 5H9), CD8 conjugados a PerCP (clon SK1), y Herceptin conjugado a Alexa-647 o rhuMAb Beta7 conjugado a Alexa 647. En el tubo 3, se añadió rhuMAb Beta7 a las muestras de sangre periférica en concentraciones de saturación (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

15 Todas las incubaciones se realizaron en hielo en la oscuridad durante 30-35 minutos. Después de la tinción, las células rojas de la sangre se lisaron, se lavaron las muestras, y las células se resuspendieron en tampón fijador usando Lyse Wash Assistant (BD). SE analizaron veinticinco mil eventos de linfocitos seleccionados mediante una ventana de FSC/ SSC en el FACSCalibur de BD.

20 Los linfocitos se identificaron a partir de un diagrama de dispersión SSC/ FSC. Las células CD4 y CD8 se identificaron mediante un gráfico de SSC/ CD4 FITC o SSC/ CD8 PerCP, respectivamente. El tubo 1 se utilizó como control negativo para la selección. Se identificaron las células CD4⁺ o células CD8⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$, CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{bajo}}$ y CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{intermedio}}$ en los tubos con y sin una concentración saturante de rhuMAb Beta7. La Figura 1 muestra los subgrupos de linfocitos CD4⁺ en la sangre periférica de mono cynomolgus.

2.9 Análisis de datos PD

30 Los recuentos absolutos se calcularon como un porcentaje de los niveles basales antes de la dosis (recuento abs.% BL) para cada uno de los subgrupos de linfocitos CD4⁺ (CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$, CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{bajo}}$ CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$) y linfocitos CD8⁺ (CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$, CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{bajo}}$ y CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$) en cada punto de tiempo en las muestras tomadas de animales a los que se administró vehículo o rhuMAb Beta7. Los valores promedio de los recuentos absolutos individuales, se determinaron para cada grupo como un porcentaje del valor inicial. Para las hembras se utilizaron dos valores previos a la dosis para calcular los valores de la línea de base para todas las evaluaciones de citometría de flujo. Para los machos, debido a las dificultades técnicas (fallo del instrumento), se utilizó sólo un valor antes de la dosis (día de estudio 1) para calcular los valores de referencia para los ensayos de expresión con el anticuerpo no bloqueante 9D8. Se utilizaron los valores seleccionados del total de linfocitos CD4⁺ y linfocitos CD8⁺ obtenidos (como porcentaje) del análisis de citometría de flujo con las configuraciones del panel sanguíneo que se muestran en la Tabla 3 para calcular los recuentos absolutos del total de linfocitos CD4⁺ y el total de los linfocitos CD8⁺, respectivamente, tanto en los ensayos de ocupación como de expresión. La figura 1 muestra los subgrupos de linfocitos CD4⁺ en sangre periférica de mono cynomolgus. Las definiciones de los valores determinados mediante el análisis de citometría de flujo son los siguientes:

45 Recuento abs: recuento absoluto para cada subconjunto respectivo de linfocitos; igual a los recuentos de linfocitos absolutos (un valor obtenido a partir de mediciones de hematología expresado como linfocitos por microlitro de sangre periférica) por el porcentaje de linfocitos seleccionados para cada subconjunto (obtenido a partir de análisis de citometría de flujo).

Recuento abs (% LB): recuento absoluto como porcentaje de los recuentos abs basales obtenidos antes de la dosificación, calculados como los recuentos abs divididos por la media de los recuentos absolutos previos a la dosis.

50 MOEF: moléculas de equivalente e fluorescencia; calculado utilizando la pendiente del canal FL4 por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia

MOEF (% antes de la dosis): MOEF como porcentaje de MOEF previa a la dosificación; calculado como MOEF en el respectivo punto de tiempo después de la dosificación dividido por el MOEF promedio antes de la dosificación.

55 3. Resultados y Discusión

La media del grupo (\pm DE) y los recuentos absolutos cada individuo de mono cynomolgus (% LB) para los subgrupos de linfocitos CD4⁺ de sangre periférica evaluados con el anticuerpo no bloqueantes 9D8 se presentan en las Figuras 2-7.

Los valores promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} aumentaron aproximadamente de 4 a 5 veces sobre los niveles de referencia después de la administración IV de 5 mg/ kg de rhuMab Beta7 (ver Figura 2). La administración de 15 mg/ kg o 50 mg/ kg de rhuMab Beta7 (IV o SC) resultó en aumentos ligeramente mayores (aproximadamente de 5 a 6 veces) en los valores promedio de grupo de los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto}, en comparación con los niveles de referencia (véanse las Figuras 2 y 3). En general, la mayoría de los animales a los que se administraron 15 o 50 mg/ kg (IV o SC) había sufrido efectos PD durante la fase de dosificación, a diferencia de la mayoría de animales en el grupo de dosis de 5 mg/ kg (Figuras 14-18). Los animales que recibieron vehículo no mostraron cambios sustanciales en los valores promedios de grupo de los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} (ver Figuras 2 y 3). Los valores promedios de grupo de los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} se incrementaron en aproximadamente de 4 a 6 veces sobre los niveles basales después de la administración IV de 25 mg/ kg de rhuMab Beta7 (ver Figura 8).

Estos resultados son consistentes con el mecanismo de acción propuesto para el rhuMab Beta7: inhibición del tráfico de linfocitos CD45RA⁻ β 7^{alto} al intestino, lo que lleva a la acumulación de estas células en la circulación periférica (véase la Figura 11). También en apoyo al mecanismo de acción propuesto, no se observaron diferencias sustanciales en los niveles promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} o linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{bajo} en los animales que recibieron vehículo en comparación con los que recibieron rhuMab Beta7 (ver Figuras 4-8).

Al final de la fase de recuperación de 15 semanas (día de estudio 184), el número de linfocitos CD4⁺, CD45RA⁻ β 7^{alto} de sangre periférica volvieron a los niveles basales en 10 de 10 animales en el grupo que recibió una dosis IV de 5 mg/ kg de rhuMab beta7 (véase la Figura 14). En los grupos en los que se administró una dosis IV de 15 mg/ kg y 50 mg/ kg, el número de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} de sangre periférica regresó a la línea de base en 7 de 13 y 2 de 14 animales, respectivamente (véanse las Figuras 15-16). En los animales que recibieron dosis subcutáneas de 15 mg/ kg y 50 mg/ kg, el número de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} regresó a los niveles previos a la dosis en 6 de 14 y 1 de 14 animales, respectivamente (ver las figuras 17-18). Por lo tanto, el retorno a la línea de base de los efectos PD observados parece ser dosis dependiente. No hubo cambios sustanciales en el número de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} en la sangre periférica de animales que recibieron vehículo, con la excepción de 1 animal, que mostró una ligera variabilidad (véase la Figura 13).

Al final de la fase de extensión PD (día de estudio 288), todos los monos cynomolgus a los que se administró rhuMab Beta7 que permanecían en el estudio (n = 3 en el grupo de dosis IV 15 mg/ kg; n = 4 en los grupos de dosis de 50 mg/ kg IV, 15 mg/ kg SC y 50 mg/ kg SC) mostraron reversión de los efectos PD (un retorno a los niveles basales de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto}; véanse las Figuras 15-18). Los subgrupos de linfocitos CD8⁺ de sangre periférica (linfocitos CD8⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto}, CD45RA⁻ β 7^{bajo}, y CD45RA⁺ β 7^{intermedio}) también se examinaron y se observaron resultados similares.

Los niveles relativos de expresión de β 7 en los linfocitos CD4⁺ de sangre periférica se examinaron como MOEF. No hubo evidencia de modulación negativa de β 7 en los linfocitos CD4⁺ de sangre periférica en monos cynomolgus después de dosis IV de 5, 15, o 50 mg/ kg de rhuMab beta7 o dosis SC de 15 o 50 mg/ kg de rhuMab Beta7 (véanse las Figuras 19-22).

En conclusión, la tasa de retorno a los niveles basales de los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} en sangre periférica parecía ser dependiente de la dosis de rhuMab Beta7 en monos cynomolgus. Además, la mayoría de los animales que recibieron 15 o 50 mg/ kg (IV o SC) había sufrido efectos PD durante la fase de dosificación, a diferencia de la mayoría de los animales en el grupo de dosis de 5 mg / kg. Además, los efectos PD parecían estar relacionados con la farmacocinética, debido a que la reversibilidad y el retorno a los niveles basales observado de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} correlacionaba con la eliminación de rhuMab Beta7 y parecía ser dependiente de la dosis. La variabilidad en la tasa de retorno de los efectos PD a los niveles previos a la dosis entre animales del mismo grupo de dosis correlacionaron con cambios en la eliminación de rhuMab Beta7. Estos cambios en la eliminación de rhuMab Beta7 se asocian generalmente con la presencia de anticuerpos anti-terapéuticos (ATA) en algunos animales (véanse las Figuras 14-18;).

7. Conclusiones

Los valores promedio de grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} (fenotípicamente similares a las células residentes en el intestino) aumentaron aproximadamente de 4 a 6 veces, en comparación con los niveles previos a la administración, tras la dosis IV o SC de 5, 15 o 50 mg/ kg de rhuMab Beta7 en monos cynomolgus. Por el contrario, los animales a los que se administró vehículo no mostraron cambios sustanciales en los valores promedio de grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} de sangre periférica hasta el día de estudio 184.

Estos resultados son consistentes con el mecanismo de acción propuesto para el rhuMAb Beta7: inhibición del tráfico de linfocitos CD45RA⁻ β7^{alto} hacia el intestino, a través de la prevención de la unión de α4β7 a sus ligandos. Es esperable de este mecanismo propuesto que de lugar a la acumulación de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en la circulación periférica, que se observó en el estudio. También en apoyo del mecanismo de acción propuesto, no hubo diferencias sustanciales en los niveles promedio del grupo de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ β7^{intermedio} (fenotípicamente similares a células CD4⁺ vírgenes) o linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{bajo} (fenotípicamente similares a las células CD4⁺ residentes en la periferia) en monos cynomolgus a los que se ha administrado vehículo, en comparación con los animales que recibieron rhuMAb Beta7.

Al final de la fase de recuperación de 15 semanas (día de estudio 184), el número de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en sangre periférica volvió a los niveles previos a la dosis en todos los animales (10 de 10) en el grupo que recibió una dosis IV de 5 mg/ kg de rhuMAb Beta7. En los animales que recibieron 15 mg/ kg o 50 mg/ kg de rhuMAb Beta7, el número de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en sangre periférica volvió a los niveles anteriores a la dosis en 7 de 13 y 2 de 14 animales en los grupos de dosis IV (respectivamente) y en 6 de 14 y 1 de 14 animales en los grupos de dosis SC (respectivamente). Al final de la fase de extensión PD (el día de estudio 288) todos los monos cynomolgus a los que se administró rhuMAb Beta7 y que permanecían en el estudio mostraron reversión de los efectos PD.

Estos resultados indican una dependencia de la dosis aparente en el retorno a los niveles basales de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en sangre periférica. Además, los efectos PD parecieron estar relacionados con la farmacocinética, debido a la reversibilidad observada y el retorno a la línea de base de los valores de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} correlacionado con la eliminación de rhuMAb Beta7. La variabilidad en la tasa de retorno de los efectos PD a los niveles previos a la dosis entre animales del mismo grupo de dosis correlacionaron con cambios en la eliminación de rhuMAb Beta7, que se asoció con la presencia de ATA en algunos animales.

Referencias

1. Andrew DP, Berlin C, Honda S, et al. Distinct but overlapping epitopes are involved in α4β7-mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal adhesion molecule-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation. *J Immunol* 1994;153:3847-61.
2. Butcher EC, Williams M, Youngman K, et al. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 1999;72:209-53.
3. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, et al. Integrin αEβ7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993;150:3459-70.
4. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the α4β7 integrin. *N Engl J Med* 2005;352:2499-507.
5. Holzmann B, McIntyre BW, Weissman IL. Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α-chain homologous to human VLA-4-α. *Cell* 1989;56:37-46.
6. Hu MC, Crowe DT, Weissman IL, et al. Cloning and expression of mouse integrin αp(β7): a functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8254-8.
7. Rose JR, Williams MB, Rott LS, et al. Expression of the mucosal homing receptor α4β7 correlates with the ability of CD8+ memory T cells to clear rotavirus infection. *J Virol* 1998;72:726-30.
8. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, et al. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with β7 integrins and memory differentiation. *J Immunol* 1996;156(10):3727-36.
9. Rott LS, Rose JR, Bass D, et al. Expression of mucosal homing receptor α4β7 by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *J Clin Invest* 1997;100:204-8.
10. Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005;353:1912-25.
11. Williams MB, Butcher EC. Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen. *J Immunol* 1997;159:1746-52.
12. Williams MB, Rose JR, Rott LS, et al. The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, α4β7. *J Immunol* 1998;161:4227-35.

Ejemplo 2

Evaluación piloto de cuatro semanas de farmacocinética y seguridad de RhuMAb β7 (PRO145223) administrado semanalmente vía endovenosa a monos cynomolgus con una recuperación de veintitrés semanas

Resumen

El rhuMAb β7 (también denominado PRO145223) es una inmunoglobulina G1 humanizada (IgG1) contra β7 humana que se une a las integrinas αEβ7 y α4β7 en los linfocitos en seres humanos y monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Las células que expresan las integrinas α4β7 y αEβ7 se cree que tienen un papel importante en las enfermedades inflamatorias del intestino, tales como la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (CD). El

RhuMAb $\beta 7$ está siendo investigado como un potencial agente terapéutico para los pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales como la CD y CU. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la seguridad, y los efectos de farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) del RhuMAb $\beta 7$ tras la administración por vía intravenosa (IV) una vez por semana durante 4 semanas a los monos cynomolgus y caracterizar la reversibilidad de cualquier efecto adverso relacionado con el fármaco durante un período de recuperación de 23 semanas. Se administró a los grupos de monos cynomolgus cuatro dosis IV semanales de vehículo o rhuMAb $\beta 7$ en 5 o 25 mg/ kg. Se practicó la necropsia a 3 machos y 3 hembras de cada grupo de dosis 7 días después de la dosis final; los animales restantes (2/ sexo/ grupo) del grupos de vehículo y de dosis 25 mg/ kg se observaron durante 23 semanas después de la dosis final antes de la necropsia.

En general, el perfil de concentración en suero - tiempo del rhuMAb $\beta 7$ después de cuatro dosis IV semanales fue bifásico, con una fase de distribución rápida inicial seguida de una fase de eliminación más lenta. Después de cuatro dosis en bolo IV semanales de 5 o 25 mg/ kg de rhuMAb $\beta 7$ a los monos cynomolgus, las concentraciones séricas mínimas aumentaron después de la segunda dosis, excepto cuando se detectaron anticuerpos anti-terapéuticos (ATA). El área normalizada de dosis bajo el perfil de concentración sérica - tiempo desde el día 0 al día 7 (AUC_{0-7} / dosis) después de la primera dosis fue similar para los grupos de dosis 5 mg/ kg y 25 mg/ kg, lo que sugiere que el rhuMAb $\beta 7$ muestra una farmacocinética proporcional a la dosis en los monos cynomolgus en el rango de dosis estudiado. Para el grupo de dosis de 25 mg/ kg, la AUC_{0-7} y la concentración máxima en suero (C_{max}) se incrementó aproximadamente 2 veces después de la última dosis, en comparación con la primera dosis. Ambos hallazgos sugirieron que había acumulación del rhuMAb $\beta 7$ tras cuatro dosis semanales IV de 25 mg/ kg a monos cynomolgus, aunque es esperable tal acumulación para un anticuerpo con una vida media larga a estas dosis. El análisis compartimental de los datos de los animales en recuperación de 25 mg/ kg estimó una lenta eliminación de 2,93 ml/ día/ kg y una vida media relativamente larga de 14,5 días. Sin embargo, 3 de los 4 monos mostró ATA, que contribuyeron probablemente a la eliminación más rápida del rhuMAb $\beta 7$.

La saturación de las células T de sangre periférica y los aumentos en los niveles de células T $\beta 7^+$ circulantes se exploraron como marcadores PD. Los ensayos de ocupación de los receptores de integrina $\beta 7$ sugirieron que los receptores $\beta 7$ en subgrupos de células T en sangre periférica estaban totalmente saturados después de la primera de las cuatro dosis semanales de 5 o 25 mg/ kg de rhuMAb $\beta 7$ a los monos cynomolgus. La ocupación de los receptores de $\beta 7$ en las células T de sangre periférica se mantuvo cuando las concentraciones séricas se encontraron por encima de aproximadamente 1-10 μ g/ ml y la detección de la $\beta 7$ disponible correlacionó con una disminución de las concentraciones séricas de rhuMAb $\beta 7$. Las células T CD45RA $^-$ $\beta 7^{alto}$ (fenotípicamente similares a las células T residentes en el intestino en humanos y ratones) aumentó aproximadamente 5 veces sobre los niveles basales después de cuatro dosis semanales de 25 mg/ kg a monos cynomolgus. Del mismo modo, las células T CD45RA $^+$ $\beta 7^{intermedio}$ (fenotípicamente similares a las células T vírgenes humanas) también aumentaron después de cuatro dosis semanales de 25 mg/ kg (aproximadamente 2,5 veces sobre los niveles de referencia). Por el contrario, las células T CD45RA $^-$ $\beta 7^{bajo}$ permanecieron estables durante todo el estudio. Estos hallazgos son consistentes con el mecanismo de acción de rhuMAb $\beta 7$, es decir la inhibición de tráfico de linfocitos $\beta 7$ -positivo hacia el intestino a través de la inhibición de la unión de $\alpha 4\beta 7$ a sus ligandos, que entonces conduce a la acumulación de estas células en la circulación periférica. Estos fenómenos se estudiarán con más detalle en futuros estudios en monos cynomolgus.

Introducción

$\beta 7$ rhuMAb (también denominado PRO145223) es una inmunoglobulina G1 humanizada (IgG1) anti- $\beta 7$ humana que se une a las integrinas $\alpha E\beta 7$ y $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos en seres humanos y primates no humanos. El rhuMAb $\beta 7$ bloquea las interacciones de $\alpha 4\beta 7$ con MadCAM-1, VCAM-1 y fibronectina con afinidades (50% de la concentración inhibitoria máxima [CI_{50}]) de 0,07 a 0,1 nM, y también bloquea la unión a E-cadherina de $\alpha E\beta 7$ con una CI_{50} de 5 nM. Se cree que las células que expresan las integrinas $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha E\beta 7$ tienen un papel importante en las enfermedades inflamatorias del intestino, como la enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). El RhuMAb $\beta 7$ se está investigando como un potencial agente terapéutico para los pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales como la CD y CU.

Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la seguridad, y los efectos farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) del RhuMAb $\beta 7$ tras la administración intravenosa (IV) una vez por semana durante 4 semanas a monos Cynomolgus (Macaca fascicularis) y caracterizar la reversibilidad de los efectos adversos relacionados con el componente de prueba durante un período de recuperación de 23 semanas. El objetivo de este estudio es reportar los resultados de los análisis de PK y citometría de flujo.

Materiales y métodos

Material de prueba

El RhuMAb $\beta 7$ (PRO145223), lote M3-TOX132, lo proporcionó Genentech como un líquido transparente o ligeramente opalescente, de incoloro a ligeramente amarillo a una concentración de 20 mg/ ml (4,5 ml/ vial). El vehículo de rhuMAb $\beta 7$, lote M3-TOX133, también se proporcionó como un líquido transparente o ligeramente opalescente, incoloro o ligeramente amarillo (10,5 ml/ vial). Antes de utilizarse en el estudio, los materiales de ensayo se almacenaron en un refrigerador regulado para mantener un rango de temperatura de 2°C y 8°C.

Especies

Veintiséis monos cynomolgus vírgenes para el material de prueba se obtuvieron de la granja de SNBL USA. Los animales pesaron 2,6 kg y tenían 2-5 años de edad al inicio del tratamiento. Los animales se aclimataron durante al menos 1 semana antes de la iniciación del tratamiento. Sólo los animales que parecían estar sanos y que estaban libres de anomalías obvias se utilizaron para el estudio.

Diseño del estudio

Los animales fueron asignados al azar a uno de los tres grupos y recibieron cuatro dosis IV semanales de material de ensayo. Los animales en el grupo 1 (5 machos y 5 hembras) recibieron vehículo de rhuMAb $\beta 7$. Los animales en el grupo 2 (3 machos y 3 hembras) y el grupo 3 (5 machos y 5 hembras) recibieron rhuMAb $\beta 7$ a 5 y 25 mg/ kg, respectivamente. A 3 machos y 3 hembras de cada grupo se les realizó necropsias terminales 7 días después de la última dosis. 2 machos y 2 hembras del grupo al que se le administró vehículo o 25 mg/ kg de RhuMAb $\beta 7$ se siguieron durante un período de recuperación de aproximadamente 23 semanas antes de la necropsia de recuperación.

. El diseño del estudio se resume en la Tabla 2_1.

Tabla 2_1

Diseño del estudio						
Grupo	Nº/ Sexo	Ruta	Material de ensayo	Nivel de dosis (mg/ kg)	Conc. Dosis (mg/ mL)	Volumen dosis ^a (mL/ kg)
1	5/ M, 5/ F	IV	Vehículo rhuMAb $\beta 7$	0	0	1.25
2	5/ M, 5/ F	IV	rhuMAb $\beta 7$	5	20	0.25
3	5/ M, 5/ F	IV	rhuMAb $\beta 7$	25	20	1.25

Conc = concentración; IV = intravenosa.
 Nota: 3 machos y 3 hembras de cada grupo fueron designados como animales de necropsia terminal. Los animales restantes de los grupos 1 y 3 fueron designados como animales de necropsia de recuperación.
^a El volumen de dosis se calcula en base al peso corporal más reciente.

Preparación de la dosis

Genentech proporcionó el material de prueba para cada grupo a la concentración apropiada.

Dosis de administración

Se calcularon los volúmenes de dosis individuales en base a los pesos corporales que se registraron en el día de la administración del fármaco. Los animales recibieron material de ensayo por vía intravenosa a través de la vena safena. Inmediatamente después de la administración de las dosis, pero antes de que se retirara la aguja del animal, el aparato de dosificación se lavó abundantemente con aproximadamente 1 ml de NaCl al 0,9%.

Recogida de muestras de sangre

Todas las muestras de sangre fueron recogidas utilizando una aguja y una jeringa a través de la vena safena, femoral o cefálica.

Análisis PK

Se recogió sangre (aproximadamente 1,2 ml) de cada animal y se preparó suero en los siguientes puntos temporales para el análisis PK:

- antes de la dosis del día de estudio 1 y tras 15 minutos, 6, 24, y 72 horas después de la dosis
- antes de la dosis en los días de estudio 8 y 15
- antes de la dosis el día de estudio 22, y tras 15 minutos, 6, 24, y 72 horas después de la última dosis
- los días de estudio 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92, 99, 106, 113, 120, 127, 134, 141, 148, 155, 162, 169, 176 y 183
- el día de las necropsias terminal y de recuperación (días de estudio 29 y 191)

Sin embargo, para el análisis PK, los puntos de tiempo se convirtieron para comenzar el día 0 y se mencionan en este informe como días 0, 0,0104, 0,25, 1, 3, 7, 14, 21, 21,0104, 21,25, 22, 24, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112, 119, 126, 133, 140, 147, 154, 161, 168, 175, 182, y 190.

5

Análisis de los anticuerpos anti-terapéutico

Las mismas muestras de suero utilizadas para el análisis de PK se utilizaron para el análisis de anticuerpos anti-terapéutico (ATA). La respuesta ATA se analizó en los siguientes puntos de tiempo:

10

- antes de la dosis en los días de estudio 1, 8, 15 y 22
- los días de estudio 50, 71, 92, 113, 134, 155 y 176
- el día de las necropsias terminal y de recuperación (días de estudio 29 y 191)

15

Sin embargo, para el análisis de ATA, los puntos de tiempo se convirtieron al comenzar el día 0 y se mencionan en este informe como los días 0, 7, 14, 21, 28, 49, 70, 91, 112, 133, 154, 175 y 190.

Análisis de citometría de flujo

20

Se recogió sangre (aproximadamente 1,5 ml) de cada animal en los siguientes puntos de tiempo para el ensayo de citometría de flujo de linfocitos totales (células B, células T y células asesinas naturales [NK]):

25

- día 8 (antes de la dosis)
- antes de la dosis el día 1 y 24 horas después de la primera dosis
- antes de la dosis en el día 15 y 24 horas después de la segunda dosis
- antes de la dosis en el día 22 y 24 horas después de la tercera dosis
- días 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169 y 183
- el día de las necropsias terminal y de recuperación (días de estudio 29 y 191)

30

Se recogió sangre (aproximadamente 1,5 ml) de cada animal en los siguientes puntos de tiempo para el ensayo de citometría de flujo de ocupación:

35

- antes de la dosis el día 1 y 24 horas después de la primera dosis
- antes de la dosis en el día 15 y 24 horas después de la segunda dosis
- antes de la dosis en el día 22 y 24 horas después de la tercera dosis
- días 57, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169 y 183
- el día de las necropsias terminal y de recuperación (días de estudio 29 y 191)

40

Para el análisis de las células T CD4+ y CD8+ que expresan $\beta 7$ totalmente ocupadas y desocupadas, se recogió sangre (aproximadamente 1,5 ml) de cada animal en los siguientes puntos de tiempo:

45

- antes de la dosis el día 1 y 24 horas después de la primera dosis
- antes de la dosis en el día 15 y 24 horas después de la segunda dosis
- antes de la dosis en el día 22 y 24 horas después de la tercera dosis
- días 57, 99, 113, 127, 141, 155, 169 y 183
- el día de las necropsias terminal y de recuperación (días de estudio 29 y 191)

Procesamiento de las muestras de sangre

50

Análisis PK y de ATA

Inmediatamente después de la recogida, las muestras se transfirieron a tubos separadores de suero y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 a 80 minutos. Las muestras se centrifugaron a 2000 mg durante 15 minutos a temperatura ambiente. El suero se recogió y se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml etiquetados.

55

Análisis de citometría de flujo

Inmediatamente después de la recogida, las muestras de sangre completa para el análisis de citometría de flujo se transfirieron a tubos de heparina sódica en el SNBL de acuerdo con el protocolo de estudio y se enviaron a Genentech para el análisis. Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo húmedo o se almacenaron a una temperatura de 2°C a 8°C hasta que se analizaron por citometría de flujo.

60

Ensayos

65

Concentraciones séricas

Las muestras de suero fueron analizadas por ELISA cuantitativo para medir los niveles totales de RhuMAB $\beta 7$. Este ensayo se realizó de acuerdo con el borrador del resumen del desarrollo del ensayo de la libreta 47886-27 y del borrador del procedimiento estándar de operación (SOP) de la libreta 47886-22 para todas las muestras. En primer lugar, se recubrieron las placas de microtitulación de 96 pocillos con las cadenas pesada y ligera (H y L) de la IgG de oveja anti-humana, pre-absorbida con suero de mono. Este anticuerpo se obtuvo de The Binding Site (Birmingham, Reino Unido; Catálogo AU003.CUS01; Lote 086001) y se diluyó a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en carbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6. Se utilizó rhuMAB $\beta 7$ humano recombinante (lote 46994-8, producido en Genentech) como estándar. La curva estándar varió desde 0,781 hasta 50,0 ng/ mL. Los anticuerpos utilizados para determinar la curva estándar, los controles de matriz y las muestras se diluyeron en diluyente de ensayo (solución salina tamponada con fosfato [PBS], 0,5% de albúmina de suero bovino [BSA], 0,05% de polisorbato 20, 0,05% de Proclin 300, 0,25% de tampón CHAPS, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 5 mM, NaCl 0,35 M). Las muestras se diluyeron un mínimo de 1/20.

Se obtuvo IgG de oveja anti-humano marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (H y L, pre-absorbida con suero de mono) de The Binding Site (Catálogo CUS1684.H; Lote 11245) y se usó como conjugado. La señal se generó usando peroxidasa de tetrametilbencidina como sustrato de la HRP. Los datos de los controles y las muestras se corrigieron con la dilución, y se promediaron los valores para cada dilución. La concentración mínima cuantificable en el suero de mono cynomolgus puro se determinó en 20 ng/ ml, en base al límite de ensayo de 1 ng/ ml y la dilución mínima de 1/20.

Determinación de la respuesta ATA

Las muestras de suero de monos cynomolgus se analizaron mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia de enlace para determinar el nivel de respuesta de anticuerpos contra el rhuMAB $\beta 7$. Este ensayo se realizó de acuerdo con el borrador de resumen de desarrollo del ensayo de la libreta 47886-48 para los anticuerpos contra rhuMAB $\beta 7$. Se obtuvieron anticuerpos policlonales dirigidos contra la IgG humana (H y L, pre-absorción con suero de mono) de The Binding Site y se utilizaron como sustitutos del control positivo. Los controles y las muestras se diluyeron en diluyente de muestra (tampón HEPES, 2% de gelatina de pescado, 0,05% de polisorbato 20, 0,05% de PROCLIN300, NaCl 0,15 M, suero bovino fetal al 10%) y se añadieron a una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. Las muestras se diluyeron un mínimo de 1/10. Se utilizaron como conjugados el RhuMAB $\beta 7$ biotinilado y RhuMAB $\beta 7$ marcado con BV. Al día siguiente, las Dynabeads recubiertas de estreptavidina-M280 (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) se diluyeron en diluyente de ensayo (tampón HEPES, 2% de gelatina de pescado, 0,5% de polisorbato 20, 0,05% de PROCLIN300, NaCl 0,15 M) y se añadieron a las placas. La respuesta del ensayo se midió en unidades de electroquimioluminiscencia. El punto de corte se estableció basándose en el valor del control negativo, y se utilizó para calcular los valores de titulación para las muestras y controles positivos. El título mínimo obtenido para el análisis de anticuerpos rhuMAB $\beta 7$ es de 1.0.

Análisis de citometría de flujo

Total de subgrupos de células T CD4+ y CD8+ que expresan $\beta 7$ en sangre periférica

Las células totales CD4+ y CD8+ que expresan $\beta 7$ se midieron utilizando el 9D8, un anticuerpo anti- $\beta 7$ dirigido contra un epítipo diferente que el rhuMAB $\beta 7$. La configuración del panel para el análisis de muestras de sangre completa se presenta en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2

Configuración del panel de sangre completa		
Tubo	Marcadores de antígeno: fluorocromo	Tipos de células identificadas
1	IgG-FITC, IgG-PE, CD4-PerCP, SA-APC	Isotipo utilizado para clasificar la población en CSS y FSC, y establecer las marcas de cuadrante
2	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD4-PerCP o CD4-PerCP-Cy5.5, 9D8-biotina/ SA-APC ^a	subgrupos de células T CD4+ que expresan $\alpha 4$ y $\beta 7$
3	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD8-PerCP o CD8-PerCP-Cy5.5, 9D8-biotina/ SA-APC ^a	subgrupos de células T CD8+ que expresan $\alpha 4$ y $\beta 7$
FSC = dispersión frontal; SA = estreptavidina; SSC = dispersión lateral.		
^a la 9D8-biotina se incubó en primer lugar, antes de añadir SA-APC.		

Para todas las muestras de sangre total, el ensayo de citometría de flujo se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos 48038-29 y 48038-84. Los tubos 2 y 3 para cada muestra se incubaron primero con concentraciones a saturación de 9D8-biotina, un anticuerpo anti- $\beta 7$ que se une a $\beta 7$ en presencia de rhuMAB $\beta 7$. Los tubos control de configuración del instrumento (control de isotipo y manchas individuales) y los tubos de ensayo (Nº 1, 2 y 3) se prepararon de forma manual. Después de la primera incubación, se añadieron 2 ml de solución de lisis para lisar las células rojas seguido de un ciclo de lavado de las células. Para la segunda incubación, las muestras (tubos 2 y 3) se incubaron con concentraciones saturantes de anticuerpos monoclonales conjugados fluorescentes frente a CD4 (Clon M-T477), CD8 (clon SK1), CD45RA (Clon 5H9) y CD49d (Clon 9F10), que se sabe que tienen reacción

5 cruzada con los leucocitos de monos cynomolgus, o con los anticuerpos control de isotipo (Tubo 1). También se añadió estreptavidina-APC (SA-APC) a los tubos 1, 2, y 3 para detectar los anticuerpos biotinilados. Ambas incubaciones se realizaron en la oscuridad en hielo durante 60 ± 5 minutos. Se realizó una serie de etapas de lavado con un paso final de resuspensión de las células en tampón fijador. Las muestras se mantuvieron a $2^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 30 minutos y se analizaron el mismo día.

10 El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur® (BD Biosciences, San Jose, CA) con el número de serie E3982. Se analizaron veinticinco mil eventos de linfocitos utilizando un gráfico de dispersión frontal (FSC)/ dispersión lateral (SSC). El análisis de los datos se basó en los linfocitos seleccionados mediante FSC/ SSC, y dependiendo de la combinación del cóctel, también en las células T seleccionadas por $\text{CD4}^{+}/\text{SSC}^{\text{bajo}}$ o $\text{CD8}^{+}/\text{SSC}^{\text{bajo}}$ utilizando el software Pro CellQuest (BD CellQuest Pro, versión 5.2). Se generaron citogramas de flujo para establecer la fracción de células positivas para cada marcador de superficie celular.

15 Las subpoblaciones $\beta 7$ se analizaron como un porcentaje de células T seleccionadas, y por separado, como media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI). Para cada muestra en cada punto de tiempo, las moléculas de fluorescencia soluble equivalente (MOEF) se calcularon multiplicando el GMFI de cada población con una curva estándar, generada mediante el estándar de cuentas Spherotech. El GMFI y el porcentaje de células seleccionadas como linfocitos T CD4^{+} y CD8^{+} de la población que expresa $\text{CD49d}^{+}\text{9D8}^{\text{inf}}$, $\text{CD45RA}^{+}\text{9D8}^{\text{alto}}$, $\text{CD45RA}^{+}\text{9D8}^{\text{bajo}}$, CD45RA^{+} , y CD45RA^{-} se siguieron durante todo el estudio para examinar el efecto del fármaco en cada subconjunto. Para cada muestra en cada punto de tiempo y cada subconjunto de linfocitos, el recuento absoluto de células se calculó en base al recuento de linfocitos por μL de sangre periférica proporcionado por el SNBL.

20 Las subpoblaciones $\beta 7$ se analizaron como un porcentaje de células T seleccionadas, y por separado, como media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI). Para cada muestra en cada punto de tiempo, las moléculas de fluorescencia soluble equivalente (MOEF) se calcularon multiplicando el GMFI de cada población con una curva estándar, generada mediante el estándar de cuentas Spherotech. El GMFI y el porcentaje de células seleccionadas como linfocitos T CD4^{+} y CD8^{+} de la población que expresa $\text{CD49d}^{+}\text{9D8}^{\text{inf}}$, $\text{CD45RA}^{+}\text{9D8}^{\text{alto}}$, $\text{CD45RA}^{+}\text{9D8}^{\text{bajo}}$, CD45RA^{+} , y CD45RA^{-} se siguieron durante todo el estudio para examinar el efecto del fármaco en cada subgrupo. Para cada muestra en cada punto de tiempo y cada subconjunto de linfocitos, el recuento absoluto de células se calculó en base al recuento de linfocitos por μL de sangre periférica proporcionado por el SNBL.

Ocupación de $\beta 7$ en subgrupos de células T CD4^{+} y CD8^{+} en sangre periférica

25 La configuración del panel para el análisis de muestras de sangre completa se presenta en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3

Configuración del panel de sangre completa		
Tubo	Marcadores de antígeno: fluorocromos	Tipos celulares identificados
1	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, Her-Alx647	control negativo
2	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb Beta7-Alx647	tubo insaturado, para detectar la ocupación de $\beta 7$
3	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb Beta7-Alx647	tubo saturado con $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de PR0145223
Her = Herceptin®		

30 Las muestras de sangre se tiñeron según el protocolo en la libreta de laboratorio 47237, pág. 48, con concentraciones a saturación de los siguientes conjugados de anticuerpo: CD4 conjugados con FITC (clon M-T477), CD45RA conjugados con ficoeritrina (PE; clon 5H9), CD8 conjugados con PerCP (clon SK1), y Herceptin® conjugado a Alexa-647 o rhuMAb $\beta 7$ conjugado con Alexa 647. En el tubo 3, el componente de prueba rhuMAb $\beta 7$ (PRO145223) se diluyó a la concentración de saturación ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) y se añadió a las muestras de sangre.

35 Todas las incubaciones se realizaron en hielo en la oscuridad durante 30 ± 5 minutos. Después de la tinción, las células rojas de la sangre se lisaron, se lavaron las muestras, y las células se resuspendieron en tampón fijador usando Lyse Wash Assistant (BD Biosciences). Se analizaron veinticinco mil eventos de linfocitos seleccionados mediante una ventana de dispersión frontal/ dispersión lateral en el FACSCalibur de BD (BD Biosciences).

40 Los linfocitos se identificaron a partir de un diagrama de dispersión SSC/ FSC. Las células CD4^{+} y CD8^{+} se identificaron mediante un gráfico de SSC/ CD4FITC y un gráfico SSC/ CD8PerCP , respectivamente. El tubo 1 se utilizó como control negativo para crear las ventanas. Los linfocitos que muestran $\beta 7^{\text{alto}}/\text{CD45RA}^{-}$, $\beta 7^{\text{bajo}}/\text{CD45RA}^{-}$ y $\beta 7^{\text{intermedio}}/\text{CD45RA}^{+}$ se identificaron para los tubos con y sin una concentración saturante de rhuMAb $\beta 7$. El GMFI y el porcentaje de células seleccionadas se registraron y luego el GMFI se expresó como MOEF utilizando la pendiente del canal APC en el que MOEF® pendiente del GMFI del canal FL4.

45 Todas las incubaciones se realizaron en hielo en la oscuridad durante 30 ± 5 minutos. Después de la tinción, las células rojas de la sangre se lisaron, se lavaron las muestras, y las células se resuspendieron en tampón fijador

usando Lyse Wash Assistant (BD Biosciences). Se analizaron veinticinco mil eventos de linfocitos seleccionados mediante una ventana de dispersión frontal/ dispersión lateral en el FACSCalibur de BD (BD Biosciences).

Los linfocitos se identificaron a partir de un diagrama de dispersión SSC/ FSC. Las células CD4⁺ y CD8⁺ se identificaron mediante un gráfico de SSC/ CD4FITC y un gráfico SSC/ CD8PerCP, respectivamente. El tubo 1 se utilizó como control negativo para crear las ventanas. Los linfocitos que muestran $\beta 7^{\text{alto}}/CD45RA^-$, $\beta 7^{\text{bajo}}/CD45RA^-$ y $\beta 7^{\text{intermedio}}/CD45RA^+$ se identificaron para los tubos con y sin una concentración saturante de rhuMab $\beta 7$. El GMFI y el porcentaje de células seleccionadas se registraron y luego el GMFI se expresó como MOEF utilizando la pendiente del canal APC en el que MOEF@ pendiente del GMFI del canal FL4.

Análisis de citometría de flujo de los subgrupos de linfocitos de sangre periférica (Total de células B, células T y células NK)

La configuración del panel para el análisis de muestras de sangre completa se presenta en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4

Configuración del panel de sangre completa		
Nº Tubo	Marcadores de antígeno: fluorocromos	Tipos celulares identificados
1	IgG-FITC, IgG-PE, IgG-PerCP, IgG-APC	isotipo utilizado para seleccionar la población en SSC y FSC y configurar los marcadores de cuadrante.
2	CD4-FITC, CD45-PE, CD3- PerCP, CD20-APC	células B, células T y subgrupos de células T

FSC = dispersión frontal; SSC = dispersión lateral.

Para todas las muestras de sangre total, el ensayo de citometría de flujo se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento 48038-36. Las muestras se incubaron con concentraciones a saturación de anticuerpos monoclonales conjugados fluorescentes frente a CD4 (Clon M-T477), CD45 (Clon TU116), CD3 (Clon SP34-2) y CD20 (Clon L27), que se sabe que reaccionan de forma cruzada con los leucocitos de mono cynomolgus, junto con controles de isotipo apropiados. Los tubos de control de puesta a punto del equipo y los tubos de ensayo se prepararon manualmente. Todas las incubaciones se realizaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30±5 minutos.

Análisis de datos PK

Se utilizaron muestra tiempos de recogida de muestras nominales en el análisis de datos, con una desviación mínima del programa. Se calcularon las concentraciones medias (\pm DE) de rhuMab $\beta 7$ para cada muestra de suero usando el programa Excel® de MS (Microsoft Corp.; Redmond, WA), y los puntos de datos se representaron usando KaleidaGraph™ (Synergy Software, Reading, PA). Excepto por el punto de tiempo antes de la dosis, las concentraciones séricas determinadas como menos que reportables (LTR) se trataron como puntos perdidos y no se utilizaron en la presentación o el análisis de los datos de PK. Para los cálculos de datos de PK, el día de estudio 1 se convirtió en el día PK 0 para indicar el inicio de la dosificación (véase la recogida de muestras de sangre).

Análisis no compartimental de PK

Los datos de las concentraciones séricas en tiempo de cada animal en el grupo de dosis de 5 mg / kg hasta 7 días después de la primera dosis se analizaron utilizando el modelo de entrada de bolo IV (Modelo 201, WinNonlin-Pro, versión 5.0.1; Pharsight Corporation; Mountain View, CA). No se analizaron los datos siguientes de la última dosis en el grupo de dosis de 5 mg / kg debido a que las concentraciones en suero se vieron afectadas por ATA después de la segunda o tercera dosis. Los datos de las concentraciones séricas en tiempo de cada animal en el grupo de dosis de 25 mg / kg durante 7 días después de la primera y la última dosis también fueron analizados utilizando el modelo de entrada de bolo IV (Modelo 201). Los siguientes métodos se utilizaron para calcular los parámetros farmacocinéticos específicos:

- C_{max}: concentración máxima en suero después de una dosis en bolo IV.
- AUC₀₋₇: El área bajo la curva de concentración de suero-tiempo desde Tiempo = 0 al día 7 PK se calculó usando la regla trapezoidal lineal.
- AUC₂₁₋₂₈: El área bajo la curva de concentración de suero-tiempo desde Tiempo = día 21 PK al día 28 PK se calculó usando la regla trapezoidal lineal.
- AUC_{all}: El área bajo la curva de concentración de suero-tiempo desde Tiempo = 0 al último día PK de los datos de los animales de recuperación se calculó usando la regla trapezoidal lineal.
- V₁: Volumen de distribución en el compartimento central (Dosis / C_{max}).

Análisis PK de dos compartimentos.

Se utilizó un modelo de dos compartimentos con entrada de bolo IV, eliminación de primer orden, y constantes de microtasa (Modelo 7, WinNonlin-Pro, versión 5.0.1) para analizar la media de los datos de concentración-tiempo de

los 4 animales de recuperación en el grupo de dosis de 25 mg/kg. Las siguientes opciones y métodos de modelado se utilizaron para estimar los parámetros farmacocinéticos específicos:

Las estimaciones iniciales de A, B, α , y β se determinaron gráficamente mediante WinNonlin.
El análisis ponderado utilizó PESO = -2.

Se utilizó el algoritmo de minimización Nelder-Mead.

La selección del modelo se basó en la bondad del ajuste mediante inspección visual y por la comparación entre el modelo de criterio de información de Akaike (AIC).

CL: Aclaramiento (Dosis / AUC)

$t_{1/2,\beta}$: Vida media de la fase beta; vida media terminal ($\ln[2]/\beta$)

V_{ss} : Volumen de distribución en estado estacionario ($MRT_{inf} \cdot CL$)

Las intercepciones en tiempo cero asociados con las fases alfa y beta (A y B, respectivamente), constantes de macrotasa (α y β), y las constantes de microtasa intercompartimental (k_{10} , k_{12} y k_{21}) se proporcionan en la Tabla 7.

Análisis de citometría de flujo

Se calculó el recuento absoluto como porcentaje de la línea basal para cada uno de los subgrupos de células T CD4 y CD8 (CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$, CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{bajo}}$, y CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$) y células T CD4⁺ CD3⁺, células T (CD8) CD4⁻ CD3⁺, células (NK) CD3⁻ CD20⁻ y células B CD20⁺ en cada punto de tiempo en el estudio para los animales tratados con vehículo y rhuMAb $\beta 7$. Se hizo la media de los recuentos absolutos individuales como porcentaje de la línea basal para cada grupo de tratamiento (vehículo, 5 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$, y 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$) para calcular las medias de los grupos. Las definiciones de los valores determinados por análisis de citometría de flujo son los siguientes:

Recuento Abs: recuento absoluto para cada subgrupo correspondiente de linfocitos; igual a los recuentos de linfocitos absolutos (un valor obtenido a partir de mediciones de hematología expresada como linfocitos por μl de sangre periférica) multiplicado por el porcentaje de linfocitos seleccionados para cada subgrupo (obtenido a partir de análisis de citometría de flujo).

Recuento Abs (% LB): recuentos absolutos como porcentaje de los recuentos abs de línea basal obtenidos antes de la dosificación; calculado como recuento Abs dividido por la media de los recuentos absolutos previos a la dosis.

MOEF: moléculas de equivalentes de fluorescencia; calculado utilizando la pendiente del canal FL4 multiplicado por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

MOEF (% predosis): MOEF como un porcentaje de MOEF antes de la dosificación; calculado como el MOEF en el correspondiente punto de tiempo después de la dosificación dividido por la media de MOEF antes de la dosificación.

Resultados y discusión

Análisis de datos PK

Después de cuatro dosis en bolo IV semanales de 5 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ a monos Cynomolgus, la concentración media de suero 15 minutos después de la primera dosis fue de 173 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 125-207 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con los 15 minutos después de la última dosis, que era 196 $\mu\text{g/ml}$ (intervalo: 70,9 a 326 $\mu\text{g/ml}$). Las concentraciones medias séricas mínimas antes de la segunda, tercera y cuarta dosis fueron de 56,5 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 28,7-77,1 $\mu\text{g/ml}$), 35,1 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 0,0401 a 97,1 $\mu\text{g/ml}$), y 60,2 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 4,29 a 137 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. La variabilidad en las concentraciones séricas mínimas después de la segunda dosis puede explicarse por la presencia de ATA, porque los 6 monos en este grupo de dosis de 5 mg / kg desarrollaron una respuesta ATA que se detectó después de la segunda dosis; 1 mono tenía los títulos de anticuerpos anti-humanos positivos antes de la primera dosis de rhuMAb $\beta 7$. Los 4 monos con las concentraciones mínimas más bajas tenían los títulos más altos de ATA.

Después de cuatro dosis en bolo IV semanales de 25 mg/kg $\beta 7$ de rhuMAb $\beta 7$ a monos Cynomolgus, la concentración media de suero de 15 minutos después de la primera dosis fue de 917 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 740-1070 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con los 15 minutos después de la última dosis, que era 1690 $\mu\text{g/ml}$ (intervalo: 1130-2250 $\mu\text{g/ml}$). Las concentraciones medias séricas mínimas antes de la segunda, tercera y cuarta dosis fueron 325 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 243-677 $\mu\text{g/ml}$), 535 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 240-709 $\mu\text{g/ml}$), y 594 $\mu\text{g/ml}$ (rango: 194-776 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. También hubo una respuesta ATA en el nivel de dosis de 25 mg / kg, 5 de los 10 monos (3 de 4 monos de recuperación) en este grupo de dosis desarrolló una respuesta ATA que se correlaciona con la disminución de las concentraciones séricas de rhuMAb $\beta 7$. Se detectaron ATA después de la segunda dosis en algunos monos; 1 mono en este grupo también tenía los títulos de anticuerpos anti-humanos positivos antes de la primera dosis de rhuMAb $\beta 7$.

Las concentraciones séricas durante los 28 días durante el periodo de seguimiento en vida del estudio tras las cuatro dosis IV semanales de 5 o 25 mg / kg se presentan en la Figura 23. Las concentraciones séricas sobre el

periodo de seguimiento en vida (hasta 7 días después de la última dosis) se compararon por análisis no compartimental porque no había cohorte de recuperación en el grupo de dosis de 5 mg / kg para la comparación. Los resultados indicaron que el área de dosis normalizadas bajo los perfiles de concentración plasmática-tiempo desde el día 0 hasta el día 7 después de la primera dosis (AUC_{0-7} / dosis) fueron similares para los grupos de dosis de 5 mg/kg y 25 mg/kg ($113 \pm 17,0$ y $119 \pm 15,8$ días \cdot $\mu\text{g/ml/mg/kg}$, respectivamente; véase la Tabla 5). Esto sugiere que rhuMAb $\beta 7$ presenta una farmacocinética proporcional a la dosis en monos Cynomolgus en el rango de dosis estudiado. El volumen de distribución en el compartimento central (V_1) también fue similar después de la primera dosis de 5 o 25 mg/kg ($29,0 \pm 4,30$ y $27,7 \pm 3,54$ ml/kg, respectivamente; véase la Tabla 5). Tras la administración de 25 mg/kg, AUC_{21-28} después de la última dosis fue más de 2 veces superior en comparación con AUC_{0-7} después de la primera dosis (7024 ± 1958 y 2987 ± 394 día \cdot $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; véase la Tabla 2-5). C_{max} tras la administración de 25 mg/kg también aumentó aproximadamente 2 veces después de la última dosis en comparación con después de la primera dosis (1710 ± 302 y 916 ± 111 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; véase la Tabla 5). Ambos hallazgos sugieren que hubo acumulación de rhuMAb $\beta 7$ tras cuatro dosis semanales IV de 25 mg/kg a monos Cynomolgus; sin embargo, dicha acumulación es esperable en un anticuerpo con una vida media larga a estas dosis. Los datos después de la última dosis en el grupo de dosis de 5 mg/kg no podían compararse debido a que ATA afectó a rhuMAb $\beta 7$ CL después de la segunda dosis.

La media de los datos de los 4 monos del período de recuperación de 23 semanas después de cuatro dosis semanales de 25 mg/kg se ajustaron a un modelo de dos compartimentos (ver Figura 24). El perfil de concentración en suero-tiempo después de la última dosis fue bifásica, con una fase de distribución rápida inicial seguida por una fase de eliminación más lenta. El análisis compartimental estima un lento CL de $2,93$ ml/día/kg y un tiempo relativamente largo de $t_{1/2,\beta}$ de 14,5 días después de cuatro dosis en bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (véanse las Tablas 2-6). Sin embargo, 3 de los 4 monos tenían ATA, lo que contribuyó probablemente al aclaramiento de rhuMAb $\beta 7$. V_{ss} se estimó en $56,9$ ml/kg, lo que sugiere que rhuMAb $\beta 7$ se mantuvo en general en el compartimento vascular (véanse las Tablas 2-6). La exposición total (AUC_{all}) después de cuatro dosis semanales IV de 25 mg/kg se estimó como 33400 días \cdot $\mu\text{g/ml}$ por análisis no compartimental de los datos de los animales de recuperación (véanse las Tablas 2-6).

Tabla 2-5

Parámetros PK no compartimentales de los datos individuales (media \pm DE) tras la primera o la última dosis en bolo IV de rhuMAb $\beta 7$ a monos Cynomolgus					
Grupo de tratamiento	AUC_{0-7} (día \cdot $\mu\text{g/ml}$)	AUC_{21-28} (día \cdot g/ml)	AUC_{0-7} o AUC_{21-28} / dosis (día \cdot $\mu\text{g/ml/mg/kg}$)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	V_1 (ml/kg)
5 mg / kg primera dosis (n = 6)	$563 \pm 84,8$	NA	$113 \pm 17,0$	$175 \pm 24,0$	$29,0 \pm 4,30$
25 mg / kg primera dosis (n = 10)	2990 ± 394	NA	$119 \pm 15,8$	916 ± 111	$27,7 \pm 3,54$
25 mg / kg última dosis (n = 10)	NA	7020 ± 1960	$281 \pm 78,3$	1710 ± 302	$15,1 \pm 3,03$

AUC_{0-7} = área bajo la curva de concentración en suero-tiempo desde Tiempo = 0 a día 7 PK; AUC_{21-28} = área bajo la curva de concentración en suero-tiempo desde Tiempo = día 21 PK a día 28 PK; C_{max} = concentración máxima en suero después de una dosis en bolo IV; IV = intravenosa; NA = no aplicable; PK = farmacocinético; V_1 = volumen de distribución en el compartimento central (Dosis / C_{max}).

Tabla 2-6

Parámetros PK de dos compartimentos (% CV) de la media de datos de 4 animales de recuperación tras cuatro dosis semanales IV en bolo de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ a monos Cynomolgus			
AUC (día \cdot $\mu\text{g/ml}$)	CL (ml/día/kg)	$t_{1/2,\beta}$ (días)	V_{ss} (mL/kg)
8530 (5,50)	$2,93$ (5,51)	$14,5$ (1,89)	$56,9$ (7,08)

AUC = área bajo la curva de concentración en suero-tiempo; CL = aclaramiento; IV = intravenosa; PK = farmacocinético; $t_{1/2,\beta}$, vida media de pbeta; V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario.

Tabla 2-7

Parámetros de modelo de dos compartimentos (% CV) de la media (\pm DE) de datos de 4 animales de recuperación tras cuatro dosis semanales IV en bolo de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ a monos Cynomolgus						
A ($\mu\text{g/ml}$)	B ($\mu\text{g/ml}$)	α (día $^{-1}$)	β (día $^{-1}$)	k_{12} (día $^{-1}$)	k_{21} (día $^{-1}$)	k_{10} (día $^{-1}$)
509 (26,4)	378 (8,64)	0,795 (57,5)	0,0479 (1,90)	0,372 (72,5)	0,366 (51,4)	0,104 (16,0)

A, B = intersección en tiempo cero asociado con las fases alfa y beta, respectivamente; α , β = constantes de macrotasa alfa y beta, respectivamente; k_{10} = tasa de eliminación del compartimento central; k_{12} , k_{21} = constantes de tasa intercompartimental.

35 Análisis de citometría de flujo (inmunofenotipaje y farmacodinamia)

Se presentan en las figuras 35-38, el recuento, media de grupo (\pm DE) para subgrupos de células T CD4 y CD8 de sangre periférica.

5 Las figuras 39-40 muestran la relación entre las concentraciones séricas de rhuMab $\beta 7$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ disponible en sangre periférica que expresan $\beta 7$ y células T CD8⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en individuos de monos Cynomolgus. Se presentan en el Apéndice E, el recuento absoluto, media (\pm DE) individual y grupal, expresión de $\beta 7$ y expresión de $\beta 7$ disponible en subgrupos de células T CD4 y CD8.

10 La ocupación de los receptores de $\beta 7$ en este estudio se analizó por citometría de flujo como $\beta 7$ disponible en subgrupos de células T CD4 y CD8 en sangre periférica definidas como CD45RA⁺ o CD45RA⁻. Las células T CD45RA⁺ y CD45RA⁻, fenotípicamente similares a las células T vírgenes y células de memoria / efectoras en los seres humanos, expresan niveles de $\beta 7$ intermedios frente altos (véase la Figura 25 para dot blot de FACS representativos de subgrupos de células T). Las células T CD4 CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ residen preferentemente en los intestinos. Los datos de este ensayo indicaron saturación de $\beta 7$ después de la primera dosis, tanto en 5 y 25 mg / kg, y el retorno de $\beta 7$ libre que se correlaciona con una disminución en las concentraciones séricas de rhuMab $\beta 7$ (véanse las figuras 32-33 en la relación PK / PD del apartado anterior). Estos datos sugirieron que la saturación de una concentración en suero de rhuMab $\beta 7$ por encima de 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mantendrá probablemente la saturación completa del receptor $\beta 7$ en las células T de sangre periférica.

20 Se examinaron los niveles de expresión totales de $\beta 7$ en células T de sangre periférica tras la administración de rhuMab $\beta 7$ utilizando un anticuerpo no competitivo para la detección de $\beta 7$ mediante citometría de flujo. No hubo evidencia de regulación negativa de $\beta 7$ en las células T de sangre periférica en los monos cynomolgus después de dosis IV de 5 o 25 mg/kg (datos no mostrados). También se examinaron células totales que expresan $\beta 7$ en sangre periférica después de la administración de rhuMab $\beta 7$ utilizando el mismo anticuerpo no competitivo para la detección de $\beta 7$.

30 Las células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ (fenotípicamente similares a las células CD4⁺ residentes en el intestino en humanos y ratones) aumentaron aproximadamente 5 veces sobre los niveles basales después de cuatro dosis semanales de 25 mg/kg (véase la Figura 26). Del mismo modo, las células T CD4⁺ CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$ (fenotípicamente similares a las células T vírgenes humanas) también aumentaron después de cuatro dosis semanales de 25 mg/kg (aproximadamente 2,5 veces sobre los niveles basales) (véase la Figura 27). No ha habido cambios sustanciales en las células T CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{bajo}}$ o en subgrupos de células T de los animales control con vehículo (ver Figuras 26 y 27). Se observaron resultados similares con células T CD8⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ y CD8⁺ CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$. Estos resultados son consistentes con la inhibición del tráfico de linfocitos que expresan $\beta 7$ en el estómago, que es el mecanismo de acción propuesto de este anticuerpo terapéutico.

40 En apoyo de esta hipótesis, el aumento de los porcentajes de células T CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en sangre periférica se correlaciona con la ocupación del receptor $\beta 7$ en las células T por rhuMab $\beta 7$. Del mismo modo, la pérdida de ocupación de $\beta 7$ por rhuMab $\beta 7$ (detección de receptores $\beta 7$ disponibles) se correlaciona con el retorno a la línea basal de las células T CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en sangre periférica. Por ejemplo, el día de estudio 99, los porcentajes de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en la sangre de los animales 24 y 25 disminuyeron a los niveles de línea basal (véase la Figura 6). Esta disminución correlaciona con la pérdida de ocupación de $\beta 7$ por rhuMab $\beta 7$ el día de estudio 99 en estos monos particulares (véanse las Figuras 32 y 33 en la relación PK / PD de la sección anterior). En contraste, los animales 23 y 26 exhibieron receptores $\beta 7$ saturados en las células T de sangre periférica en el día de estudio 99 (véanse las Figuras 32 y 33), y los números absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en la sangre se mantuvo elevado en comparación con los niveles predosis (ver la Figura 28). Se observaron resultados similares con los subgrupos de células T CD8⁺. Por lo tanto, la ocupación de los receptores $\beta 7$ se correlaciona con el aumento de los porcentajes de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en la sangre, de conformidad con la inhibición del tráfico a los sitios intestinales. Los aumentos en los subgrupos de células T CD45RA⁻ y CD45RA⁺ de sangre periférica contribuyeron probablemente al aumento observado en los linfocitos circulantes descritos a continuación.

50 La administración semanal de 25 mg/kg de rhuMab $\beta 7$ indujo un aumento leve en los linfocitos circulantes en monos Cynomolgus que fue evidente después de la primera dosis y parecían aumentar después de la última dosis. Los monos Cynomolgus en el grupo de dosis de 25 mg/kg tuvieron un aumento promedio de aproximadamente 2,2 veces sobre la línea basal en comparación con un aumento medio de 1,3 veces para el grupo control con vehículo (véase la Figura 29). Los recuentos de linfocitos absolutos en el grupo de dosis de 25 mg/kg volvieron a los niveles predosis o niveles de vehículo a medida que las concentraciones séricas de rhuMab $\beta 7$ disminuyeron, un efecto que se correlaciona con la pérdida de ocupación del receptor $\beta 7$ de linfocitos por rhuMab $\beta 7$. Por lo tanto, el incremento leve en los linfocitos circulantes evidentes en este estudio parece ser transitoria, relacionados con la administración de $\beta 7$ rhuMab, y era más probable debido a la inhibición de tráfico de linfocitos que expresan $\beta 7$ al intestino como se mencionó anteriormente. El aumento en los recuentos de linfocitos de sangre periférica fue evidente tanto en las células T y células B, aunque el aumento en las células T fue más sustancial y exhiben una mayor duración en comparación con las células B (véanse las Figuras 30 y 31).

65 Relaciones PK / PD

La saturación del receptor $\beta 7$ de la integrina y los niveles de células T $\beta 7^+$ circulantes se utilizaron como marcadores PD.

Después de cuatro dosis semanales de 5 o 25 mg/kg de rhuMAB $\beta 7$ a monos Cynomolgus, no se observó evidencia de regulación negativa de la expresión de $\beta 7$ en las células T de sangre periférica. Sin embargo, se observó la saturación de $\beta 7$ en las células T de sangre periférica después de la primera dosis de 5 o 25 mg/kg de rhuMAB $\beta 7$, y la desaturación (detección de $\beta 7$ disponible) parece correlacionarse con una disminución en el nivel de rhuMAB $\beta 7$ por debajo de aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ (véanse las Figuras 32A-D para los perfiles de los animales 23-26, respectivamente, y la Figura 33). Una correlación entre la ocupación de $\beta 7$ en las células T $\text{CD4}^+ \text{CD45RA}^- \beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y elevados números absolutos de estas células también se observó después de la administración de rhuMAB $\beta 7$ (véanse las Figuras 34A-D). Estos hallazgos sugieren que las concentraciones séricas de rhuMAB $\beta 7$ por encima de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ mantienen la ocupación de $\beta 7$ en células CD4^+ residentes en el intestino y bloquean la residencia de estas células T en el intestino, que a su vez puede causar la acumulación de estas células en la periferia.

Conclusiones

Después de cuatro dosis semanales de bolo IV de 5 o 25 mg/kg de rhuMAB $\beta 7$ a monos Cynomolgus, las concentraciones séricas mínimas aumentaron después de la segunda dosis, excepto cuando se formaron ATA. $\text{AUC}_{0-7/\text{dosis}}$ después de la primera dosis fue similar para los grupos de dosis de 5 mg/kg y 25 mg/kg, lo que sugiere que rhuMAB $\beta 7$ presenta una farmacocinética proporcional a la dosis en monos Cynomolgus en el rango de dosis estudiado. Para el grupo de dosis de 25 mg/kg, la AUC_{0-7} y C_{max} aumentaron aproximadamente 2 veces después de la última dosis en comparación con la primera dosis. Ambos hallazgos sugieren la acumulación de rhuMAB $\beta 7$, como era de esperar, después de cuatro dosis IV semanales de 25 mg/kg a monos Cynomolgus. El análisis compartimental de los datos de los animales de recuperación de 25 mg/kg estima una CL lenta de 2,93 ml/día/kg y un tiempo relativamente largo $t_{1/2,\beta}$ de 14,5 días.

Los ensayos de ocupación de los receptores $\beta 7$ de integrina sugirieron que los receptores $\beta 7$ en subgrupos de células T de sangre periférica se saturaron totalmente después de la primera de cuatro dosis semanales de 5 o 25 mg/kg de rhuMAB $\beta 7$ a monos Cynomolgus. La detección de $\beta 7$ disponible se correlaciona con una disminución en las concentraciones séricas de rhuMAB $\beta 7$ y sugirió que una concentración en suero por encima de aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ mantendrá la ocupación de los receptores de $\beta 7$ en las células T de sangre periférica. Las células T $\text{CD45RA}^- \beta 7^{\text{alto}}$ (fenotípicamente similares a las células T residentes en intestino en humanos y ratones) aumentaron aproximadamente 5 veces sobre los niveles basales después de cuatro dosis semanales de 25 mg/kg a monos. Del mismo modo, las células T $\text{CD45RA}^+ \beta 7^{\text{intermedio}}$ (fenotípicamente similares a las células T vírgenes humanas) también aumentaron después de cuatro dosis semanales de 25 mg/kg (aproximadamente 2,5 veces sobre los niveles basales). Estos hallazgos son consistentes con el mecanismo de acción de rhuMAB $\beta 7$, a saber, la inhibición de tráfico de linfocitos $\beta 7^+$ al intestino a través de la inhibición de la unión de $\alpha 4\beta 7$ a sus ligandos, que entonces conduce a la acumulación de estas células en la circulación periférica. Estos fenómenos se estudiarán con más detalle en futuros estudios en monos.

Apéndice 2F

Tabla resumen del estudio

Artículo de prueba: rhuMAB $\beta 7$

Tipo de estudio: No-GLP, in vivo, de múltiples dosis, de seguridad y farmacocinética.

Método: Los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los tres grupos y recibieron cuatro dosis semanales por vía intravenosa (IV) de material de ensayo. Los animales del grupo 1 (5 machos y 5 hembras) recibieron vehículo rhuMAB $\beta 7$ a 1,25 ml/kg. Los animales del grupo 2 (3 machos y 3 hembras) y del Grupo 3 (5 machos y 5 hembras) recibieron rhuMAB $\beta 7$ a 5 y 25 mg/kg, respectivamente. Tres machos y 3 hembras de cada grupo sufrieron necropsias terminales 1 semana después de la última dosis. Dos machos y 2 hembras del grupo con vehículo o de 25 mg / kg de rhuMAB $\beta 7$ fueron seguidos durante un período de recuperación de aproximadamente 23 semanas antes de la necropsia de recuperación. Las muestras de suero se analizaron mediante ELISA cuantitativo para medir los niveles totales de rhuMAB $\beta 7$ y mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia de puente para determinar el nivel de respuesta de anticuerpos contra rhuMAB $\beta 7$. Se analizaron mediante citometría de flujo los subgrupos de células T totales CD4^+ y CD8^+ que expresan $\beta 7$ ocupadas y desocupadas, la ocupación de $\beta 7$ en subgrupos de células T CD4^+ y CD8^+ , y los subgrupos de linfocitos (células B, células T y células asesinas naturales totales). Los datos farmacocinéticos se sometieron a análisis no compartimental y de dos compartimentos.

Resultados: En general, el perfil de concentración en suero-tiempo de rhuMAB $\beta 7$ tras cuatro dosis semanales IV fue bifásica, con una fase de distribución rápida inicial seguida por una fase de eliminación más lenta. Las concentraciones séricas mínimas aumentaron después de la segunda dosis, excepto cuando se formaron anticuerpos anti-terapia (ATA). El área normalizada de dosis bajo el perfil de concentración en suero-tiempo desde el

día 0 al día 7 (AUC_{0-7}/dosis) después de la primera dosis fue similar para el grupos de dosis de 5 mg/kg y 25 mg/kg, lo que sugiere que rhuMAb $\beta 7$ exhibe un farmacocinética proporcional a la dosis en monos *Cynomolgus* en el rango de dosis estudiado. Para el grupo de 25 mg/kg de dosis, la AUC_{0-7} y la concentración máxima en suero (C_{max}) se incrementó aproximadamente 2 veces después de la última dosis, en comparación con la primera dosis. Ambos hallazgos sugirieron que hubo acumulación de rhuMAb $\beta 7$ tras cuatro dosis semanales IV de 25 mg/kg en monos *Cynomolgus*; sin embargo, se espera dicha acumulación para un anticuerpo con una vida media larga a estas dosis. El análisis compartimental de los datos de los animales de recuperación de 25 mg/kg calcula un aclaramiento lento de 2,93 ml/día/kg y una vida media relativamente larga de 14,5 días. Sin embargo, 3 de los 4 monos tenían ATA que contribuyeron probablemente al aclaramiento de rhuMAb $\beta 7$. Los ensayos de ocupación del receptor $\beta 7$ de integrina sugirieron que los receptores $\beta 7$ en subgrupos de células T de sangre periférica fueron totalmente saturados después de la primera de cuatro dosis semanales de 5 o 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ en monos *Cynomolgus*. La detección de $\beta 7$ disponible se correlaciona con una disminución en las concentraciones séricas de rhuMAb $\beta 7$ y sugirió que una concentración en suero por encima de aproximadamente 1-10 $\mu\text{g/ml}$ mantendrá la ocupación de los receptores de $\beta 7$ en las células T de sangre periférica. Las células T CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ (fenotípicamente similares a las células T residentes en intestino en humanos y ratones) aumentó aproximadamente 5 veces sobre los niveles de línea basal tras cuatro dosis semanales de 25 mg/kg a monos *Cynomolgus*. De forma similar, las células T CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{intermedio}}$ (fenotípicamente similares a las células T vírgenes humanas) también aumentó tras cuatro dosis semanales de 25 mg/kg (aproximadamente 2,5 veces por encima de los niveles de línea basal). Estos hallazgos son consistentes con el mecanismo de acción de rhuMAb $\beta 7$, la inhibición del tráfico de linfocitos $\beta 7$ positivos hacia el intestino mediante la inhibición de la unión de $\alpha 4\beta 7$ a sus ligandos, que conduce entonces a la acumulación de estas células en la circulación periférica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la dosificación de un antagonista de integrina beta7 para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal inflamatorio en un paciente, en el que dicho antagonista de la integrina beta7 es un anticuerpo anti-beta7, y el método comprende ajustar la dosis del antagonista de integrina beta7 en base a una comparación de la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del paciente después de o durante el tratamiento con una dosis o régimen de dosificación del antagonista de integrina beta7, y la cantidad del biomarcador en una muestra obtenida del paciente antes del tratamiento, en el que un cambio en la cantidad del biomarcador después o durante el tratamiento, en comparación con antes del tratamiento, es indicativo de la eficacia o de respuesta a la dosis o régimen de dosificación del antagonista de la integrina beta7 para el tratamiento del trastorno gastrointestinal en el paciente, y en el que el biomarcador se selecciona de un grupo que consiste en linfocitos residentes en el intestino en la sangre periférica del paciente, la ocupación de antagonista de la integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino, y los receptores de la integrina beta7 en los linfocitos residentes en el intestino, en el que los linfocitos residentes en el intestino son un subgrupo distintivo de linfocitos identificados como CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto}.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria del intestino.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn (EC) o la colitis ulcerosa (CU).
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho paciente es un ser humano.
5. El método de la reivindicación 2, en el que dicho antagonista de la integrina beta7 es un anticuerpo monoclonal anti-beta7.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo comprende seis regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en las que:
- (i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos A1-A11, en la que A1-A11 es RASESVDTYLH (Id. de Sec. N°: 1); RASESVDSLH (Id. de Sec. N°: 7), RASESVDTLLH (Id. de Sec. N°: 8), o RASESVDDLH (Id. de Sec. N°: 9) o una variante de los Id. de Sec. N°: 1, 7, 8 o 9, en las que el aminoácido A2 se selecciona de entre el grupo formado por A, G, S, T y V y/ o el aminoácidos A3 se selecciona de entre el grupo que consiste en S, G, I, K, N, P, Q, R y T, y/ o A4 se selecciona del grupo que consiste en E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N y R, y/ o el aminoácido A5 se selecciona de entre el grupo que consiste en S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, y V, y/ o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste en V, R, I, A, G, K, L, M, y Q, y/ o el aminoácido A7 se selecciona de entre el grupo que consiste en D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S y T, y/ o el aminoácido A8 se selecciona de entre el grupo constituido por D, G, N, E, T, P y S, y/ o el aminoácido A9 se selecciona de entre el grupo constituido por L, Y, I y M, y/ o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste en L, A, I, M y V, y/ o el aminoácido A11 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, Y, F, y S;
- (ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos B1-B8, en la que B1-B8 es KYASQSIG (Id. de Sec. N°: 2), RYASQSIG (Id. de Sec. N°: 67, o XaaYASQSIG (Id. de Sec. N°: 68, en la que Xaa representa cualquier aminoácido) o una variante de los Id. de Sec. N°: 2, 67 o 68 en el que el aminoácido B1 se selecciona de entre el grupo constituido por K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y y Xaa (donde Xaa representa cualquier aminoácido), y/ o el aminoácido B4 se selecciona entre el grupo que consiste en S y D, y/ o el aminoácido B5 se selecciona entre el grupo que consiste en Q y S, y/ o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste en S, D, L, y R, y/ o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste en I, V, E y K;
- (iii) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos C1-C9, en la que C1-C9 es QQGNLPLNT (Id. de Sec. N°: 3) o una variante del Id. de Sec. N°: 3, en la que el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste en N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M e Y;
- (iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos D1-D10-D10 en la que D1 es GFFITNNYWG (Id. de Sec. N°: 4);
- (v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos E1-E17 en la que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (Id. de Sec. N°: 5), o una variante del Id. de Sec. N°: 5, en la que el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste en Y, F, V y D, y/ o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste en S y G, y/ o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste en S e Y, y/ o el aminoácido E12 se selecciona de entre el grupo que consiste en

N, T, A y D, y/ o el aminoácido 13 se selecciona del grupo que consiste en P, H, D y A, y/ o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste en L y V, y/ o el aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste en S y G; y

5 (vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos F2-F11 en la que F2-F11 es MTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 6) o RTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 66); o comprende la secuencia de aminoácidos F1-F11, en la que F1-F11 es AMTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 63), ARTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 64), o AQTGSSGYFDF (Id. de Sec. N^o: 65), o una variante de los Id. de Sec. N^o: 6, 63, 64, 65 o 66, en la que el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S, y/ o el aminoácido F11 se selecciona de entre el grupo que consiste en F e Y.

10 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo comprende tres regiones hipervariables de la cadena pesada (HVR-H1-H3) y tres secuencias de las regiones hipervariables de la cadena ligera (HVR-L1-L3), en las que

(i) HVR-L1 comprende el Id. de Sec. N^o: 7, Id. de Sec. N^o: 8 o Id. de Sec. N^o: 9;

(ii) HVR-L2 comprende el Id. de Sec. N^o: 2;

(iii) HVR-L3 comprende el Id. de Sec. N^o: 3;

15 (iv) HVR-H1 comprende el Id. de Sec. N^o: 4;

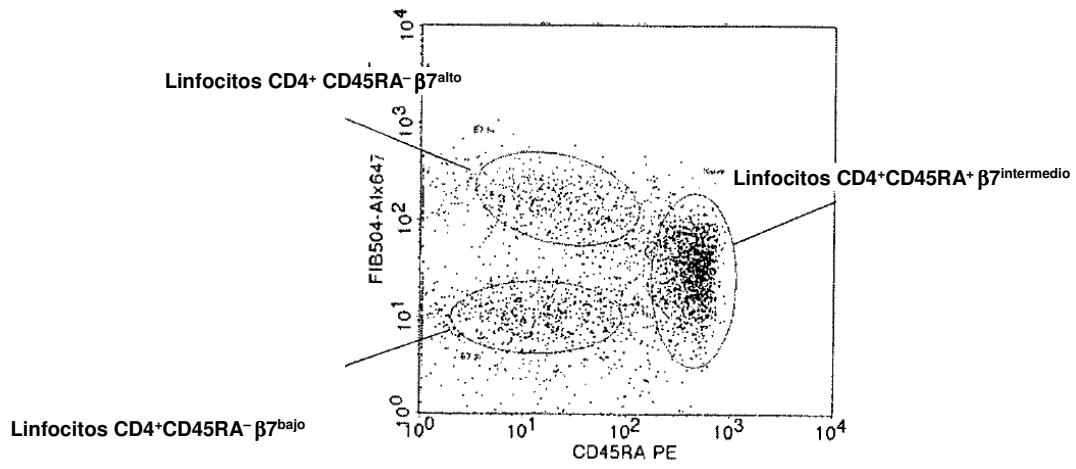
(v) HVR-H2 comprende el Id. de Sec. N^o: 5; y

(vi) HVR-H3 comprende el Id. de Sec. N^o: 6 o Id. de Sec. N^o: 63, o Id. de Sec. N^o: 64, o Id. de Sec. N^o: 66.

10. Un método de la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de sangre periférica de dicho paciente.

FIGURA 1

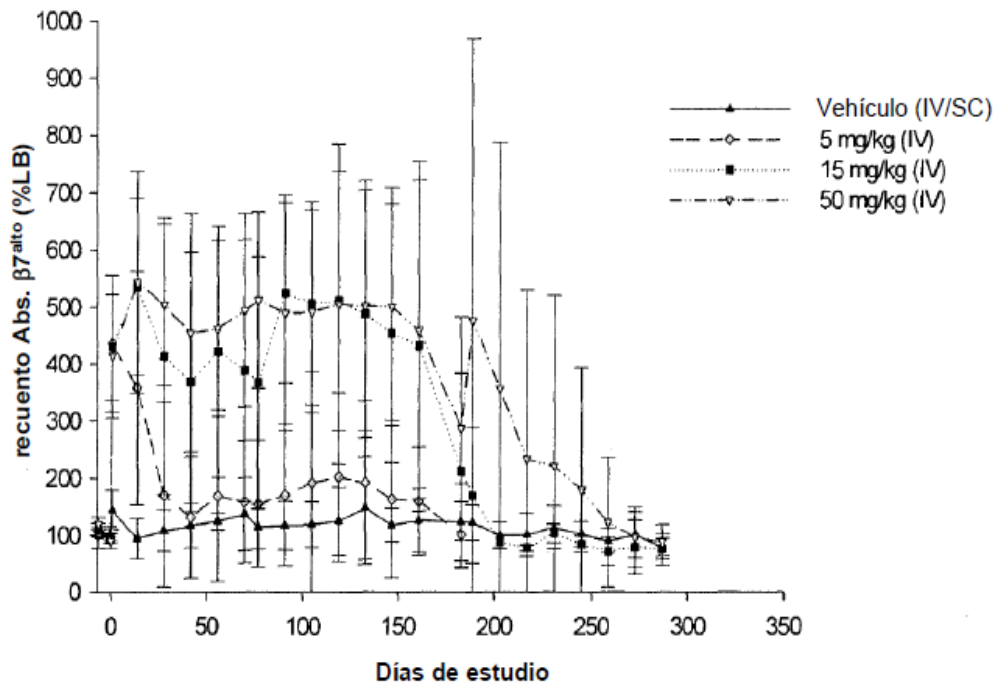
Subgrupos de linfocitos CD4+ en sangre periférica de monos Cynomolgus



Nota: el eje Y indica la expresión de $\beta 7$ y el eje X la expresión de CD45RA

Figura 2

Media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA- β 7^{alto} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a mono cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

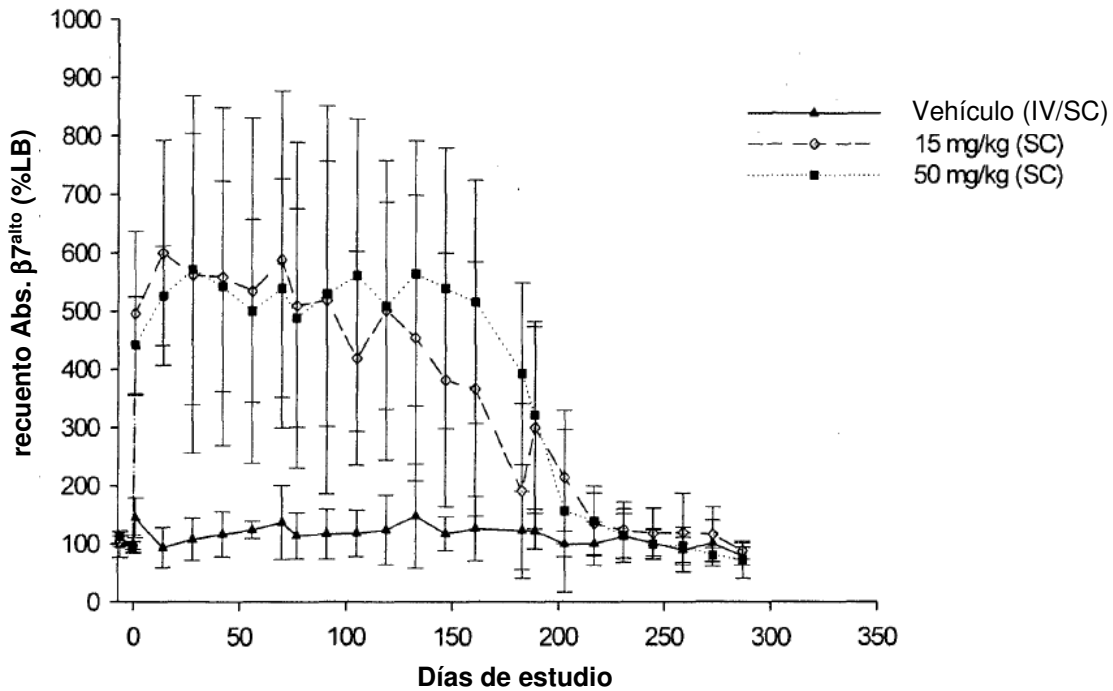


%LB = porcentaje de línea basal o predosis

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=10; Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), día 15 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=4; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 3

Media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA- β 7^{alto} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 15 o 50 mg / kg rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a monos Cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

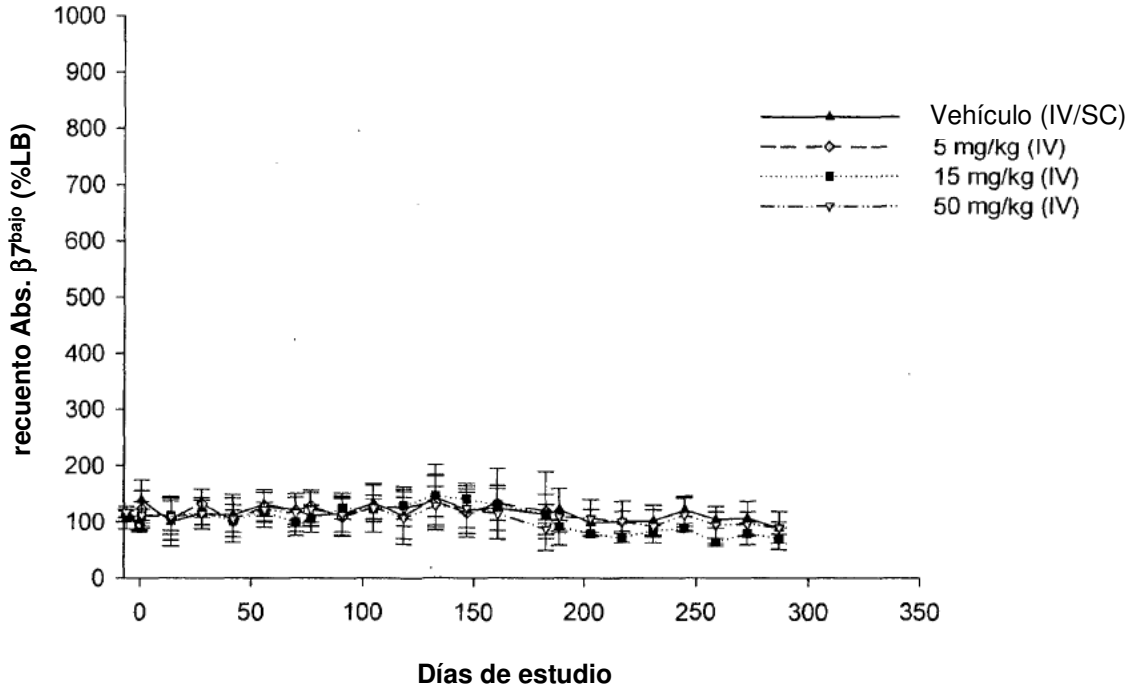


%LB = porcentaje de línea basal o predosis

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 4

Media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻β7^{bajo} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a monos Cynomolgus (recuento absoluto, % LB).

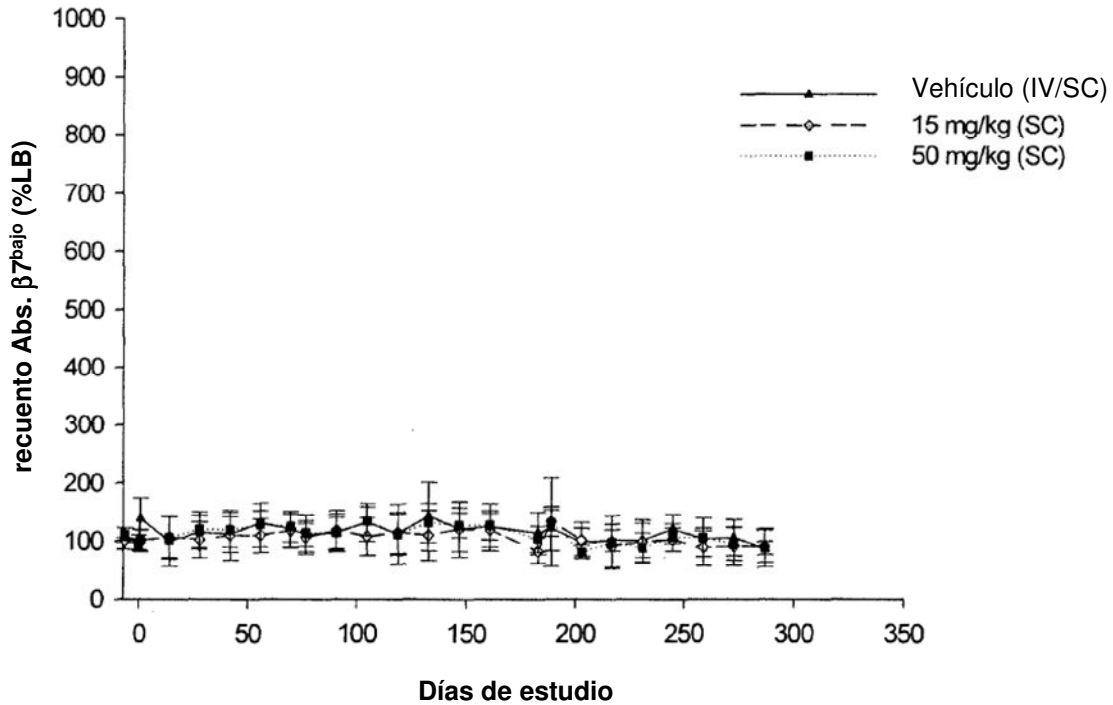


%LB = porcentaje de línea basal o predosis

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=10; Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), día 15 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=4; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 5

Media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{bajo} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 15 o 50 mg / kg rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a monos Cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

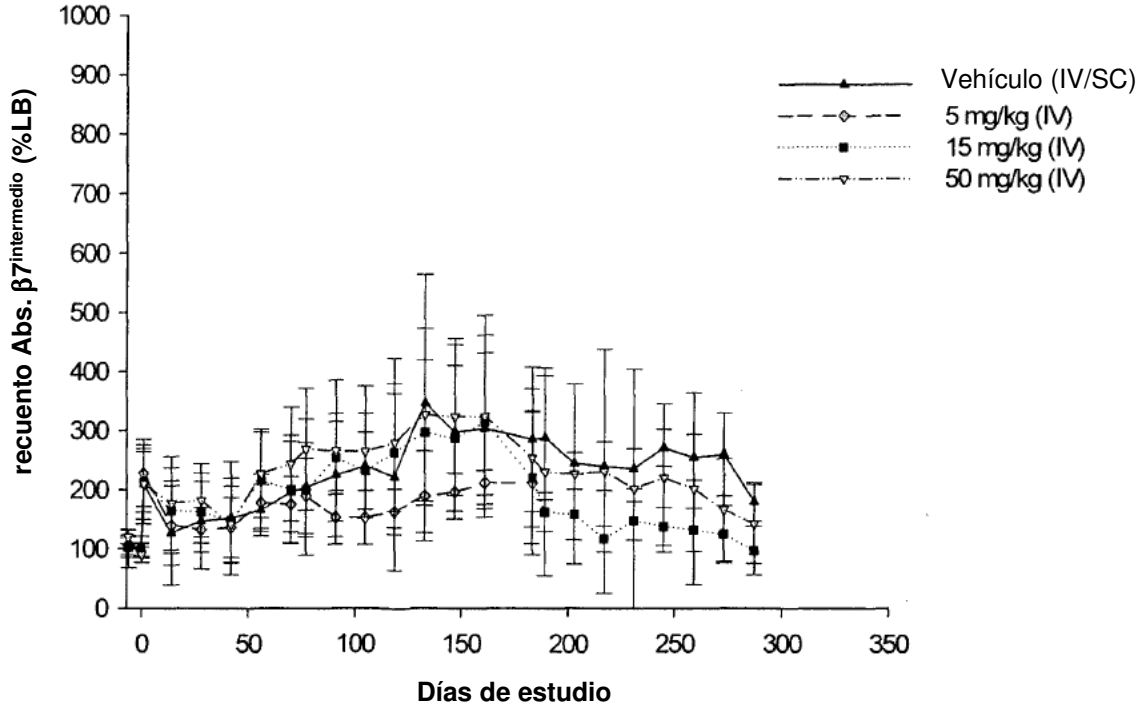


%LB = porcentaje de línea basal o predosis

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 6

Media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a monos Cynomolgus (recuento absoluto,% LB).

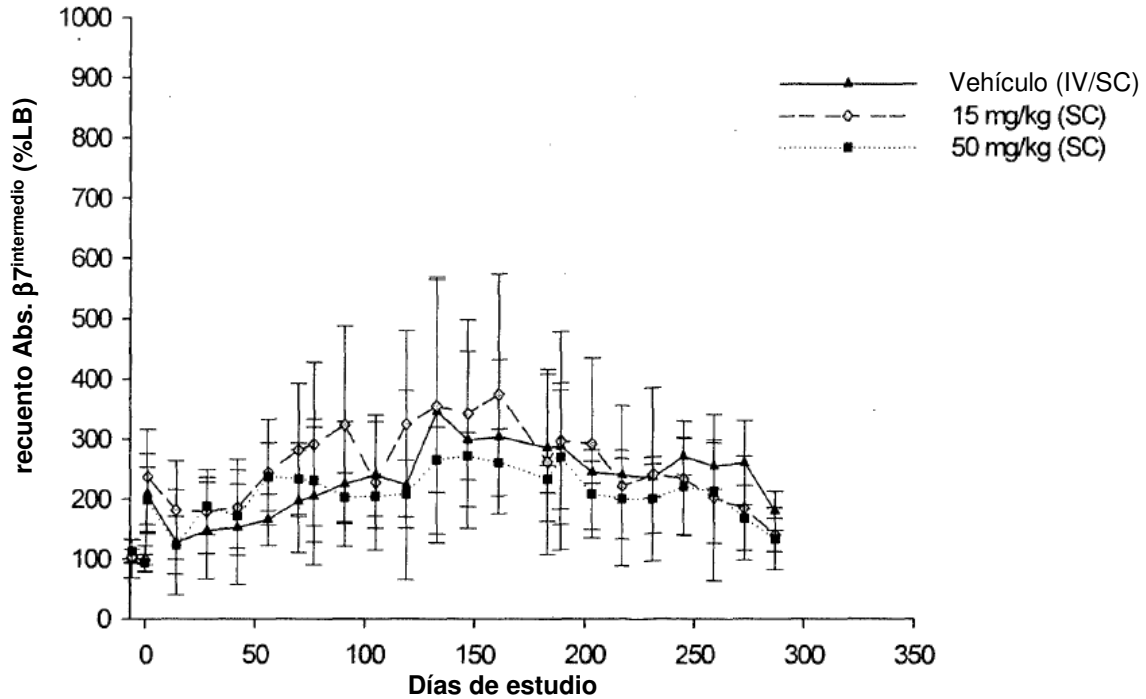


%LB = porcentaje de línea basal o predosis

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=10; Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), día 15 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=4; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 7

Media del grupo (\pm DE) de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} en sangre periférica después de 12 dosis intravenosas de 15 o 50 mg / kg rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo a monos Cynomolgus (recuento absoluto, % LB).



%LB = porcentaje de línea basal o predosis

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

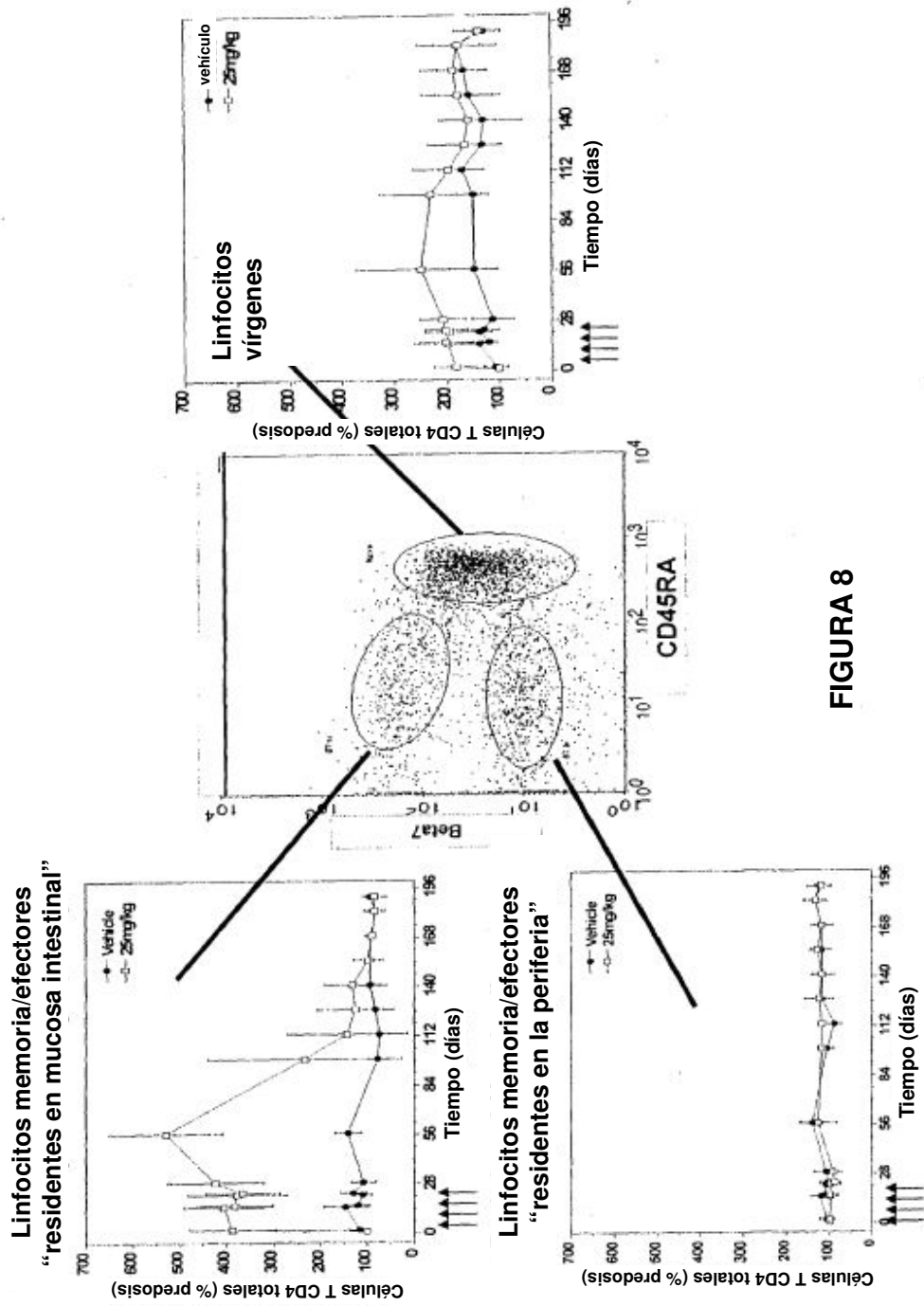


Figura 9 A-D

Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb Beta7 y $\beta 7$ no ocupado en linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica (estudio 05-0835).

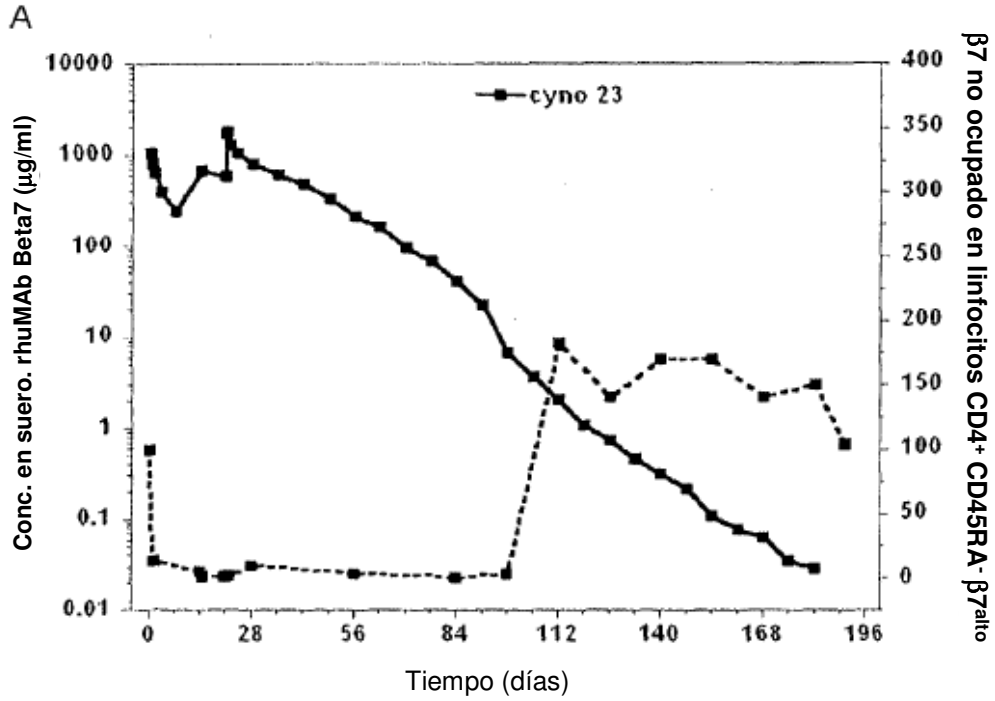
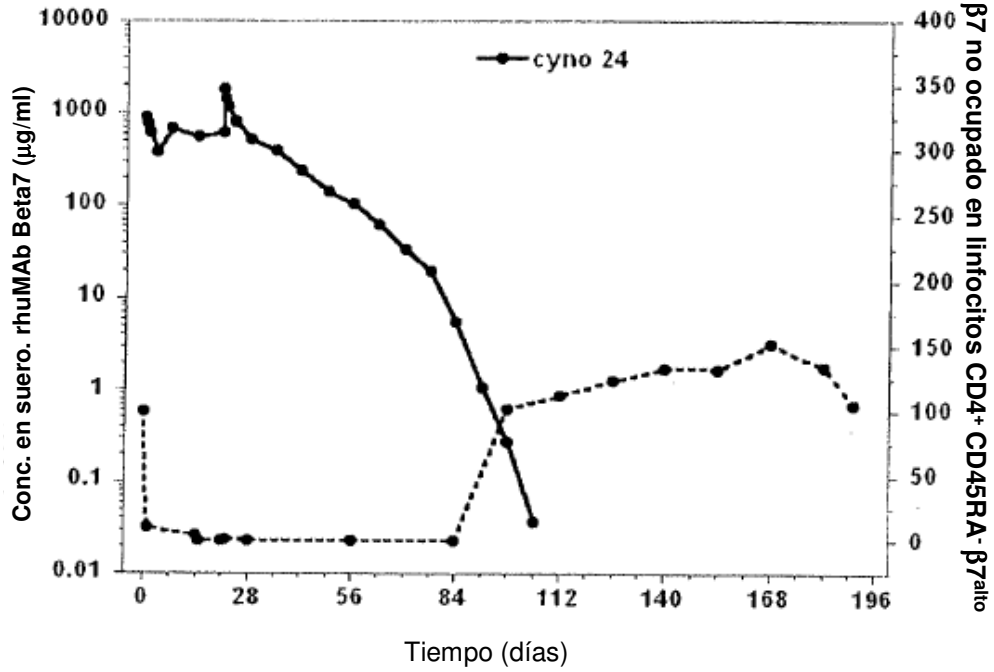


Figura 9 A-D (continuación)

Relación entre concentraciones en suero de rhuMab Beta7 y $\beta 7$ no ocupado en linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica (estudio 05-0835).

B



C

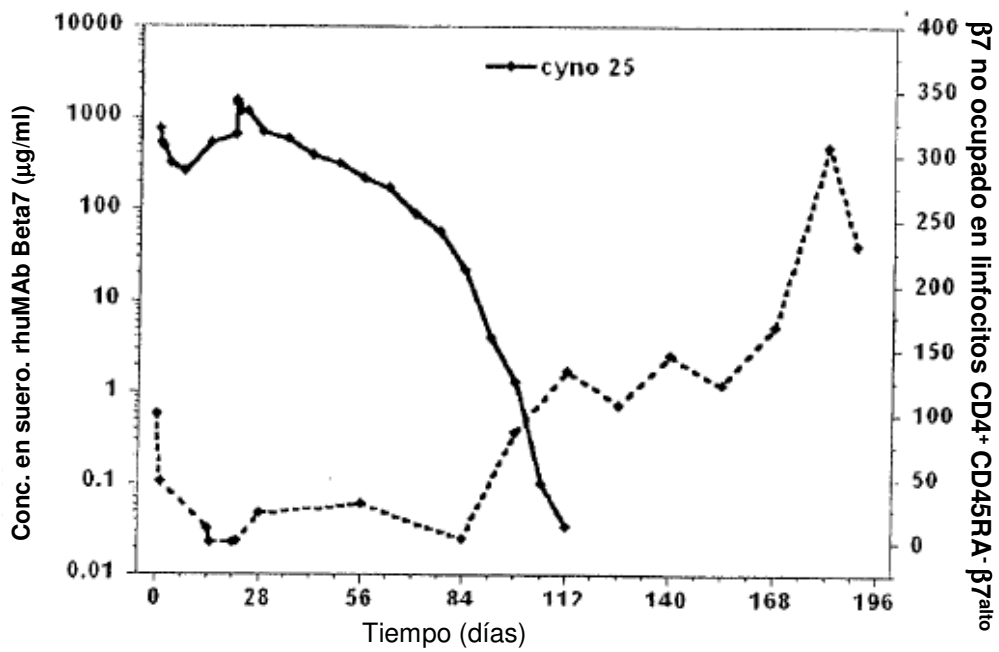
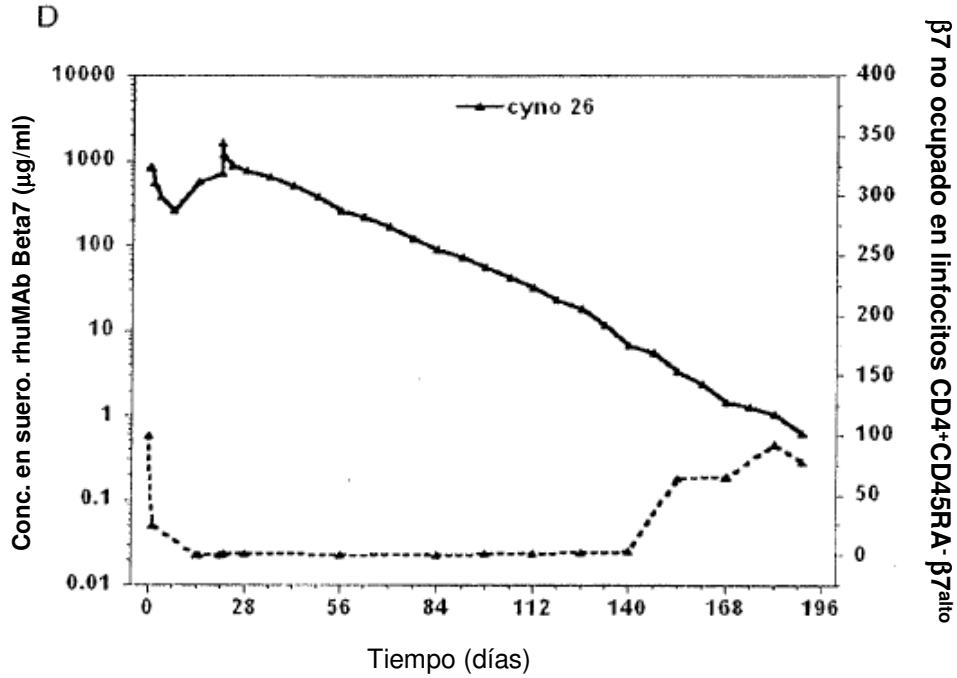


Figura 9 A-D (continuación)

Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb Beta7 y $\beta 7$ no ocupado en linfocitos $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ de sangre periférica (estudio 05-0835).



Líneas sólidas = concentraciones en suero de rhuMAb Beta7 (µg/ml), líneas punteadas = células $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ no ocupadas (recuentos absolutos, % línea basal)

Notas: Datos tomados de monos Cynomolgus individuales al que se administró cuatro dosis de bolus intravenoso de 25 mg/kg de rhuMAb Beta7, administrados semanalmente. Los números absolutos de células $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ no ocupadas de sangre periférica ocupadas por rhuMAb Beta7 se midieron como el porcentaje de los números absolutos de células $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ de sangre periférica en predosis.

Figura 10 A-D

Relación entre recuento absoluto de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica y β7 no ocupados en linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica a lo largo del tiempo (estudio 05-0835)

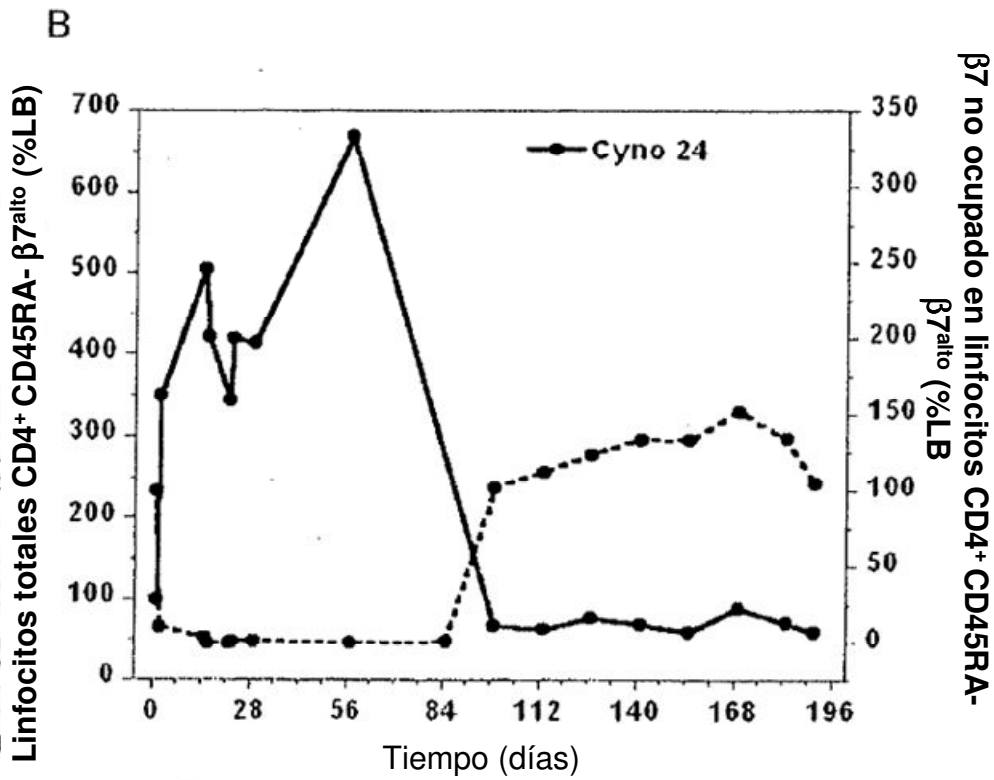
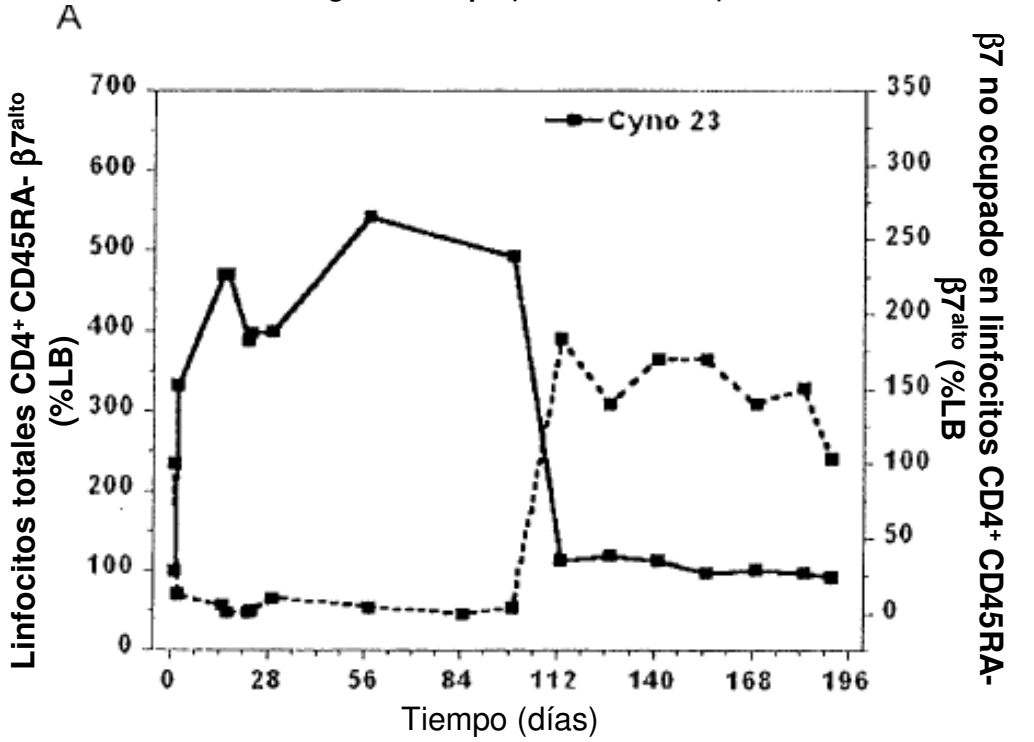


Figura 10 A-D (continuación)

Relación entre recuento absoluto de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica y β7 no ocupados en linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica a lo largo del tiempo (estudio 05-0835)

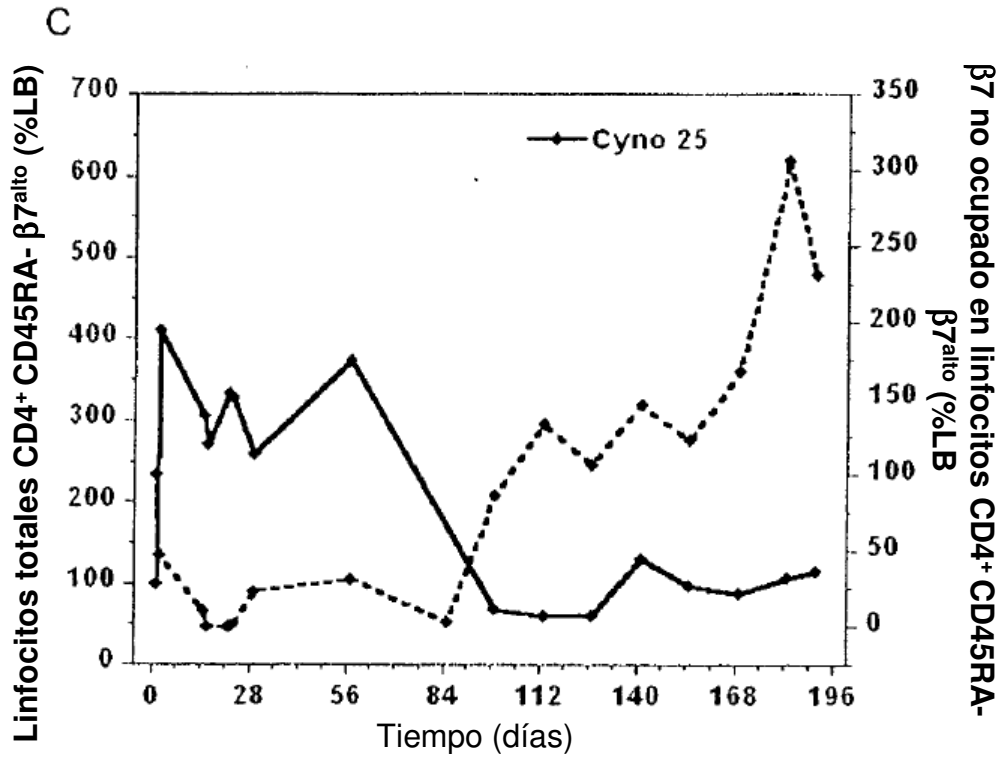
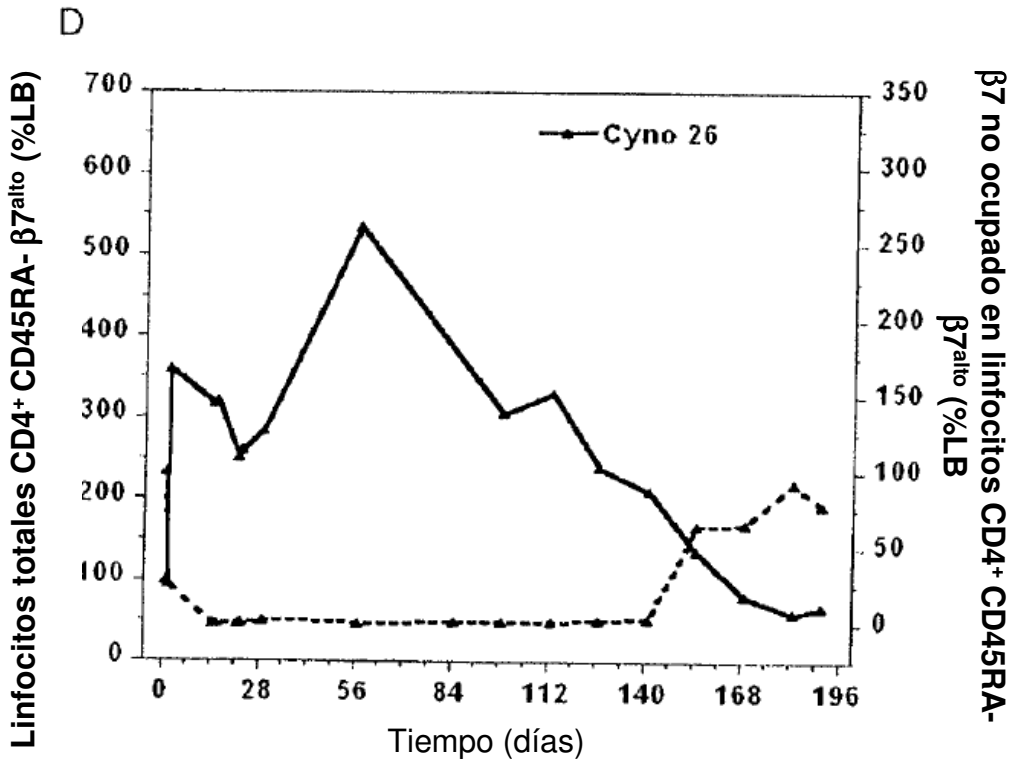


Figura 10 A-D (continuación)

Relación entre recuento absoluto de linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica y β7 no ocupados en linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica a lo largo del tiempo (estudio 05-0835)



LB= línea basal

Notas: líneas punteadas = células CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} no ocupadas (recuentos absolutos, % línea basal); líneas sólidas = células CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} ocupadas y no ocupadas (recuentos absolutos, % línea basal); se administró a monos Cynomolgus cuatro dosis de bolus intravenoso semanal de 25 mg/kg de rhuMAb Beta7.

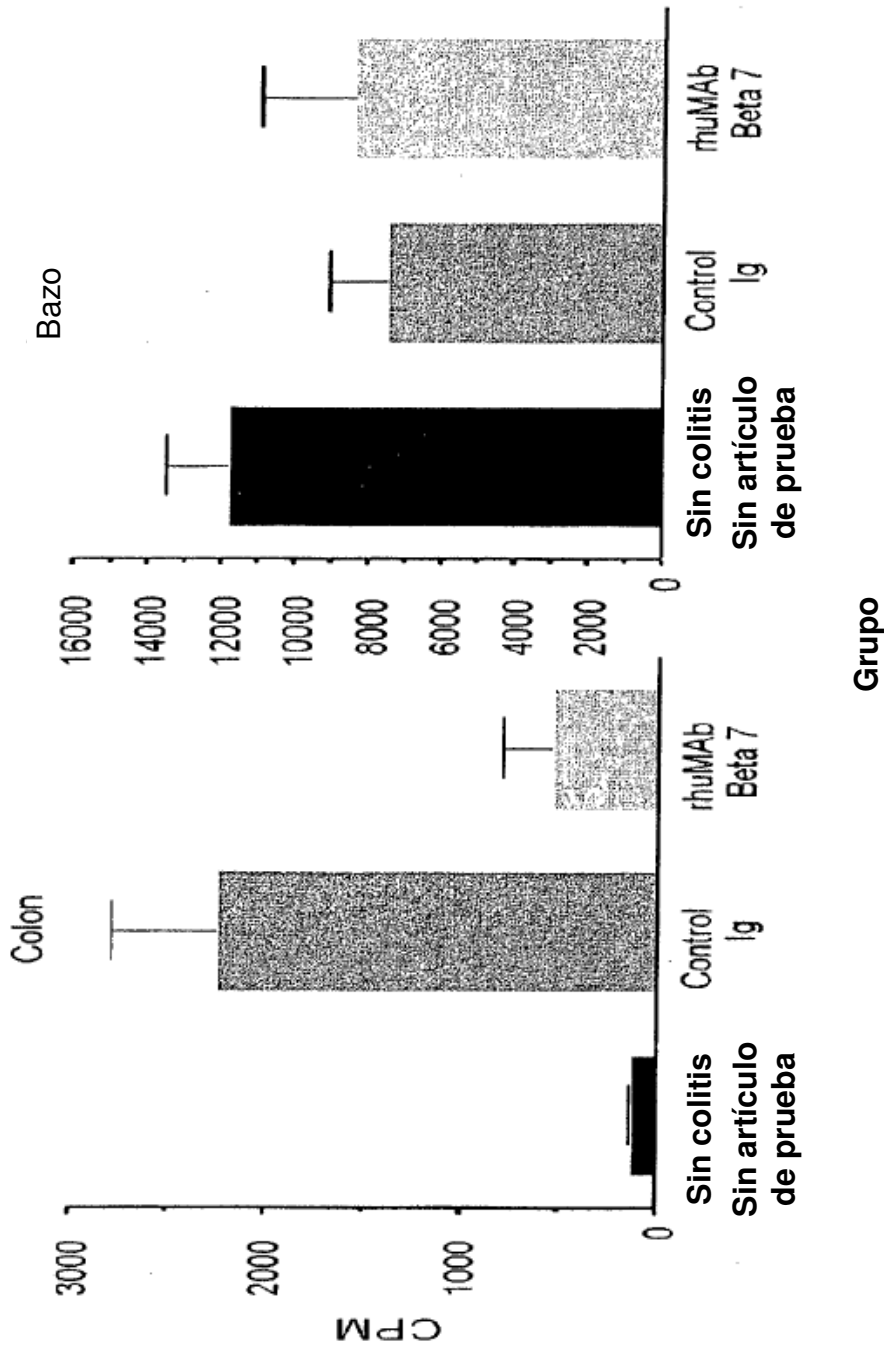
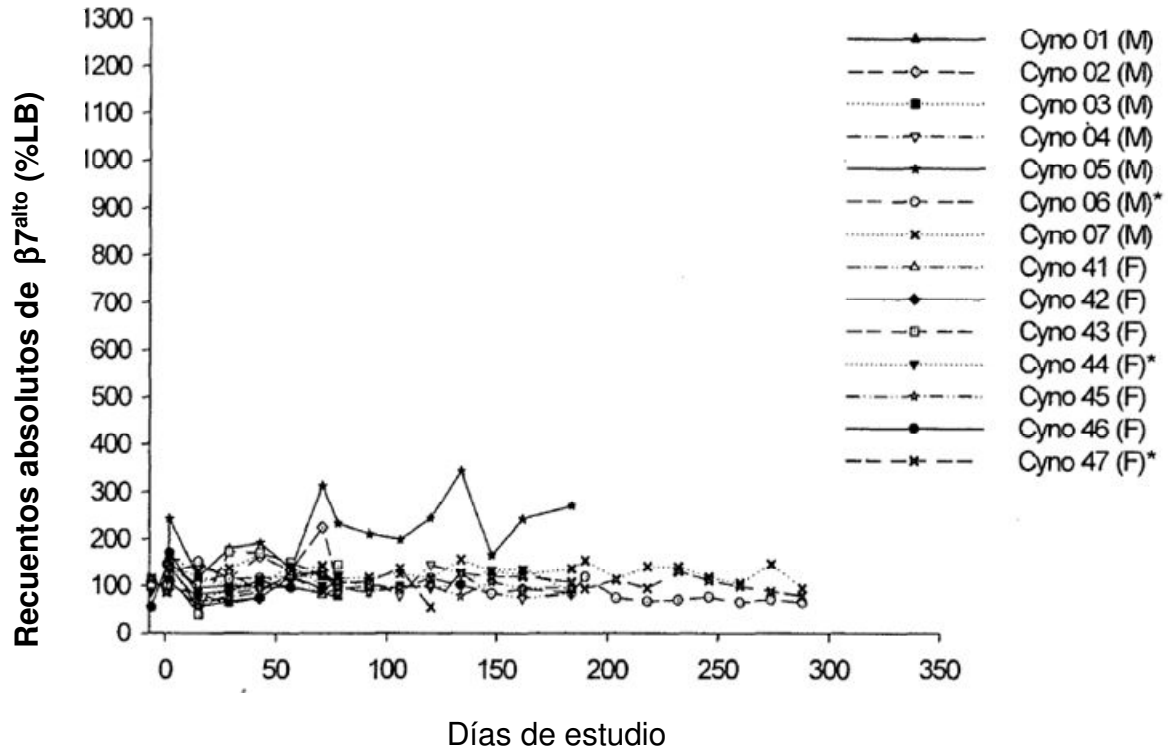


FIGURA 11

Kabat#	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	
huK1	DIQMTQSPSSLSASVGGDRVTTITC	HVR1
Fib504	DVVMTQSPATLSVTPGERISLS	RASQSI SMYLA W.
504K graft	DIQMTQSPSSLSASVGGDRVTTITC	RASESVDTYLHW
hu504-5		RASESVDTYLHW
hu504-16		SL
hu504-32		LL
		DL
Kabat#	36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75	
huK1	YQQKPKAPKLLI	HVR2
Fib504	YQQKPNESPKLLI	YAASSLLES
504K graft	YQQKPKAPKLLI	KYASSQSS
		KYASSQSSI
Kabat#	76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 a 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	
huK1	S L Q P E D F A T Y Y C	HVR3
Fib504	M G V E L E D L S I Y Y C	Q Q Y N S L P W T
504K graft	S S L Q P E D F A T Y Y C	Q Q G N S L P N T
		Q Q G N S L P N T
		F G Q G T K V E I K R (SEQ.ID NO.:12)
		F G A G T K L E L K R (SEQ.ID NO.:10)
		F G Q G T K V E I K R (SEQ.ID NO.:14)
		G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
		G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
		G V P S R F S G S G S G T D F T L T I

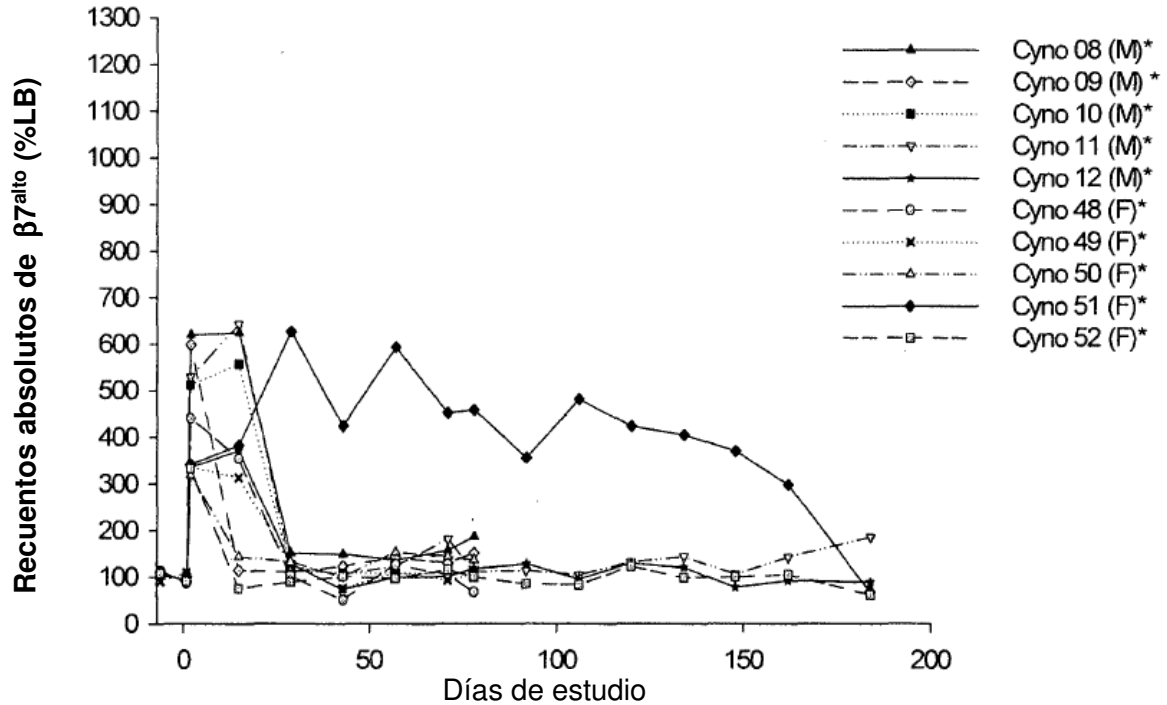
FIG. 12A

Figura 13
Recuento absoluto (% LB) en monos Cynomolgus tras 12 dosis
intravenosas o subcutáneas de vehículo



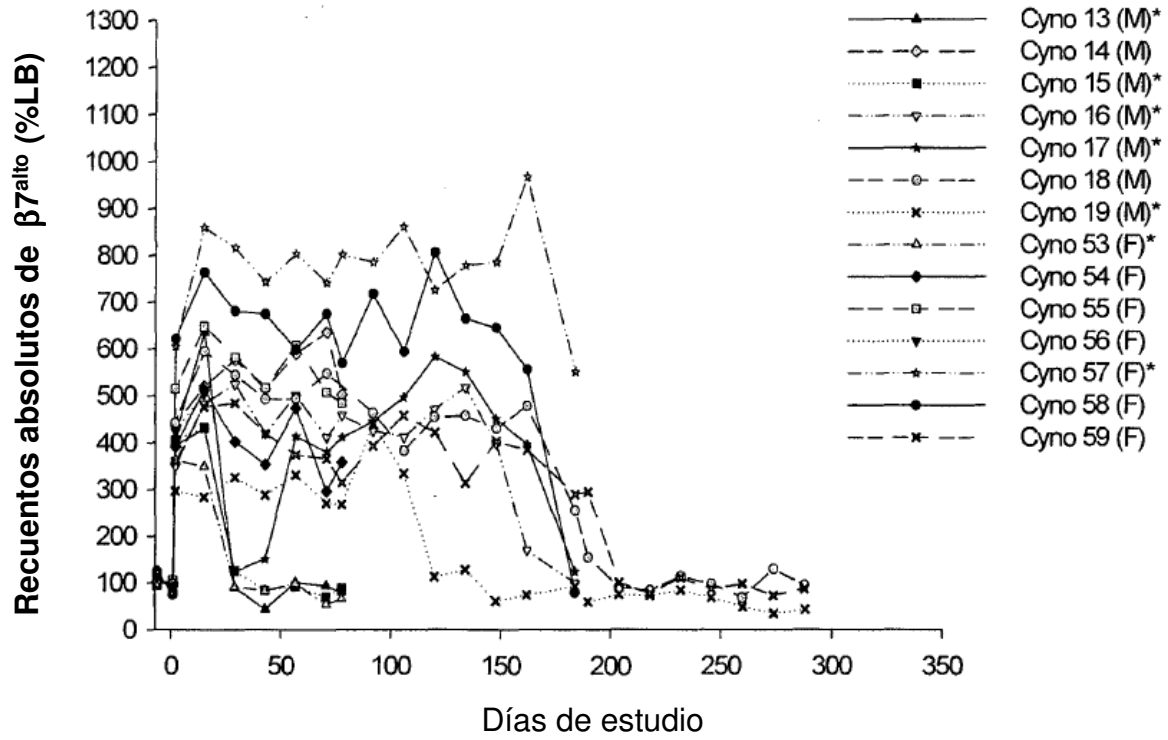
Notas: % LB = porcentaje de línea basal; los asteriscos indican animales con titulación de anticuerpos medible. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 14
Recuento absoluto (% LB) en monos Cynomolgus tras 12 dosis
intravenosas o subcutáneas de 5 mg/kg de rhuMAb Beta7



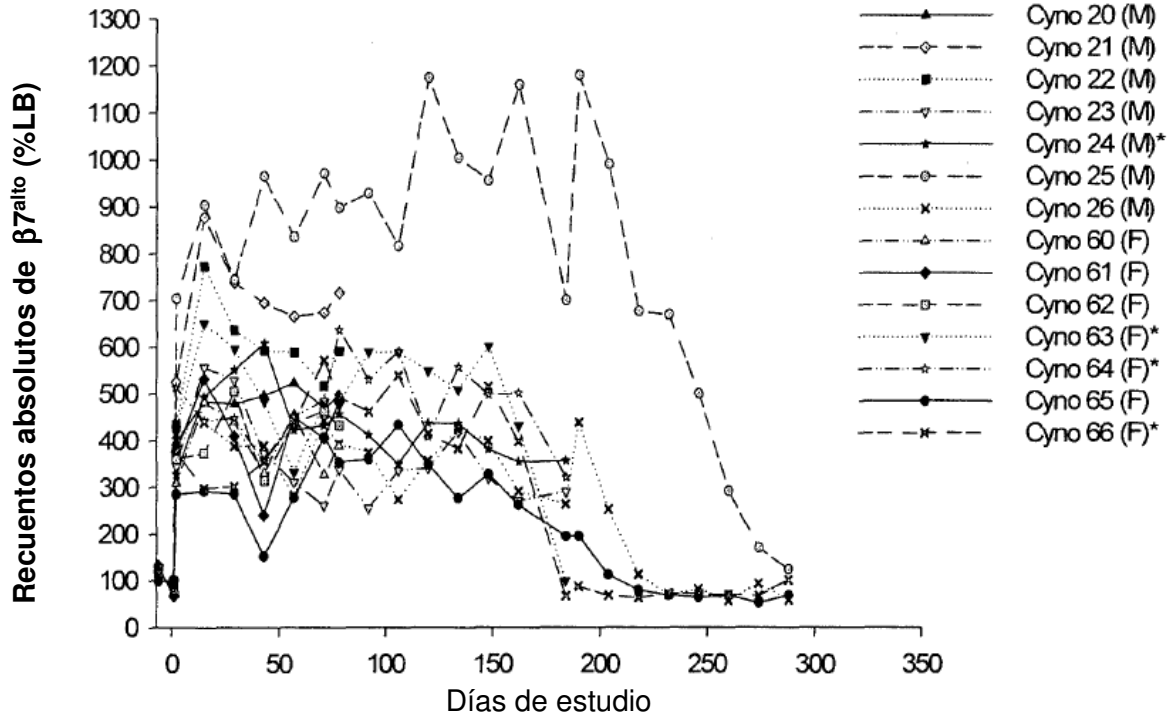
Notas: % LB = porcentaje de línea basal; los asteriscos indican animales con titulación de anticuerpos medible. Todos los animales del grupo 2 se eutanasiaron el día 184. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 15
Recuento absoluto (% LB) en monos Cynomolgus tras 12 dosis intravenosas de 15 mg/kg de rhuMAb Beta7



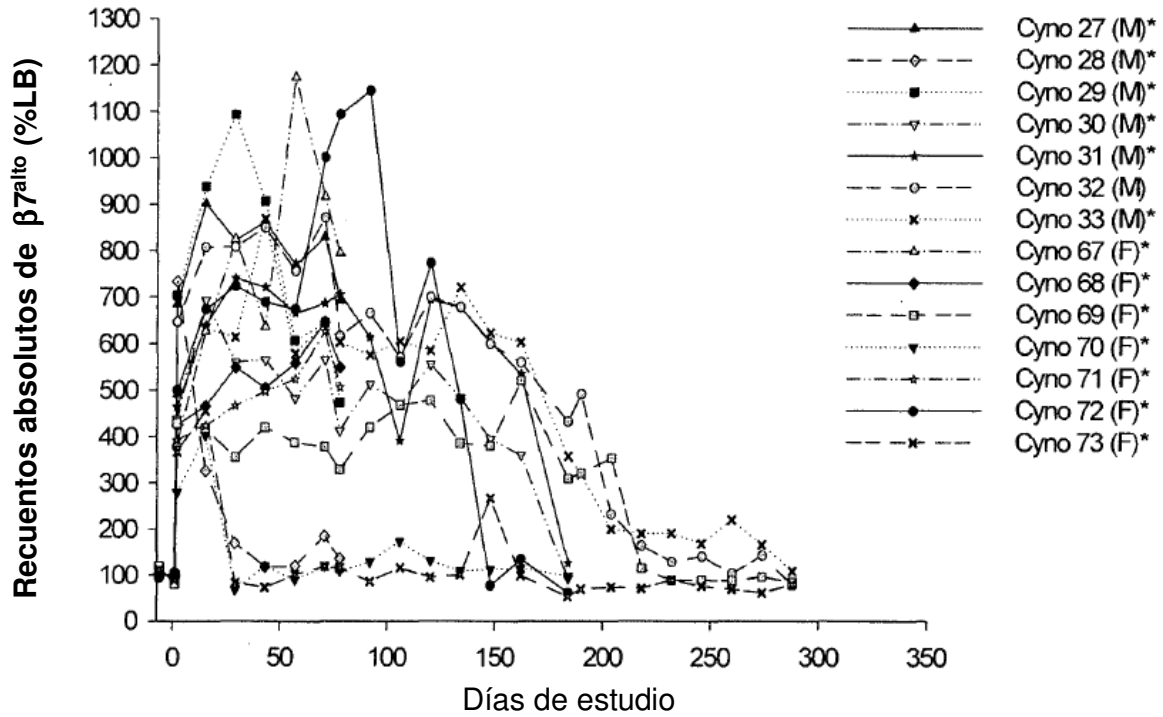
Notas: % LB = porcentaje de línea basal; los asteriscos indican animales con titulación de anticuerpos medible. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 16
Recuento absoluto (% LB) en monos Cynomolgus tras 12 dosis intravenosas de 50 mg/kg de rhuMAb Beta7



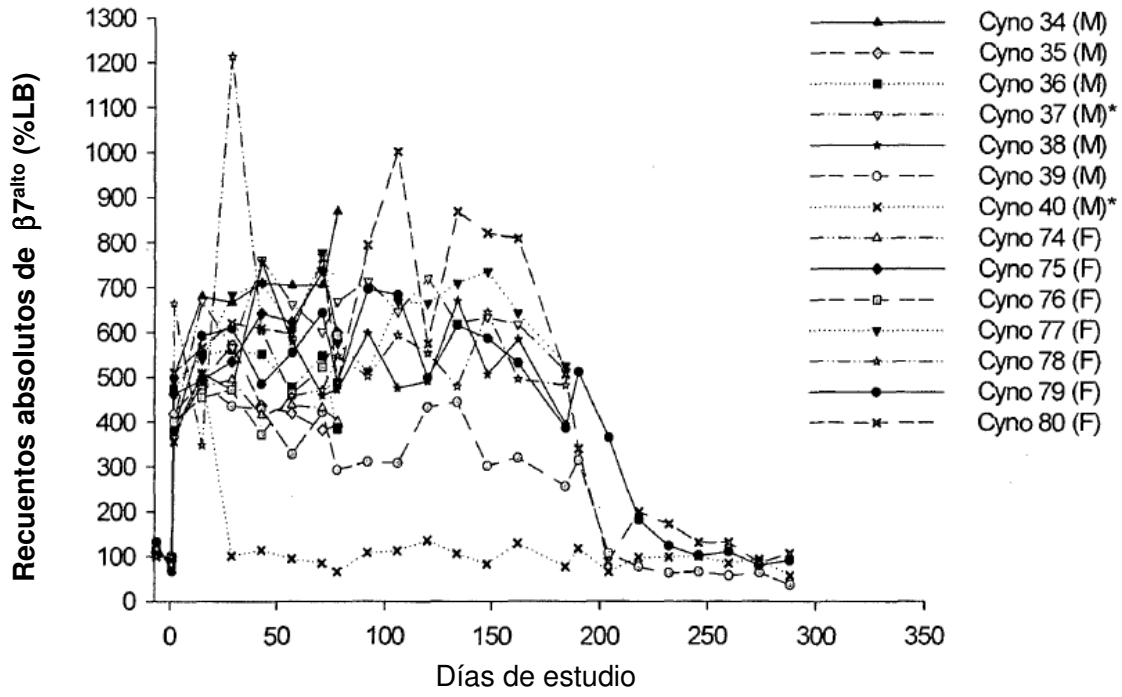
Notas: % LB = porcentaje de línea basal; los asteriscos indican animales con titulación de anticuerpos medible. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 17
Recuento absoluto (% LB) en monos Cynomolgus tras 12 dosis
subcutáneas de 15 mg/kg de rhuMAb Beta7



Notas: % LB = porcentaje de línea basal; los asteriscos indican animales con titulación de anticuerpos medible. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

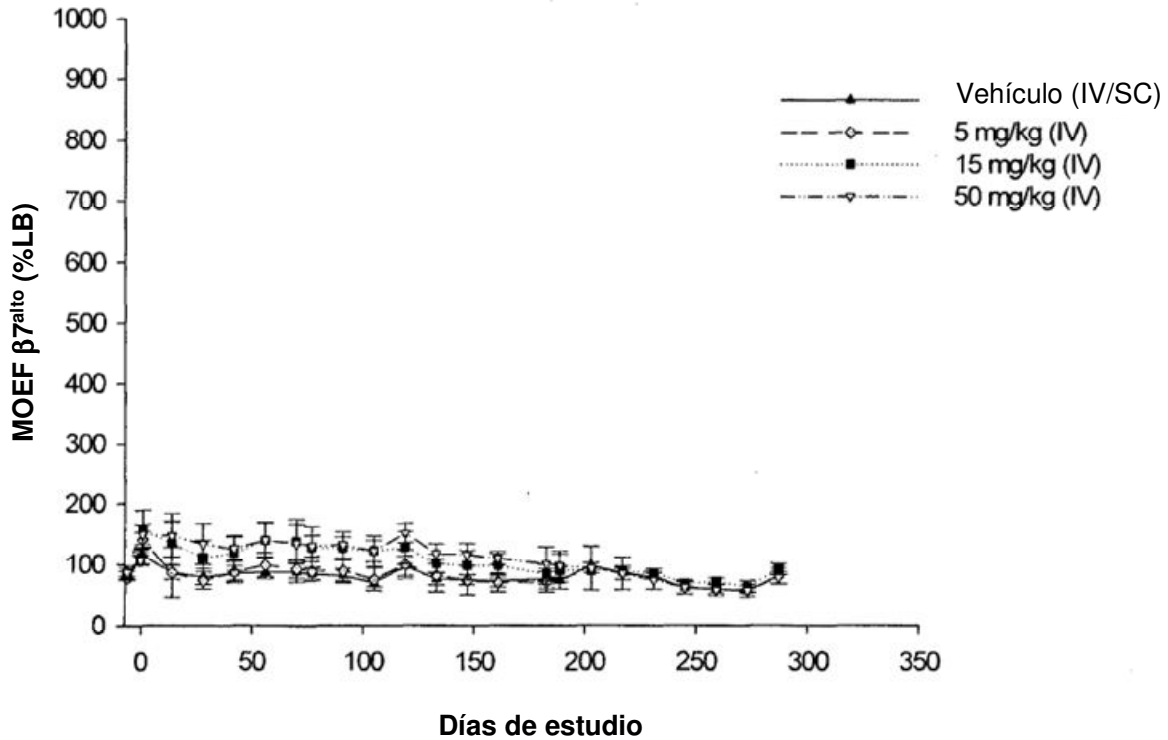
Figura 18
Recuento absoluto (% LB) en monos Cynomolgus tras 12 dosis
subcutáneas de 50 mg/kg de rhuMAb Beta7



Notas: % LB = porcentaje de línea basal; los asteriscos indican animales con titulación de anticuerpos medible. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 19

Linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en monos Cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo \pm DE)

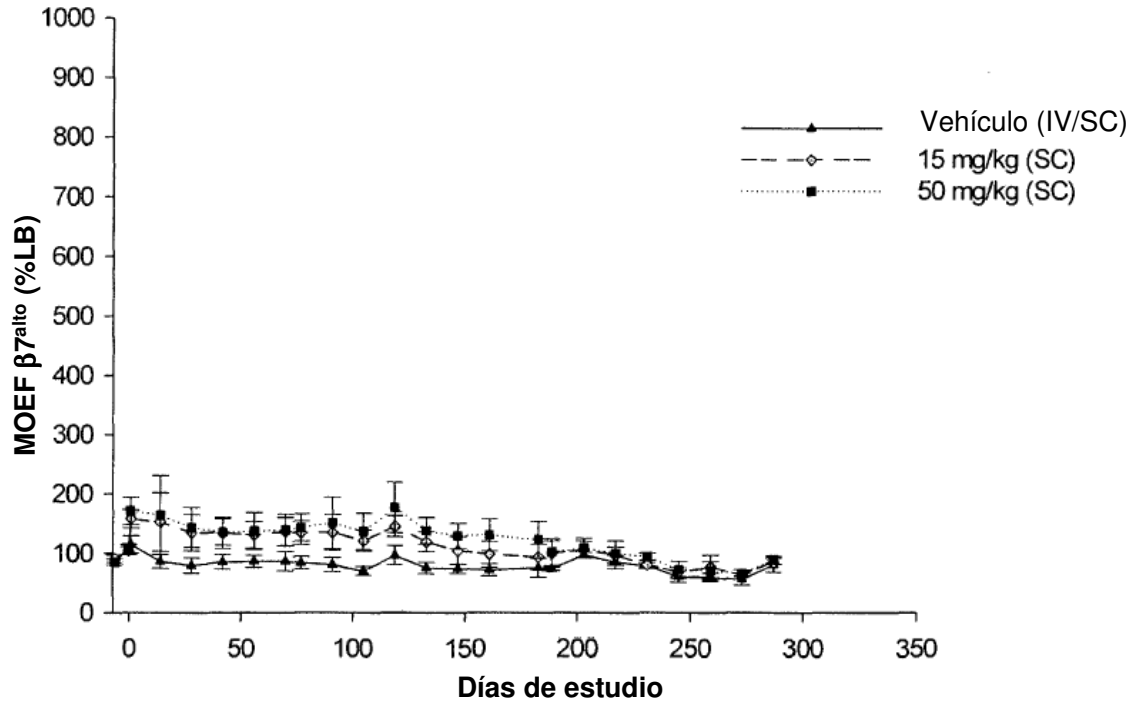


% LB = porcentaje de línea basal; MOEF= moléculas de equivalente de fluorescencia

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=10; Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), día 15 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=4; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 20

Linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ en monos *Cynomolgus* después de 12 dosis intravenosas de 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo \pm DE)

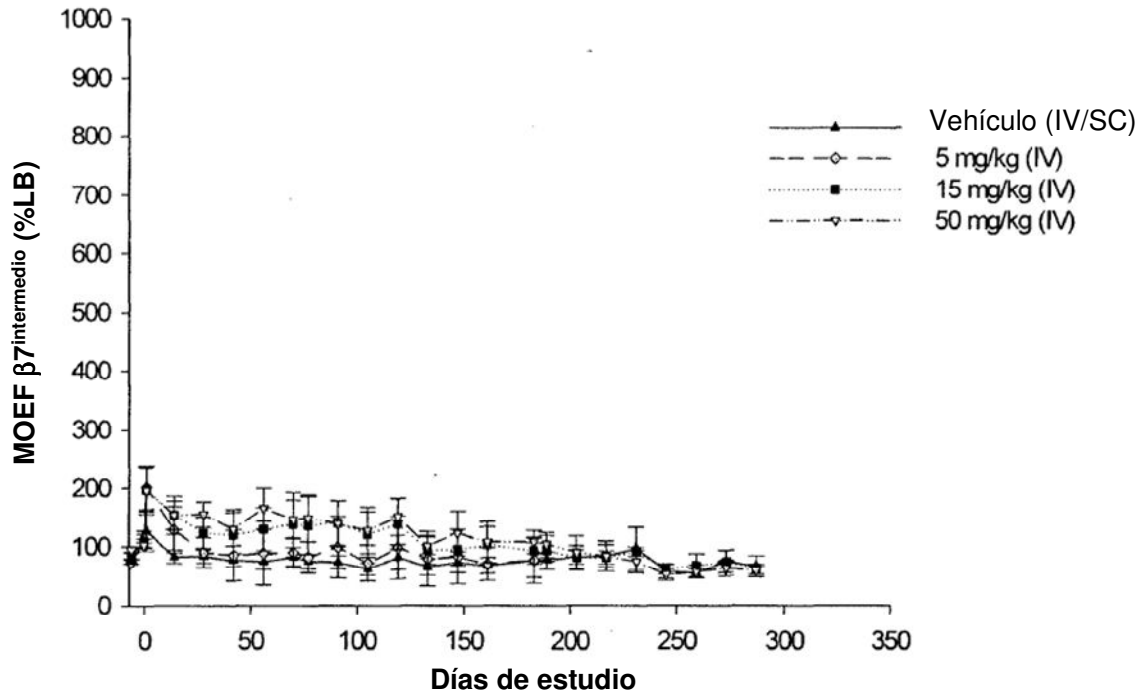


% LB = porcentaje de línea basal; MOEF= moléculas de equivalente de fluorescencia

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 21

Linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ $\beta 7$ intermedio en monos Cynomolgus después de 12 dosis intravenosas de 5, 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo \pm DE)

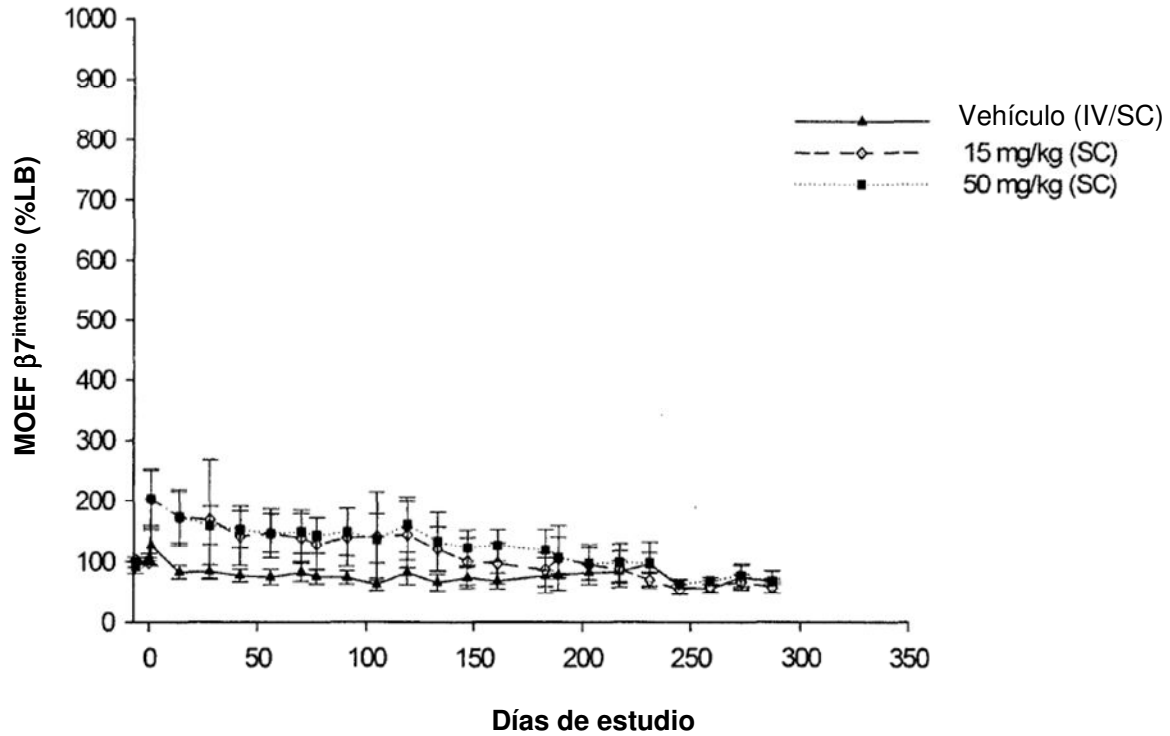


% LB = porcentaje de línea basal; MOEF= moléculas de equivalente de fluorescencia

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=10; Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), día 15 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), para el cual n=4; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 22

Linfocitos CD4⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} en monos *Cynomolgus* después de 12 dosis intravenosas de 15 o 50 mg / kg de rhuMAb Beta7 o 12 dosis intravenosas y subcutáneas de vehículo (MOEF [% línea basal], media de grupo \pm DE)



% LB = porcentaje de línea basal; MOEF= moléculas de equivalente de fluorescencia

Notas: Desde la predosis hasta el día de estudio 80, n=14 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo) día 57 post estudio, para el cual n=13. Para los días de estudio 81 a 184, n=8 en cada grupo excepto para el Grupo 1 (vehículo), para el cual n=7. Para los días de estudio 185 a 288, n=4 en cada grupo excepto para el Grupo 2 (5 mg/kg IV), en el que todos los animales se eutanasiaron; Grupo 1 (vehículo), para el cual n=3; y Grupo 3 (15 mg/kg IV), para el cual n=3. Estos análisis se realizaron con el anticuerpo no bloqueante 9D8 (véase sección 5.9.1)

Figura 23
Concentraciones en suero, media (\pm DE) de rhuMAb β 7 tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a monos Cynomolgus

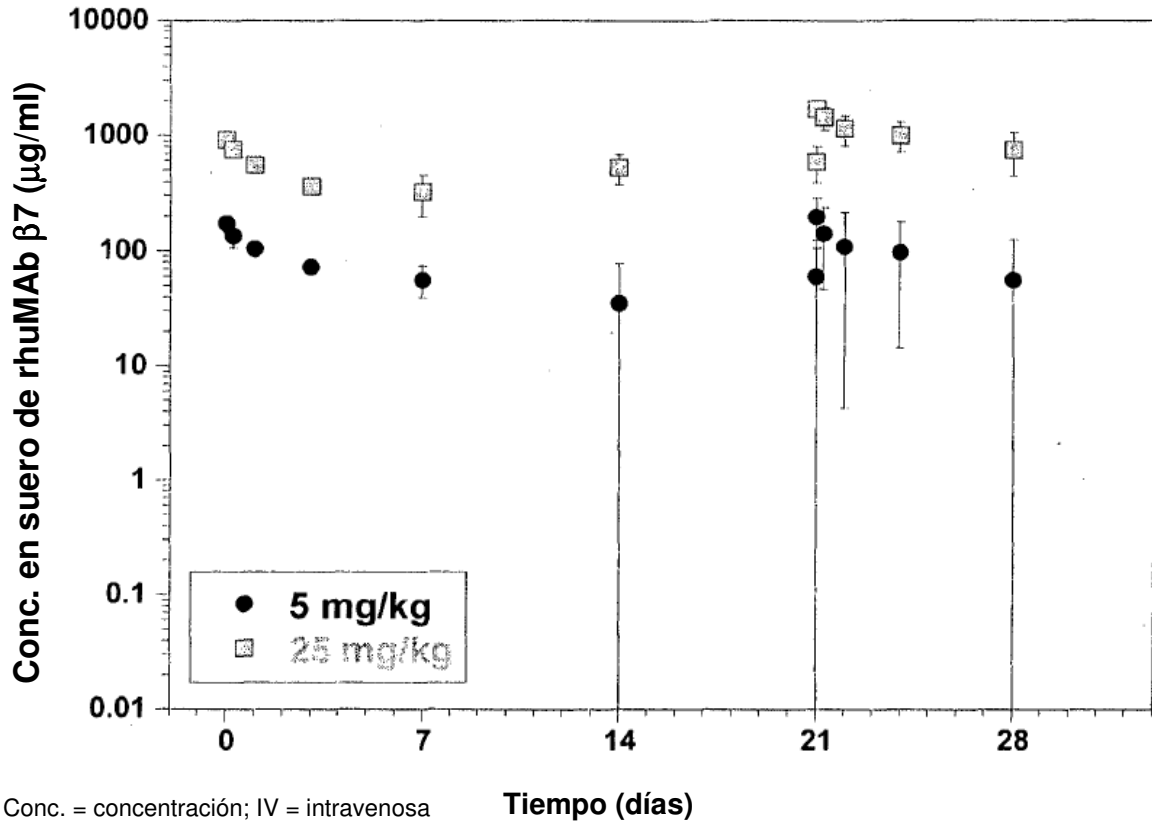
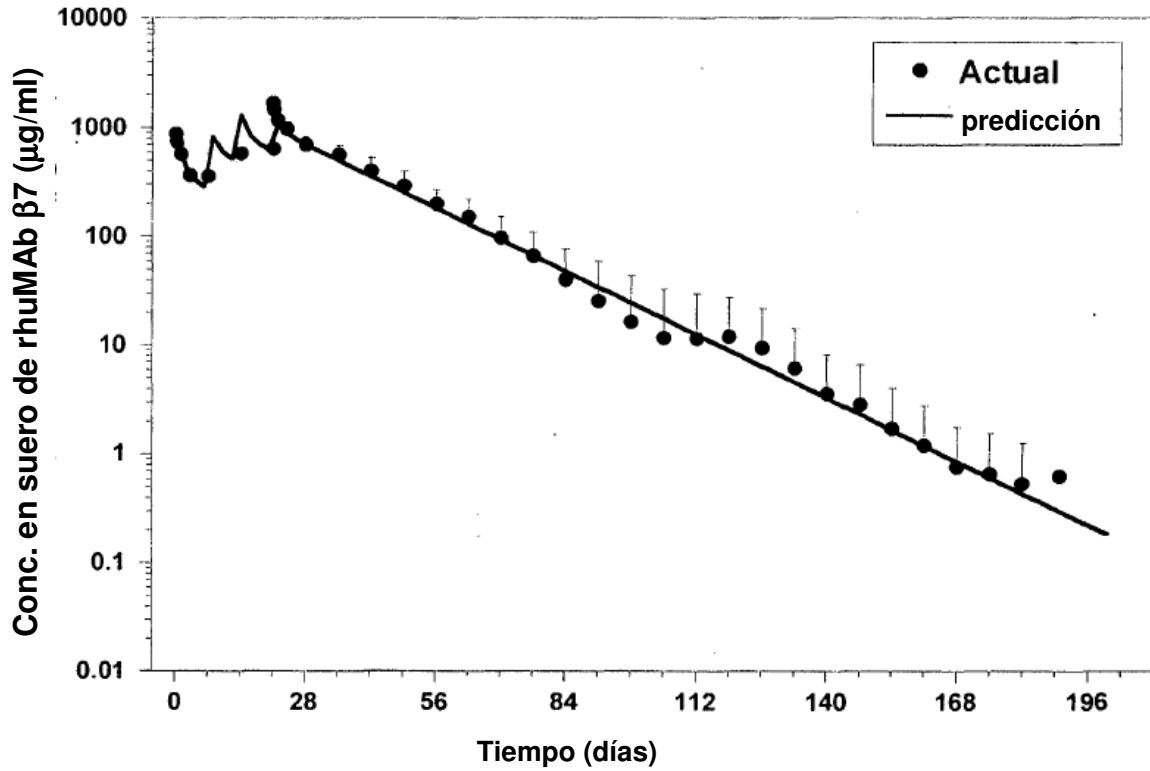


Figura 24

Concentraciones en suero, media actual (\pm DE) a partir de 4 animales de recuperación y concentraciones en suero en modelo de predicción de rhuMAb β 7 tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a monos *Cynomolgus*



Conc. = concentración; IV = intravenosa

Figura 25

Subgrupos de células T CD4 en sangre periférica de monos *Cynomolgus*

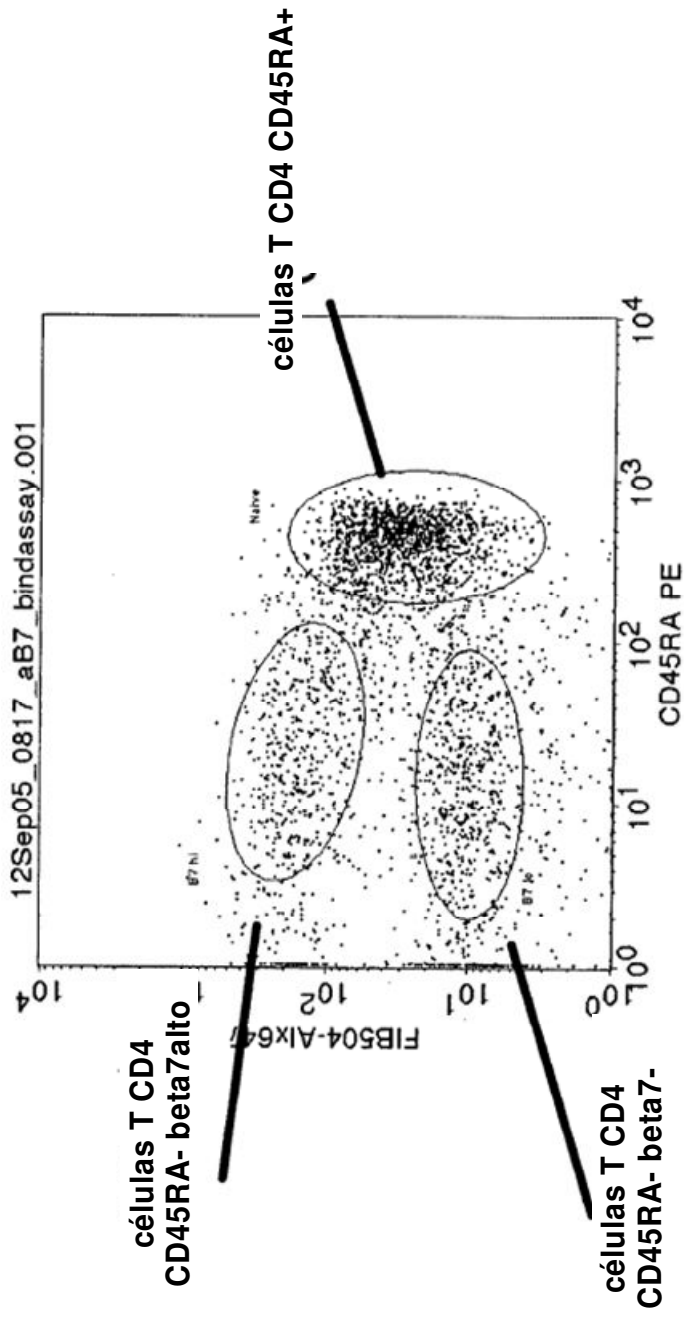
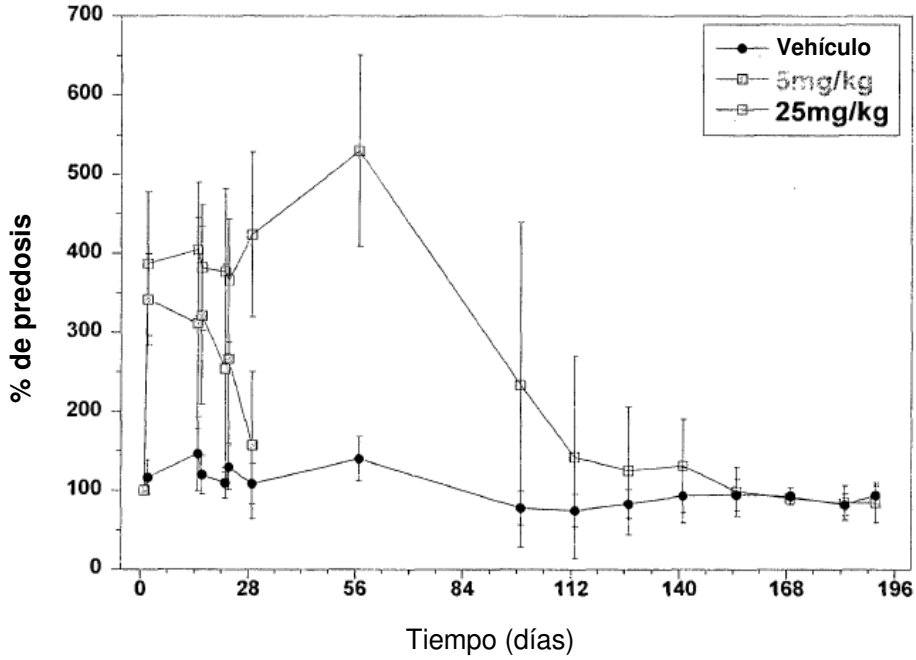


Figura 26

Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} de sangre periférica (expresado como porcentaje de predosis de línea basal) tras cuatro dosis de bolo IV semanales de vehículo o 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a monos Cynomolgus

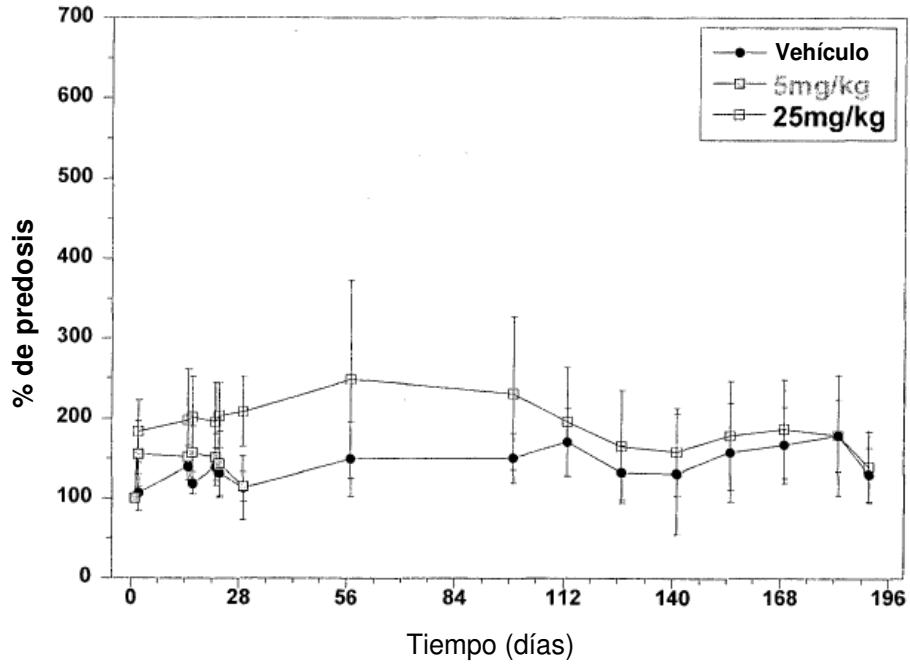


IV = intravenoso

Nota: n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 27

Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD4⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} de sangre periférica (expresado como porcentaje de predosis de línea basal) tras cuatro dosis de bolo IV semanales de vehículo o 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a monos Cynomolgus

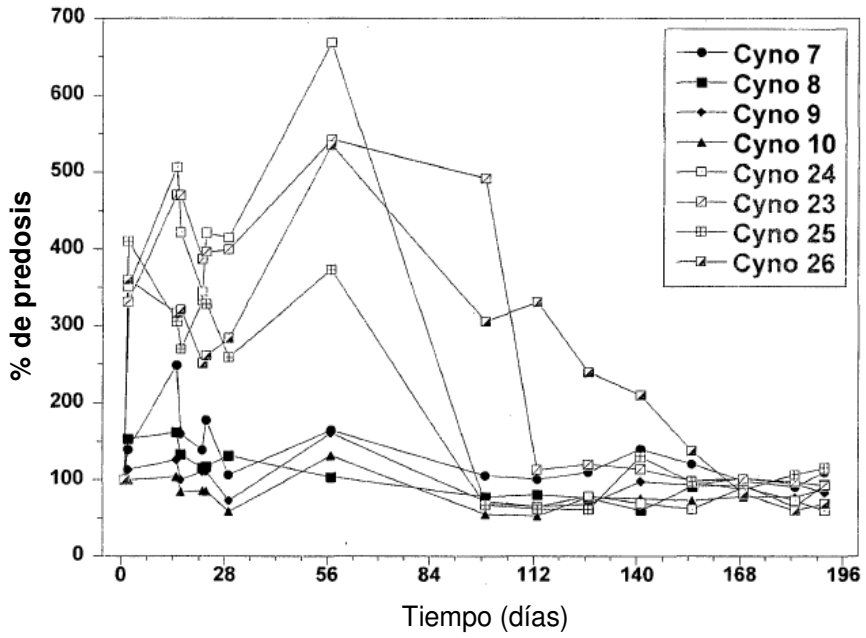


IV = intravenoso

Nota: n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 28

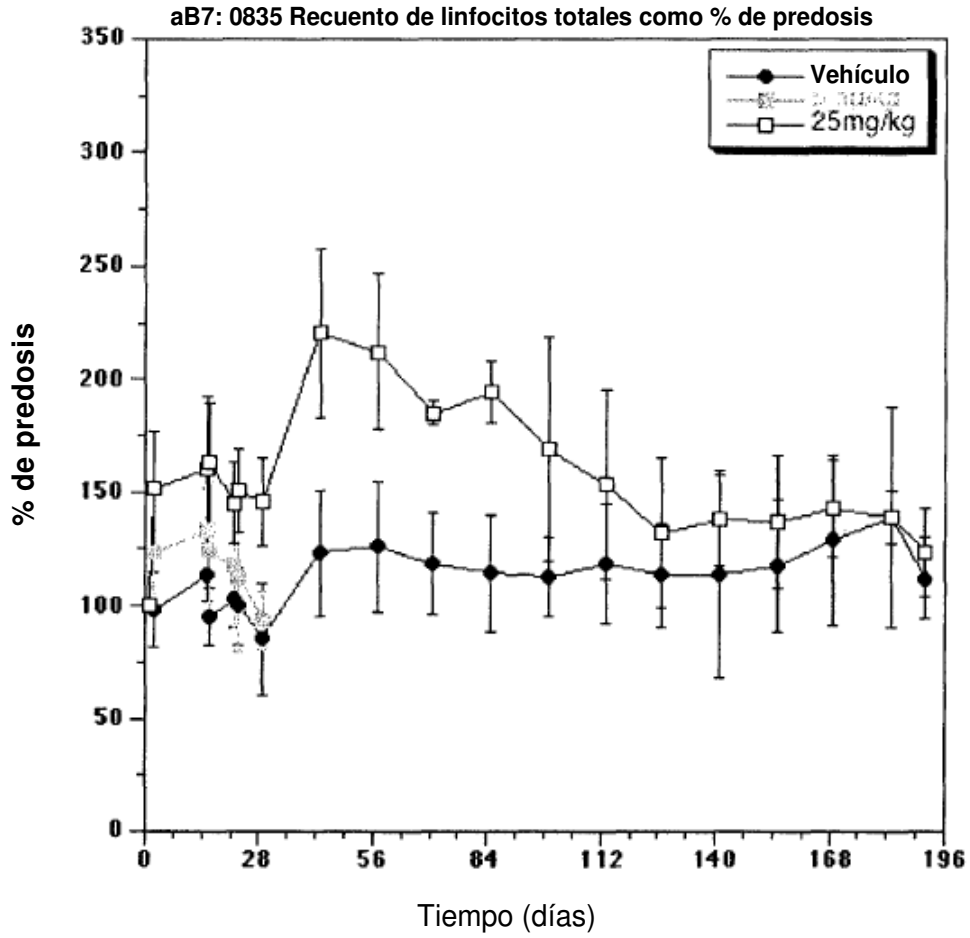
Recuento absoluto individual de células T CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} de sangre periférica (expresado como porcentaje de predosis de línea basal) tras cuatro dosis de bolo IV semanales de vehículo o 25 mg/kg de rhuMAb β7 a monos Cynomolgus



Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

Figura 29

Recuento absoluto, media (\pm DE) de linfocitos de sangre periférica (expresado como porcentaje de predosis de línea basal) tras cuatro dosis de bolo IV semanales de vehículo, 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a monos Cynomolgus

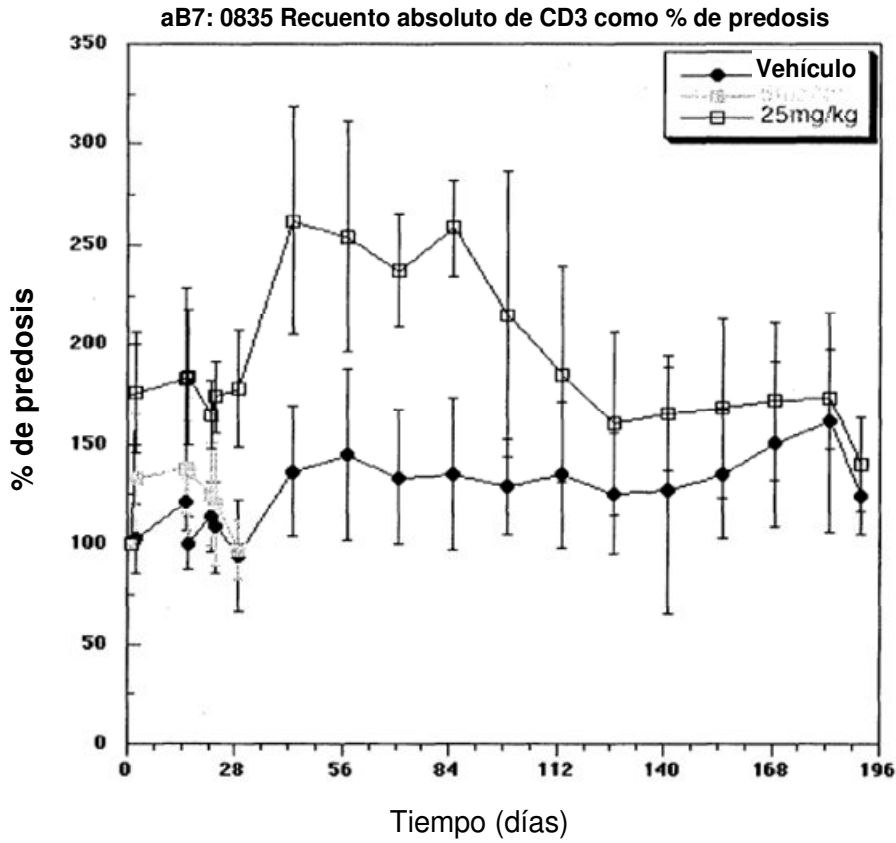


IV= intravenoso

Nota: n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 30

Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD3⁺ de sangre periférica (expresado como porcentaje de predosis de línea basal) tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a cada grupo de monos Cynomolgus

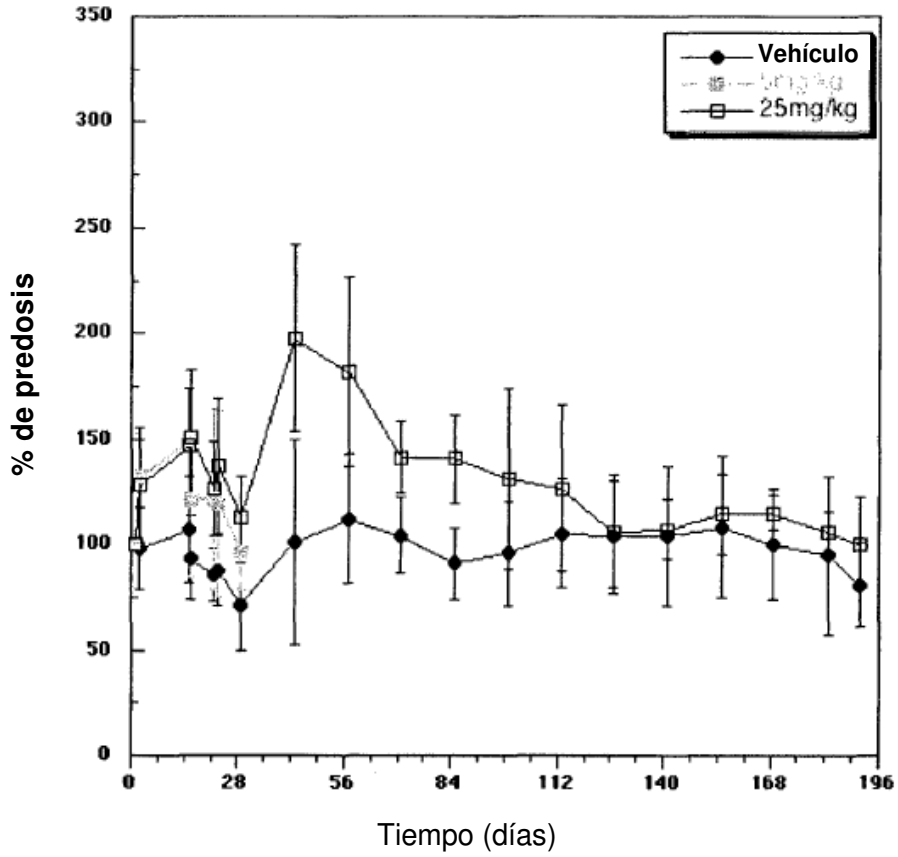


IV= intravenoso

Nota: n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 31

Recuento absoluto, media (\pm DE) de células B CD20⁺ de sangre periférica (expresado como porcentaje de predosis de línea basal) tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 5 o 25 mg/kg de rhuMAb β 7 a cada grupo de monos Cynomolgus

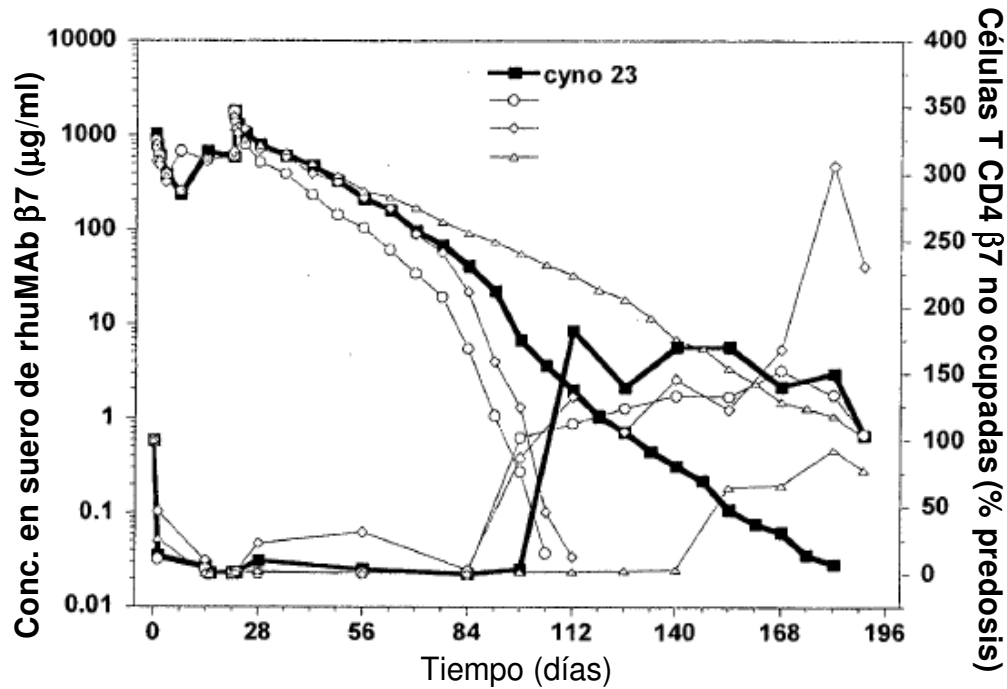


IV= intravenoso

Nota: n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 32A

Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica no ocupadas a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 23)

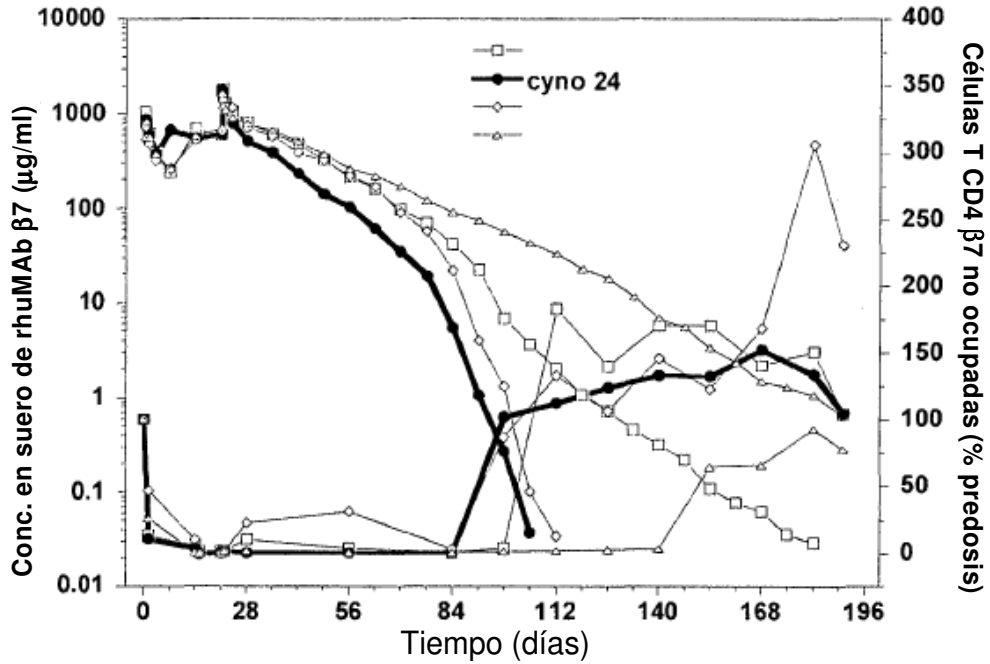


Conc. = concentración; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 32B

Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica no ocupadas a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 24)

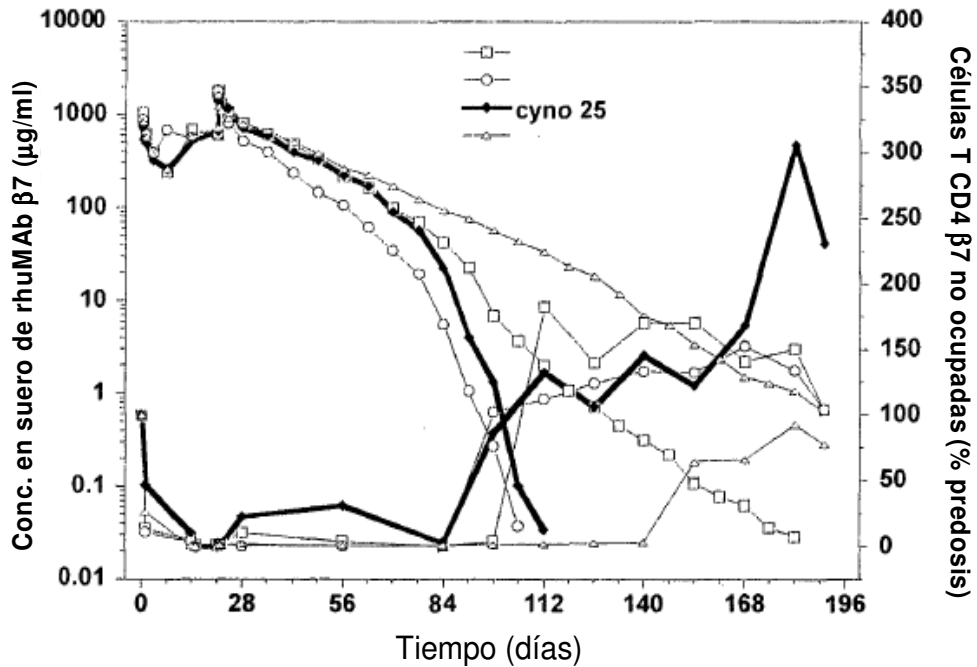


Conc. = concentración; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 32C

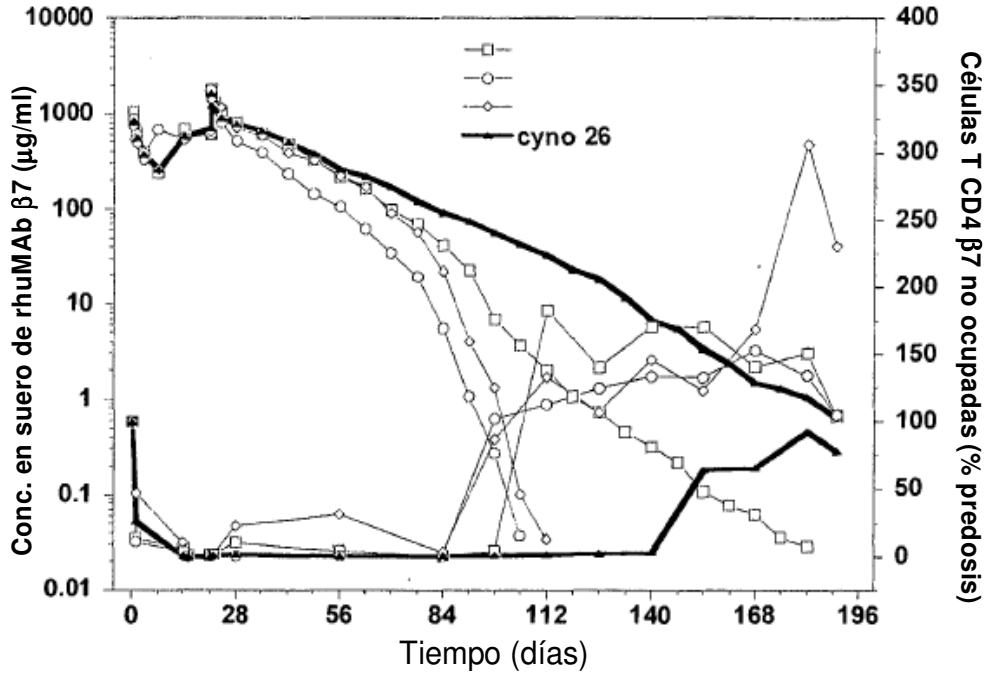
Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica no ocupadas a lo largo del tiempo en individuos de monos *Cynomolgus* tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 25)



Conc. = concentración; Cyno= monos *Cynomolgus*; IV= intravenoso
 La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 32D

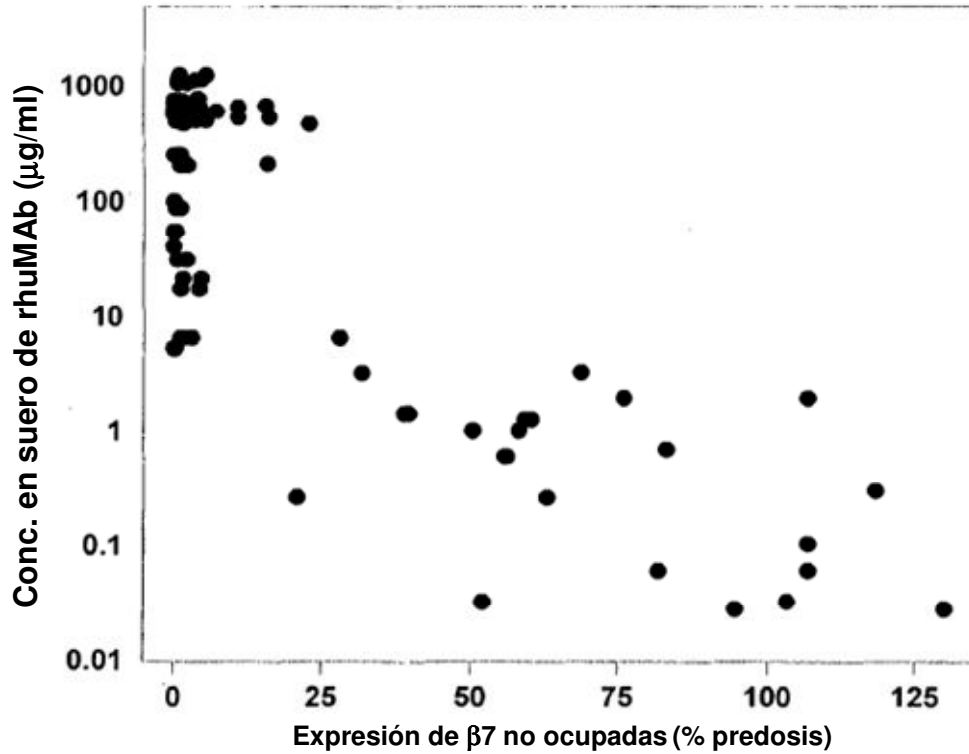
Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica no ocupadas a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 26)



Conc. = concentración; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso
 La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 33

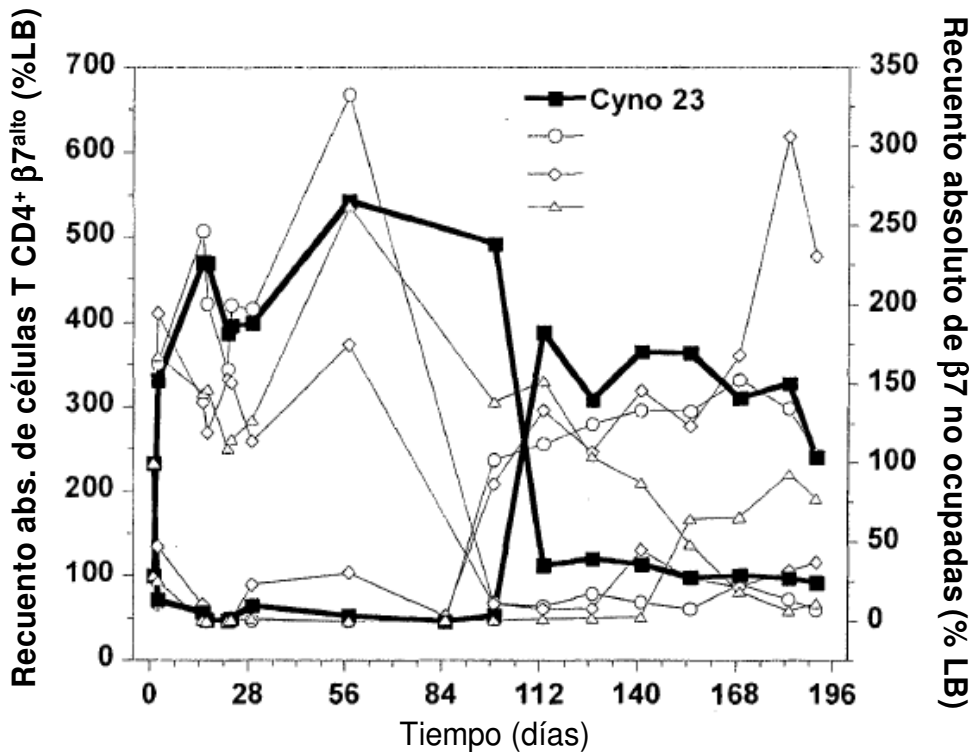
Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ de sangre periférica no ocupadas a lo largo del tiempo en individuos de monos *Cynomolgus* tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$



Conc. = concentración; Cyno= monos *Cynomolgus*; IV= intravenoso
 La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T $CD4^+$ $CD45RA^-$ $\beta 7^{alto}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 34A

Relación entre recuento absoluto de células CD4⁺ T (CD45RA⁻) de memoria/efectoras que expresan $\beta 7^{\text{alto}}$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ no ocupadas de sangre periférica a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 23)

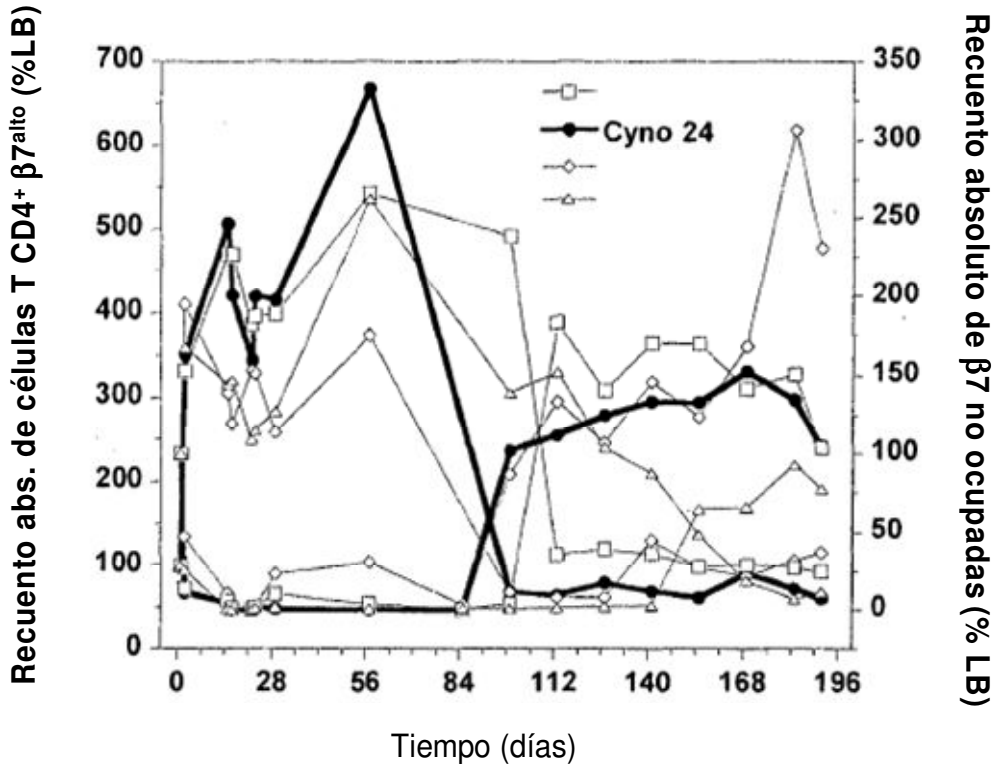


Abs. = absoluto; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 34B

Relación entre recuento absoluto de células T CD4⁺ (CD45RA⁻) de memoria/efectoras que expresan $\beta 7^{\text{alto}}$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ no ocupadas de sangre periférica a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 24)

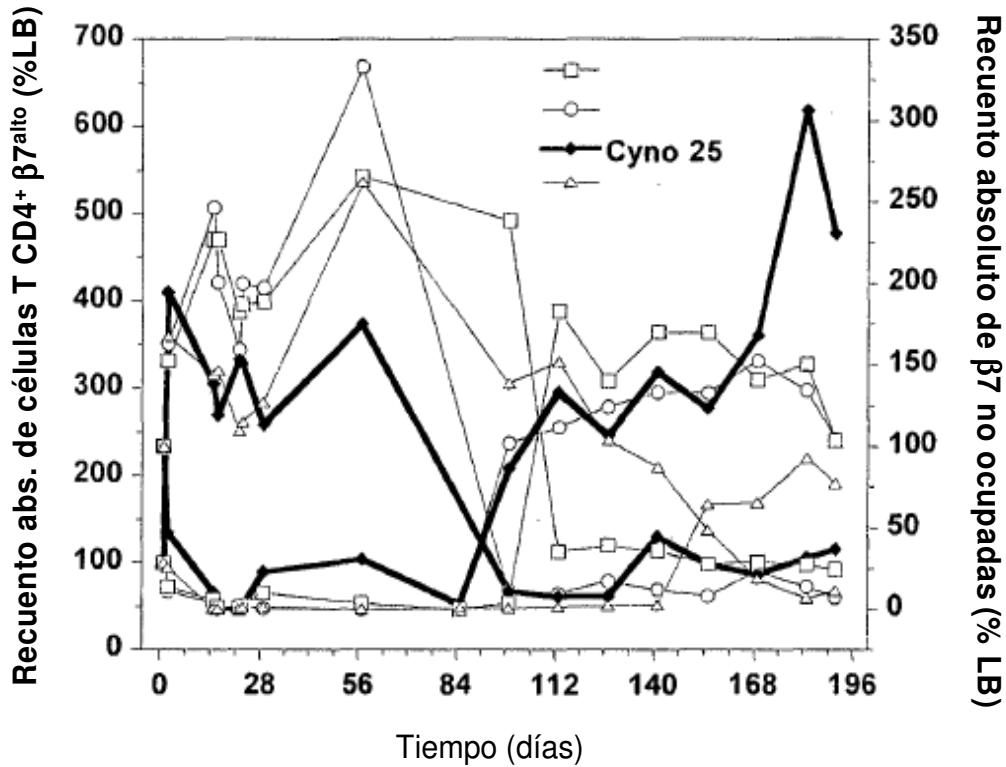


Abs. = absoluto; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 34C

Relación entre recuento absoluto de células T CD4⁺ (CD45RA⁻) de memoria/efectoras que expresan $\beta 7^{\text{alto}}$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ no ocupadas de sangre periférica a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 25)

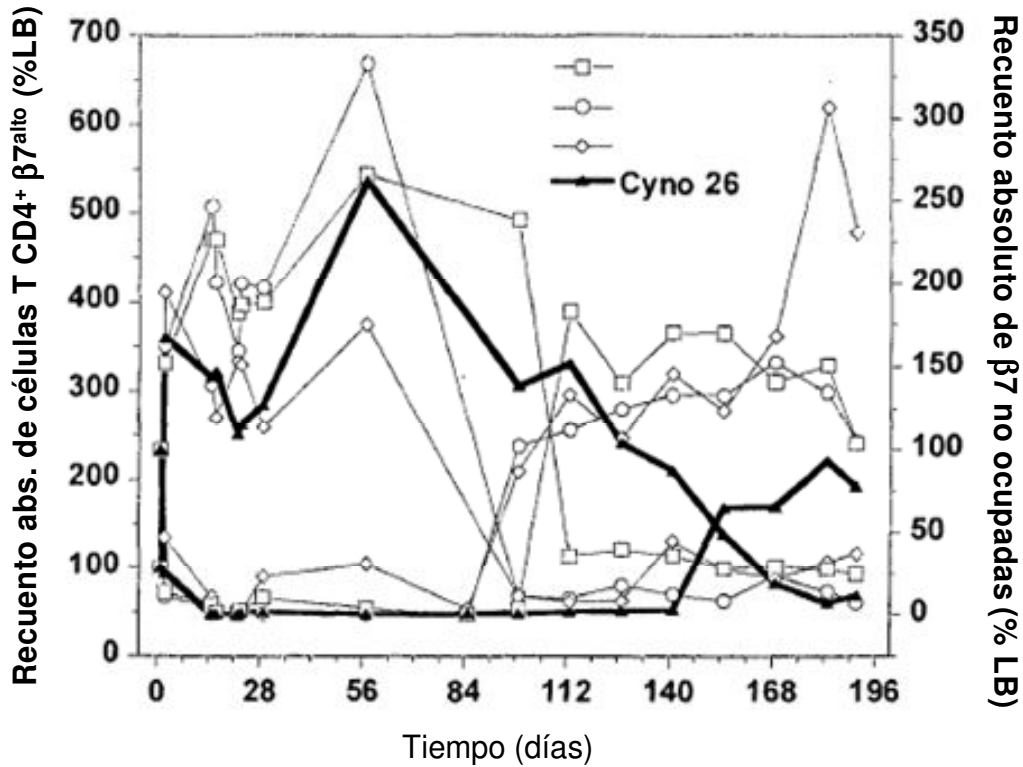


Abs. = absoluto; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 34D

Relación entre recuento absoluto de células T CD4⁺ (CD45RA⁻) de memoria/efectoras que expresan $\beta 7^{\text{alto}}$ y células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ no ocupadas de sangre periférica a lo largo del tiempo en individuos de monos Cynomolgus tras cuatro dosis de bolo IV semanales de 25 mg/kg de rhuMAb $\beta 7$ (Animal 26)

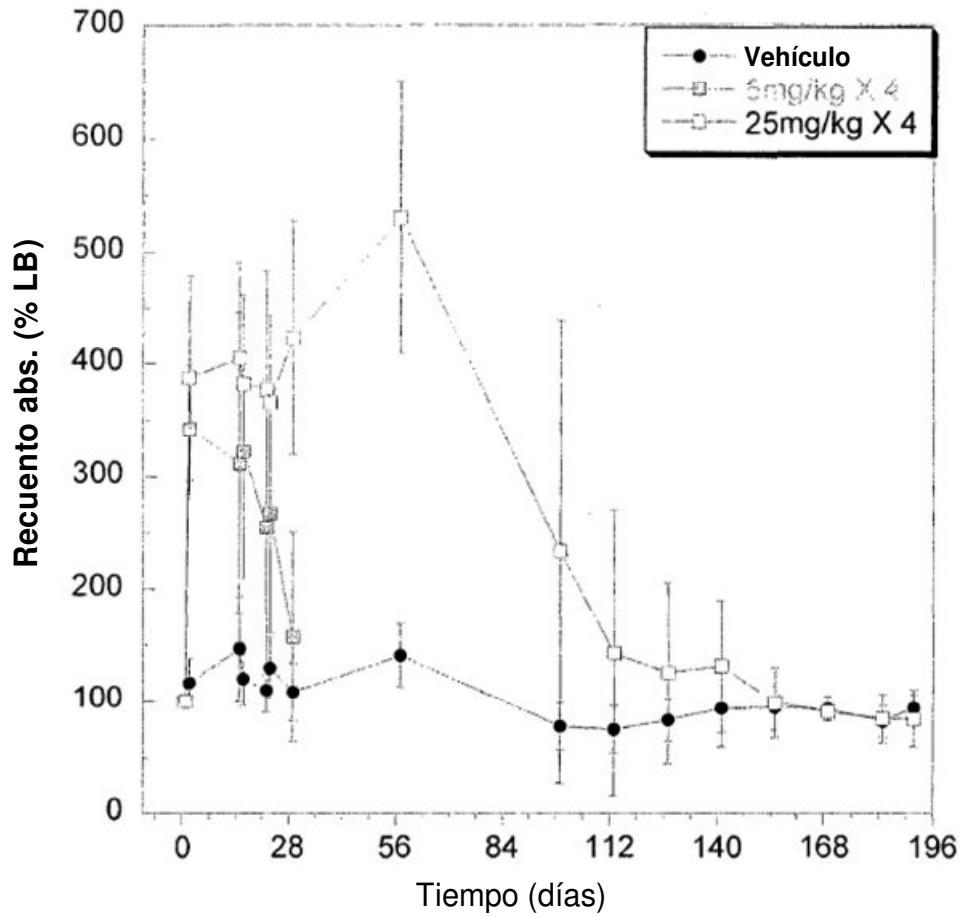


Abs. = absoluto; Cyno= monos Cynomolgus; IV= intravenoso

La expresión de receptor $\beta 7$ no ocupado en células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica se midió como valores absolutos de células T CD4⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ de sangre periférica y se expresa como porcentaje de cada valor de predosis del mono

Figura 35

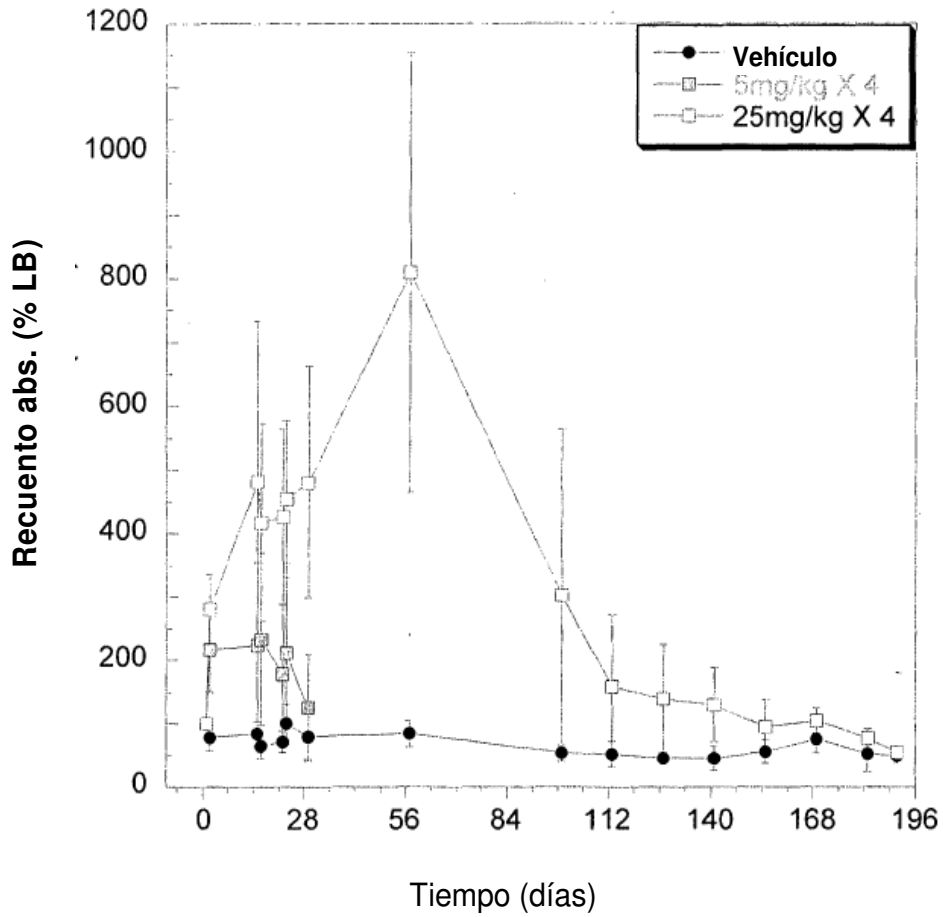
Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD4⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} de sangre periférica (vehículo o 5 o 25 mg/kg)



Nota: El recuento de células T se expresa como porcentaje de línea basal de predosis; n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 36

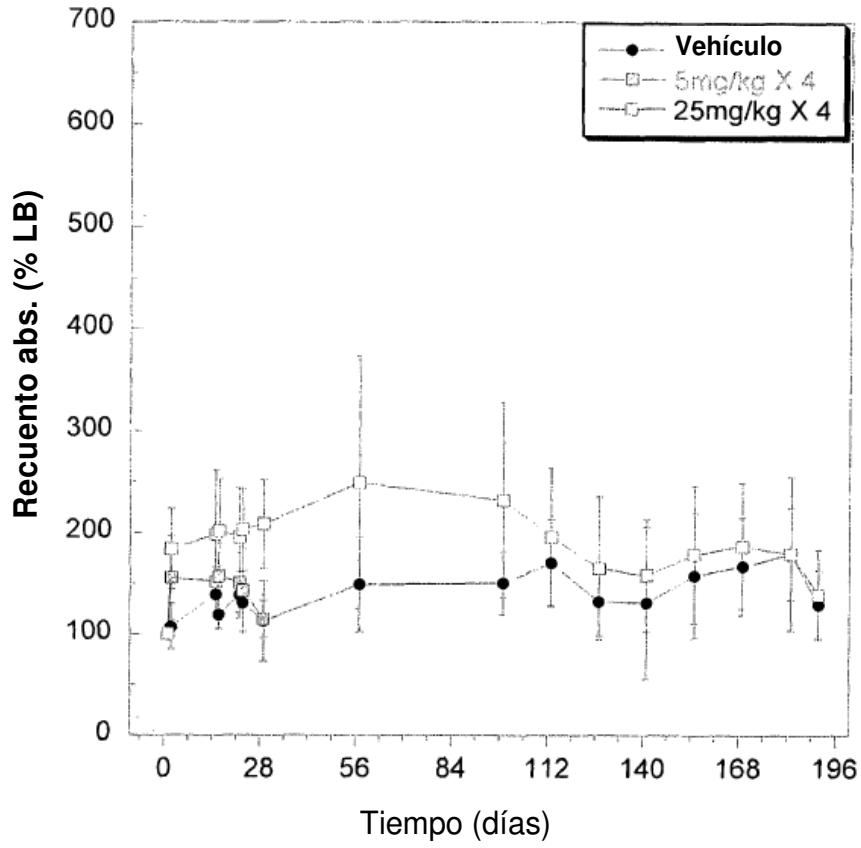
Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD8⁺ CD45RA⁻ β 7^{alto} de sangre periférica (vehículo o 5 o 25 mg/kg)



Nota: El recuento de células T se expresa como porcentaje de línea basal de predosis; n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 37

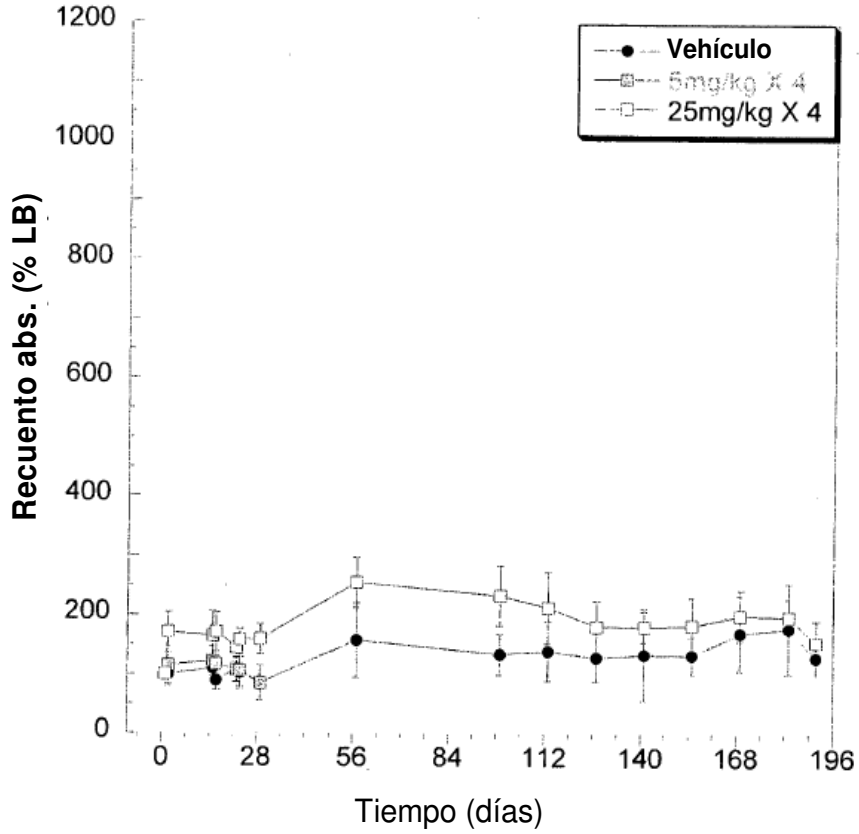
Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD4⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} de sangre periférica (vehículo o 5 o 25 mg/kg)



Nota:El recuento de células T se expresa como porcentaje de línea basal de predosis; n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 38

Recuento absoluto, media (\pm DE) de células T CD8⁺ CD45RA⁺ β 7^{intermedio} de sangre periférica (vehículo o 5 o 25 mg/kg)



Nota: El recuento de células T se expresa como porcentaje de línea basal de predosis; n=6-10/ grupo para los días 0-28, y después 4 / grupo tras el día 28

Figura 39

Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T $CD4^+ CD45RA^- \beta 7^{alto}$ disponibles de sangre periférica que expresan $\beta 7$ (Individuos; 25 mg/kg)

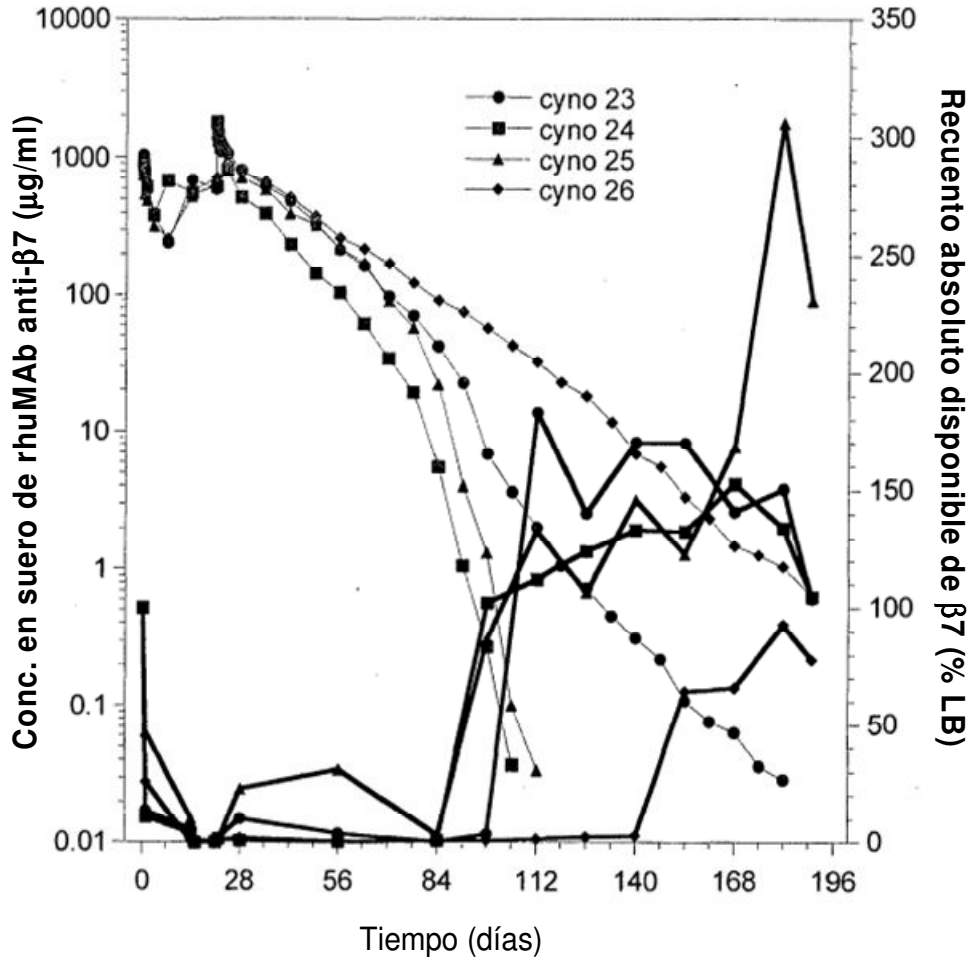


Figura 40

Relación entre concentraciones en suero de rhuMAb $\beta 7$ y células T CD8⁺ CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{alto}}$ disponibles de sangre periférica que expresan $\beta 7$ (Individuos; 25 mg/kg)

