

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 689**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01)
A61K 31/60 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2001 E 10010997 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2298348**

54 Título: **Anticuerpo que enlaza con la integrina alfa4beta7 y su uso para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria**

30 Prioridad:

14.04.2000 US 550082
27.12.2000 US 748960

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2017

73 Titular/es:

MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

BRETTMAN, LEE R.;
FOX, JUDITH A. y
ALLISON, DAVID EDWARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 609 689 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).

Anticuerpo que enlaza con la integrina alfa4beta7 y su uso para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria**Descripción**

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los receptores de la integrina son importantes para regular tanto la regulación de linfocitos como el reclutamiento a los sitios de inflamación (Carlos, T.M. y Harlan, J.M., Blood, 84:2068-2101 (1994)). La integrina $\alpha 4\beta 7$ humana tiene varios ligandos, uno de los cuales es la adhesina vascular de la mucosa MAdCAM-1 (Berlin, C., y otros, Cell 74:185-195 (1993); Erle, D.J., y otros, J. Immunol. 153:517-528 (1994)) expresada en vénulas endoteliales altas en nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer (Streeter, P.R. y otros, Nature 331:41-46 (1988)). Como tal, la integrina $\alpha 4\beta 7$ actúa como un receptor de guiado que media la migración de linfocitos al tejido linfóide de la mucosa intestinal (Schweighoffer, T., y otros, J. Immunol. 151:717-729 (1993)). Además, la integrina $\alpha 4\beta 7$ interactúa con la fibronectina y la molécula de adhesión celular vascular- (VCAM-1).

15 La enfermedad intestinal inflamatoria (EII), como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, por ejemplo, puede ser una enfermedad debilitadora y progresiva que implica la inflamación del tracto gastrointestinal. Afectando a una estimación de dos millones de personas sólo en los Estados Unidos, los síntomas incluyen dolor abdominal, calambres, diarrea y sangrado rectal. Los tratamientos de la EII han incluido fármacos antiinflamatorios (como, corticoesteroides y sulfasalazina), fármacos inmunosupresivos (como, 6-mercaptopurina, ciclosporina y azatioprina) y cirugía (como, colectomía). Podolsky, New Engl. J. Med., 315:928-937 (1991) y Podolsky, New Engl. J. Med., 325:1008-1016 (1991). Sin embargo, dichos agentes terapéuticos no han sido efectivos en mantener la remisión de la EII.

25 Los anticuerpos contra la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, como la el anticuerpo monoclonal murino Act-1 (mAb Act-1), interfieren con la integrina $\alpha 4\beta 7$ enlazando con la molécula-1 de adhesión celular de la adhesina de la mucosa (MAdCAM-1) presente en vénulas endoteliales altas en los nódulos linfáticos de la mucosa. El Act-1 fue originalmente aislado por Lazarovits, A.I., y otros, j. Immunol. 133:1857-1862 (1984), de ratones inmunizados con linfocitos T-específicos del toxoide del tétano humanos y se informó que era un anticuerpo IgG1/k de ratón. Análisis más recientes del anticuerpo por Schweighoffer, T y otros, J. Immunol. 151:717-729 (1993) demostraron que puede enlazar con un subconjunto de linfocitos T CD4+ de la memoria humana que expresan selectivamente la integrina $\alpha 4\beta 7$. Sin embargo, un problema serio usando anticuerpos murinos para las aplicaciones terapéuticas en humanos es que son altamente inmunogénicos en humanos e inducen rápidamente una respuesta de anticuerpos anti-murinos (HAMA), lo que reduce la eficacia del anticuerpo del ratón en pacientes y puede evitar la administración continuada. La respuesta HAMA resulta en un despeje rápido del anticuerpo de ratón, limitando severamente cualquier beneficio terapéutico.

40 Gastroenterology, 116, Nº 4, parte 2, página A726, (1999) divulga el tratamiento de colitis ulcerosa con un anticuerpo humanizado recombinante con integrina alfa 4 (Antegren (R)). El documento describe los resultados de un estudio en el que un dosis individual de 3 mg/kg de Antegren que enlaza con las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$, se administró a pacientes con colitis ulcerosa. El documento informa que el tratamiento dio como resultado una reducción de la puntuación Powell-Tuck (PT) mediana de un nivel de pre-tratamiento de 10 a 7,5 y 6. Esta es un reducción mediana de la puntuación PT de 2,5 y 4 después del tratamiento.

45 Por lo tanto, existe una necesidad de enfoques terapéuticos mejorados a enfermedades intestinales crónicas y otros desórdenes inflamatorios de los tejidos de la mucosa.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 La invención proporciona inmunoglobulina humanizada o un fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para su uso en el tratamiento de un humano que tiene una enfermedad como se define en las reivindicaciones añadidas.

55 Se describe en la presente un método para administrar un anticuerpo (por ejemplo anticuerpo humanizado). Se divulga en la presente un método para tratar a un humano que tiene una enfermedad asociada con infiltración de leucocitos de tejidos de la mucosa que comprende administrar al humano una cantidad efectiva de una inmunoglobulina que tiene especificidad de enlace con la integrina $\alpha 4\beta 7$. En aspectos preferidos de la divulgación no se administran más de alrededor de 8 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal en un periodo de alrededor de un mes. En aspectos particulares de la divulgación, la inmunoglobulina puede incluir una o más regiones determinantes complementarias (CDRs) que tienen la secuencia de aminoácidos de una CDR de Act-1 mAb murina. El LDP-02 es un anticuerpo preferido para la administración. La inmunoglobulina puede administrarse en dosis múltiples y el intervalo entre dosis puede ser al menos 1 día o mayor. En realizaciones particulares, el intervalo entre dosis puede ser al menos 7, 14 ó 21 días o alrededor de un mes. En una realización, la cantidad de inmunoglobulina administrada por dosis puede ser una cantidad que es suficiente para lograr alrededor del 50% o más de saturación de sitios de enlace de $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes y/o alrededor del 50% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de linfocitos circulantes durante un periodo de al menos alrededor de 10 días tras la

administración de la dosis. En otra realización, la cantidad de inmunoglobulina administrada por dosis puede ser una cantidad que es suficiente para lograr y mantener una concentración sérica de dicha inmunoglobulina de al menos alrededor de 1 µg/ml durante un periodo de alrededor de 10 días tras la administración de la dosis.

5 La inmunoglobulina puede administrarse sola o junto con uno o más agentes para tratar una enfermedad asociada con la infiltración de leucocitos de los tejidos de la mucosa. Por ejemplo, al inmunoglobulina puede administrarse con esteroides, agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios no esteroideos o inmunomoduladores. En una realización preferida, la inmunoglobulina se administra para tratar a un humano que tiene un enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

10

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

15

La FIGURA 1 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:2) de la región de cadena ligera del Act-1 del ratón (*Mus musculus*) unida con la secuencia del péptido señal de cadena ligera del Act-1.

20

La FIGURA 2 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:3) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo Act-1 de ratón. La secuencia de nucleótidos de la región variable está unida con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de péptido señal de cadena pesada del Act-1 de ratón deducida, para producir una secuencia compuesta. (La identidad del cebador que amplifica la región de cadena pesada se dedujo de la secuencia degenerada, y la secuencia de aminoácidos para el péptido señal se derivó del cebador, secuencia abajo y secuencias de otros péptidos señal. El péptido señal mostrado puede no ser idéntico al del híbrido del Act-1).

25

La FIGURA 3 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:5) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:6) de una parte de la cadena pesada de un anticuerpo Act-1 humanizado (LDP02) con un péptido señal de cadena pesada.

30

La FIGURA 4 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:7) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8) de una parte de la cadena ligera de un anticuerpo Act-1 humanizado con un péptido señal de cadena ligera,

35

La FIGURA 5 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos de las regiones determinantes complementarias de cadena ligera (CDR1, SEQ ID NO: 9; CDR2, SEQ ID NO:10; CDR3, SEQ ID NO:11) y las regiones determinantes de cadena pesada (CDR1, SEQ ID NO: 12; CDR2, SEQ ID NO:13; CDR3, SEQ ID NO:14) del anticuerpo murino Act-1 y LDP-02.

40

La FIGURA 6 es un gráfico que muestra los niveles de LDP-02 séricos medios (µg/mL) en hombres sanos durante el tiempo que sigue a una única administración de LDP-02. Los niveles de LDP-02 sérico medios se vuelven insignificantes en el día 36 después de la administración de 0,15 mg/kg por inyección intravenosa (IV)(-◆-) o subcutánea (SC)(-■-) y después de la administración de 0,5 mg/kg por inyección intravenosa (-▲-). Sin embargo el LDP-02 sérico era todavía medible más allá del día 36 después de la administración de 1,5 mg/kg (-x) o 2,5 mg/kg (-*-) por inyección intravenosa.

45

La FIGURA 7 es un gráfico que muestra la pérdida persistente de la señal de α4β7 (detectada con Act-1 mAb) después de la administración del LDP-02. alrededor del 90% de la señal de α4β7 se perdió rápidamente (MESF = 10%) después de la administración del LDP-02 y persistió después de la administración de todas las dosis de LDP-02. Entre alrededor del día 7 y el día 22, la señal de α4β7 empezó a volver a la línea base para el grupo de dosis IV de 0,15 mg/kg (-■-) y para el grupo de dosis SC de 0,15 mg/kg (-◆-). Entre el día 22 y el día 36 la señal de α4β7 empezó a volver a la línea base para el grupo de dosis (-▲-) IV de 0,5 mg/kg. En las dosis de LDP02 más altas estudiadas (1,5 mg/kg (-x) y 2,5 mg/kg (-*-), la pérdida de la señal α4β7 perduró durante más de 36 días después de las dosis IV únicas. Para el grupo de dosis de 2,5 mg/kg (-*-), la pérdida de la señal de α4β7 perduró hasta alrededor del Día 70 (datos proporcionados en la presente en el Apéndice al Estudio L297-007). MESF: fluorescencia soluble equivalente media.

50

55

La FIGURA 8 es un gráfico que muestra los niveles de LDP-02 séricos medidos (µg/mL) en pacientes con colitis ulcerosa a lo largo del tiempo después de una única administración de LDP-02. Los niveles de LDP-02 séricos medios subieron rápidamente después de la administración del LDP-02. La concentración de LDP-02 sérico cayó por debajo de 1,0 µg/mL en pacientes administrados con LDP-02 a 0,15 mg/kg por inyección intravenosa (-▲-) o subcutánea (-◆-) en los diez días después de la dosis. Sin embargo, las concentraciones de LDP-02 séricas permanecieron por encima de 1,0 µg/mL durante alrededor de 20 días después de la administración de 0,5 mg/kg por inyección intravenosa (-■-). La concentración sérica de LDP-02 permaneció por encima de 1 µg/mL durante alrededor de 60 días después de la administración de 2,0 mg/kg por inyección intravenosa (-▼-).

60

65

La FIGURA 9 es un gráfico que muestra la pérdida persistente de la señal de α4β7 (detectada con Act-1 mAb) después de la administración de LDP-02. Alrededor del 90% de la señal de α4β7 se perdió rápidamente (MESF = 10%) después de la administración de LDP-02 y la duración de la pérdida de señal fue dependiente de la dosis. Comenzando alrededor del Día 10, la señal de α4β7 comenzó a retornar a la línea de base para el grupo administrado con 0,15 mg/kg de LDP-02 por inyección IV (-■-) o SC (-◆-). Sin embargo, la señal de α4β7 comenzó a retornar a la línea de base entre el día 30 y el día 60 para el grupo administrado con 0,5 mg/kg (-Δ-) de forma intravenosa, y después del día 60 para el grupo administrado con

2,0 mg/kg (-x-) intravenosamente (datos proporcionados en la presente por el Apéndice al Estudio L297-006). MESF: fluorescencia soluble equivalente media.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5

La invención proporciona una inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para su uso en el tratamiento de un humano que tiene una enfermedad como se define en las reivindicaciones añadidas.

10

Se describe en la presente un método para administrar un anticuerpo (inmunoglobulina) a un sujeto. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo a administrar es un anticuerpo humanizado que tiene una especificidad de enlace por la integrina $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, $\alpha 4\beta 7$ mamífera (por ejemplo $\alpha 4\beta 7$ humana (*Homo sapiens*)). Preferiblemente, las inmunoglobulinas humanizadas descritas en la presente pueden enlazar con la integrina $\alpha 4\beta 7$ con una afinidad de al menos alrededor de $10^7 M^{-1}$, preferiblemente al menos alrededor de $10^8 M^{-1}$, y más preferiblemente al menos alrededor de $10^9 M^{-1}$. En una realización, la inmunoglobulina humanizada descrita en la presente incluye una región que enlaza con el antígeno de origen no humano que enlaza con la integrina $\alpha 4\beta 7$ y una región constante derivada de una región constante humana. En otro aspecto de la divulgación, la inmunoglobulina humanizada que enlaza con la integrina $\alpha 4\beta 7$ comprende una región determinante complementaria de origen no humano y una región marco variable de origen humano, y si se desea, una región constante de origen humano. Por ejemplo, la inmunoglobulina humanizada puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una región determinante complementaria derivada de un anticuerpo de origen no humano que enlaza con la integrina $\alpha 4\beta 7$ y una región marco derivada de una cadena ligera de origen humano, y la cadena pesada comprende una región determinante complementaria derivada de un anticuerpo de origen no humano que enlaza con la integrina $\alpha 4\beta 7$ y una región marco derivada de una cadena pesada de origen humano.

25

Las inmunoglobulinas de origen natural tienen una estructura de núcleo común en la que dos cadenas ligeras idénticas (alrededor de 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (alrededor de 55 ó 70 kD) forman un tetrámero. La parte amino-terminal de cada cadena se conoce como la región variable (V) y se puede distinguir de las regiones constantes conservadas (C) del resto de cada cadena. Dentro de la región variable de la cadena ligera hay una parte C-terminal conocida como la región J. Dentro de la región variable de la cadena pesada, hay una región D además de la región J. La mayoría de la variación de la secuencia de aminoácidos en las inmunoglobulinas se confina a tres localizaciones separadas en las regiones V conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes complementarias (CDRs) que están implicadas directamente en el enlace con el antígeno. Partiendo del término amino, estas regiones están designadas CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las CDRs se mantienen en su lugar por regiones marco más conservadas (FRs). Partiendo del término amino, estas regiones están designadas FR1, FR2, FR3, y FR4, respectivamente. Las localizaciones de las regiones CDR y FR y un sistema de numeración han sido definidos por Karat y otros. (Kabat, E.A. y otros., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)).

40

Las inmunoglobulinas humanas se pueden dividir en clases y subclases, dependiendo del isótopo de la cadena pesada. Las clases incluyen IgG, IgM, IgA, IgD e IGE, en las que las cadenas pesadas son del tipo gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o epsilon (ϵ), respectivamente. Las subclases incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IGA2, en las que las cadenas pesadas son del tipo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, respectivamente. Las moléculas de inmunoglobulina humanas de una clase o subclase seleccionada pueden contener una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ). Ver, por ejemplo, *Cellular and Molecular Immunology*, Wonsiewicz, M.J., Ed., Capítulo 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co, Philadelphia, PA (1991); Nisonoff, A., *Introduction to Molecular Immunology*, 2ª Ed., Capítulo 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984).

50

El término "inmunoglobulina" como se usa en la presente incluye anticuerpos completos y fragmentos biológicamente funcionales de los mismos. Dichos fragmentos biológicamente funcionales de los mismos mantienen al menos una función de enlace con el antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente (por ejemplo especificidad para la $\alpha 4\beta 7$ del anticuerpo Act-1), y preferiblemente, mantienen la capacidad de inhibir la interacción de la $\alpha 4\beta 7$ con uno o más de sus ligandos (por ejemplo, MAdCAM-1, fibronectina). En una realización particularmente preferida, los fragmentos biológicamente funcionales pueden inhibir el enlace de la $\alpha 4\beta 7$ con la adhesina de la mucosa (MAdCAM-1). Ejemplos de fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales que pueden ser administrados como se describe en la presente incluyen fragmentos capaces de enlazar con una integrina $\alpha 4\beta 7$, como anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos, Fv, Fab, Fab' y $F(ab')_2$. Dichos fragmentos pueden ser producidos por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión de la papaína o la pepsina puede generar fragmentos Fab o $F(ab')_2$, respectivamente. También se pueden usar otras proteasas con la especificidad de sustrato requerida para generar Fab, $F(ab')_2$ u otros fragmentos que enlazan con el antígeno. Los anticuerpos pueden ser también producidos de una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que uno o más codones de parada han sido introducidos corriente arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte de la cadena pesada de $F(ab')_2$ puede ser designado para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y la región bisagra de la cadena pesada.

65

El término "inmunoglobulina humanizada" como se usa en la presente se refiere a una inmunoglobulina (anticuerpo) que comprende partes de inmunoglobulinas de origen diferente, en donde al menos una parte es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender partes derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano con la especificidad requisito, como un ratón, y de secuencias de inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, inmunoglobulina quimérica), unidas juntas químicamente por técnicas convencionales (por ejemplo, sintética o preparadas como un polipéptido contiguo usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, ADN que codifica las partes de proteínas del anticuerpo quimérico puede ser expresado para producir una cadena de polipéptidos contiguos). Otro ejemplo de una inmunoglobulina humanizada es una inmunoglobulina que contiene una o más cadenas de inmunoglobulina que comprenden una CDR derivada de un anticuerpo de origen no humano y una región marco derivada de una cadena ligera y/o pesada de origen humano (por ejemplo, anticuerpos CDR-injertados con o sin cambios de marco). Los anticuerpos de cadena sencilla quiméricos o CDR-injertados también están abarcados por el término inmunoglobulina humanizada. Ver, por ejemplo, Cabilly y otros., Patente U.S. N° 4.816.567; Cabilly y otros., Patente Europea N° 0.125.023 B1; Boss y otros., Patente U.S. N° 4.816.397; Boss y otros, Patente Europea N° 0.120.694 B1, Neuberger, M.S. y otros, WO 86/01533; Neuberger, M.S. y otros, Patente Europea N° 0.194.276 B1; Winter, Patente U.S. N° 5.225.539; Winter, Patente Europea N° 0.239.400 B1; Queen y otros, Patente Europea N° 0 451 216 B1; Padlan, E.A. y otros, Patente Europea. N° 0.519.596 B1. Ver también, Ladner y otros, Patente U.S. N° 4.946.778; Huston, Patente U.S. N° 5.476.786; y Bird, R.E. y otros, Science, 242: 423-426 (1988)), referentes a anticuerpos de cadena sencilla. En realizaciones particulares, la inmunoglobulina humanizada puede incluir una cadena de inmunoglobulina (por ejemplo, cadena pesada) que tiene una región variable de origen no humano (por ejemplo, origen murino) y al menos una parte de una región constante humana (por ejemplo, C γ 1), y una cadena de inmunoglobulina (por ejemplo, cadena ligera) en donde al menos una CDR es de origen no humano (por ejemplo origen murino) y las regiones marco (FR1, FR2, FR3, FR4) y, opcionalmente, la región constante (por ejemplo, C κ , C λ) son de origen humano.

La región que enlaza con el antígeno de la inmunoglobulina humanizada (la parte no humana) puede estar derivada de una inmunoglobulina de origen no humano (referida como una inmunoglobulina donante) que tiene una especificidad de enlace para la integrina α 4 β 7. Por ejemplo, una región que enlaza con el antígeno adecuada puede estar derivada de un anticuerpo monoclonal Act-1 murino (Lazarovits, A.I. y otros, J. Immunol., 133(4): 1857-1864 (1984)). Otras fuentes incluyen anticuerpos específicos de la integrina α 4 β 7 obtenidos de fuentes no humanas, como roedores (por ejemplo, ratón, rata), conejos, cerdos, cabras o primates no humanos (por ejemplo, monos). Se pueden hacer otros anticuerpos policlonales o monoclonales, como anticuerpos que enlazan con el mismo epítipo o con un epítipo similar como el anticuerpo Act-1 (por ejemplo Kohler y otros, Nature, 256:495-497 (1975); Harlow y otros, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, NY); y Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verano '94), Ausubel y otros, Eds. (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11 (1991)).

Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos contra un inmunógeno apropiado en un mamífero adecuado (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, oveja). La preparación de un antígeno inmunizante, y la producción de un anticuerpo monoclonal se puede realizar usando cualquier técnica adecuada. Se han descrito una variedad de métodos (ver por ejemplo, Kohler y otros, Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein y otros, Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski y otros, Patente U.S. N° 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verano '94), Ausubel, F.M. y otros, Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11, (1991)). Por ejemplo, los agentes inmunizantes adecuados incluyen células que tiene α 4 β 7, fracciones de membrana que contienen α 4 β 7, fragmentos inmunogénicos de inmunógenos adecuados incluyen α 4 β 7, un péptido β 4 conjugado con un portador adecuado y similares. Las células productoras de anticuerpos (por ejemplo, un linfocito9 pueden ser aisladas de, por ejemplo, los nódulos linfáticos o el bazo de un animal inmunizado. Las células pueden ser entonces fusionadas con una célula inmortalizada adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma (por ejemplo, SP2/0, P3x63Ag8.653)), formando de este modo un hibridoma. Las células fusionadas pueden ser aisladas empleando técnicas de cultivo selectivas. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden ser seleccionadas usando un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA). Se pueden usar otros métodos adecuados de producir o aislar anticuerpos (anticuerpos humanos, anticuerpos no humanos de la especificidad requisito, incluyendo, por ejemplo, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos). Los animales transgénicos capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos (por ejemplo, XenoMouse™ (Abgenix, Fremont, CA) pueden ser producidos usando métodos adecuados (ver por ejemplo, WO 98/24893 (Abgenix), publicada el 11 de Junio de 1998; Kucherlapate, R. y Jakobovits, A., Patente U.S. N° 5.939.598; Jakobovits y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y otros, Nature, 362: 255-258 (1993)). Se han descrito métodos adicionales para la producción de animales transgénicos capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos (por ejemplo, Lonberg y otros, Patente U.S. N° 5.545.806; Surani y otros, Patente U.S. N° 5.545.807; Lonberg y otros, WO97/13852).

En una realización, la región que enlaza con el antígeno de la inmunoglobulina humanizada comprende una CDR de origen no humano. En esta realización la inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de enlace para la integrina α 4 β 7 comprende al menos una DCR de origen no humano. Por ejemplo, las CDRs pueden derivarse de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas de origen no humanos, como la inmunoglobulina humanizada que incluye sustancialmente la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3, y/o la cadena

5 ligera CDR1, CDR2 y CDR3, de una o más inmunoglobulinas de origen no humano, y la inmunoglobulina humanizada resultante tiene especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$. Preferiblemente, las tres CDRs de una cadena seleccionada son sustancialmente las mismas que las CDRs de la cadena correspondiente de un donante, y más preferiblemente, las seis CDRs de las cadenas ligeras y pesadas son sustancialmente las mismas que las CDRs de las cadenas del donante correspondiente. En una realización preferida, a una o más CDRs de origen no humano tienen las secuencias de aminoácidos de las CDRs del Act-1 Ab murino (SEQ ID NOS: 9-14).

10 La parte de la inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humanizada que es de origen humano (la parte humana) puede estar derivada de cualquier inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humana adecuada. Por ejemplo, una región constante o parte de la misma, si está presente, puede estar derivada de las cadenas ligeras κ o λ , y/o las cadenas pesadas γ (por ejemplo $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$), μ, α (por ejemplo, $\alpha 1, \alpha 2$), δ o ϵ de anticuerpos humanos, incluyendo las variantes alélicas. Se puede seleccionar una región constante particular (por ejemplo, IgG1), variante o porciones de la misma para tejer la función efectora. Por ejemplo, se puede incorporar una región constante mutada (variante) en una proteína de fusión para minimizar el enlace con los receptores Fc y/o la capacidad de fijar el complemento (ver por ejemplo, Winter y otros, GB 2.209.757 B; Morrison y otros, WO 89/07142; Morgan y otros, WO 94/29351, 22 de Diciembre de 1994). El LDP-02 contiene una región constante de cadena pesada (región constante de cadena pesada $\gamma 1$ humana) que fue modificada para reducir el enlace con los receptores Fc γ humanos. Las modificaciones del Fc del LDP-02 están en las posiciones 235 y 237 (es decir, Leu²³⁵-Ala²³⁵ y Gly²³⁷-Ala²³⁷).

20 Si están presentes, las regiones marco de origen humano (por ejemplo, de la región variable de cadena ligera) están preferiblemente derivadas de una región variable de anticuerpo humano que tiene una similitud de secuencia con la región análoga (por ejemplo, región variable de cadena ligera) del donante de la región que enlaza con el antígeno. Otras fuentes de regiones marco para partes de origen humano de una inmunoglobulina humanizada incluyen secuencias de consenso variables humanas (ver por ejemplo, Kettleborough, C.A. y otros, Protein Engineering 4:773-783 (1991); Carter y otros, WO 94/04679, publicada el 3 de Marzo de 1994)). Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable usada para obtener la parte no humana se puede comparar con las secuencias humanas como se describen en Kabat, E.A., y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health y Human Services, U.S. Government Printing Office (1991). En una realización particularmente preferida, las regiones marco de una cadena de inmunoglobulina humana están derivadas de una región variable humana que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia general, y preferiblemente al menos un 70% de identidad de secuencia general, con la región variable del anticuerpo del donante no humano (por ejemplo, anticuerpo Act-1 de ratón). Una parte humana puede estar también derivada de un anticuerpo humano que tiene al menos alrededor de un 65% de identidad de secuencia, y preferiblemente al menos alrededor de un 70% de identidad de secuencia, dentro de la parte particular (por ejemplo FR) que se está usando, cuando se compara con la parte equivalente (por ejemplo, FR) del donante no humano. La identidad de la secuencia de aminoácidos puede ser determinada usando un algoritmo de alineación de secuencias adecuado, como el sistema Lasergene (DNASTAR, Inc., madison, WI), usando los parámetros por defecto.

40 En una realización, la inmunoglobulina humanizada comprende al menos una de las regiones marco (FR) derivadas de una o más cadenas de un anticuerpo de origen humano. Así, la FR puede incluir una FR1 y/o FR2 y/o FR3 y/o FR4 derivadas de uno o más anticuerpos de origen humano. Preferiblemente, la parte humana de una cadena humanizada seleccionado incluye las FR1, FR3, FR3 y FR4 derivadas de una región variable de origen humano (por ejemplo, de una cadena de inmunoglobulina humana, de una secuencia de consenso humana).

45 Las partes de inmunoglobulina de origen humano y no humano para el uso de preparar anticuerpos humanizados pueden tener secuencias idénticas a inmunoglobulinas o partes de inmunoglobulinas de las que están derivadas o a variantes de las mismas. Dichas variantes incluyen mutantes que difieren por la adición, delección, o sustitución de uno o más residuos. Como se ha indicado anteriormente, las CDRs que son de origen no humano son sustancialmente las mismas que en el donante no humano, y preferiblemente son idénticas a las CDRs del donante no humano. Se pueden hacer cambios en la región marco, como los que sustituyen un residuo de la región marco de origen humano con un residuo de la posición correspondiente del donante. Se pueden hacer una o más mutaciones en la región marco, incluyendo delecciones, inserciones, y sustituciones de uno o más aminoácidos. Para un anticuerpo o cadena humanizado seleccionado, se pueden diseñar mutaciones de marco adecuadas. Preferiblemente, las inmunoglobulinas humanizadas pueden enlazar con la integrina $\alpha 4\beta 7$ con una afinidad similar o mejor que la del donante no humano. Las variantes pueden ser producidas por una variedad de métodos adecuados, incluyendo mutagénesis de cadenas humanas de aceptador o donante no humano.

60 Las inmunoglobulina (por ejemplo, inmunoglobulinas humanas y/o humanizadas) que tienen especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana incluyen inmunoglobulinas (incluyendo fragmentos que enlazan con el antígeno) que pueden enlazar determinantes (epítopos) de la cadena $\alpha 4$ (por ejemplo, mAb HP1/2 (Pulido, y otros, J Biol Chem 266:10241-10245 (1991), MAb 21.6 murino and MAb humanizado 21.6 (Bendig y otros, Patente U.S. N° 5.840.299)) y/o la cadena $\beta 7$ del heterodímero $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, en realizaciones particulares, la inmunoglobulina humanizada puede enlazar específica o selectivamente con un determinante del complejo $\alpha 4\beta 7$, pero no enlazar determinantes (epítopos) en la cadena $\alpha 4$ o la cadena $\beta 7$. En una realización, la inmunoglobulina humanizada puede tener especificidad de enlace para un epítipo combinacional en el heterodímeros $\alpha 4\beta 7$. Dicha inmunoglobulina

puede enlazar con la $\alpha 4\beta 7$ y no enlazar con la $\alpha 4\beta 1$, por ejemplo. Los anticuerpos que tienen especificidad de enlace para el complejo $\alpha 4\beta 7$ incluyen, el anticuerpo Act-1 murino, y un Act-1 humanizado referido como LDP-02 (ver, WO 98/06248 por LeukoSite, Inc., publicada el 19 de febrero de 1998 y la Patente U.S. Número 7.147.852.

5 En una realización preferida, la inmunoglobulina humanizada tiene al menos una función característica del anticuerpo Act-1 murino, como la función de enlace (por ejemplo, teniendo especificidad para la integrina $\alpha 4\beta 7$,
 10 teniendo la misma especificidad epitópica o similar), y/o función inhibidora (por ejemplo, la capacidad de inhibir la adhesión dependiente de la $\alpha 4\beta 7$ in vitro y/o in vivo, como la capacidad de inhibir la integrina $\alpha 4\beta 7$ que enlaza con la MAdCAM-1 in vitro y/o in vivo, o la capacidad de inhibir el enlace de una célula que tiene la integrina $\alpha 4\beta 7$ a un
 15 ligando de la misma (por ejemplo, una célula que tiene MAdCAM-1)). Así, las inmunoglobulinas humanizadas preferidas pueden tener la especificidad de enlace del anticuerpo Act-1 murino, la especificidad epitópica del anticuerpo Act-1 murino (por ejemplo, pueden competir con el Act-1 murino, un anticuerpo Act-1 quimérico, o Act-1 humanizado (por ejemplo, LDP-02) para enlazar con la $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, en una célula que tiene la integrina $\alpha 4\beta 7$)), y o función inhibidora. Una Ab humanizada particularmente preferida es la LDP-02.

20 La función de enlace de una inmunoglobulina humana o humanizada que tiene especificidad de enlace con la integrina $\alpha 4\beta 7$ se puede detectar por métodos inmunológicos estándares, por ejemplo usando ensayos que monitorizan la formación de un complejo entre la inmunoglobulina humanizada y la integrina $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, una fracción de membrana que comprende la integrina $\alpha 4\beta 7$, o una célula que tiene la integrina $\alpha 4\beta 7$, como un linfocito humano (por ejemplo, un linfocito del subconjunto $CD4^+ \alpha 4^hi \beta 1^lo$), la línea celular de los linfocitos humanos o la célula huésped recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica $\alpha 4$ y/o $\beta 7$ que expresa la integrina $\alpha 4\beta 7$.
 25 También se pueden usar ensayos de enlace y/o adhesión u otros métodos adecuados en procesos para la identificación y/o asilamiento de inmunoglobulinas (por ejemplo, inmunoglobulinas humanas y/o humanizadas) (por ejemplo de una biblioteca) con la especificidad requisito (por ejemplo, un ensayo que monitoriza la adhesión entre una célula que tiene una integrina $\alpha 4\beta 7$ y un ligando de la misma (por ejemplo, una segunda célula que expresa MAdCAM, una proteína de fusión MAdCAM inmovilizada (por ejemplo, quimera MAd-CAM-1g), u otros métodos adecuados.

30 Las partes de inmunoglobulina de origen humano y no humano para el uso de preparar inmunoglobulinas humanizadas incluyen cadenas ligeras, cadenas pesadas y partes de cadenas ligeras y pesadas. Estas partes de inmunoglobulina se pueden obtener o derivar de inmunoglobulinas (por ejemplo, por la síntesis *novo* de una parte), o se pueden expresar y producir ácidos nucleicos que codifican una inmunoglobulina o cadena de la misma que tienen la propiedad deseada (por ejemplo, enlaza con la integrina $\alpha 4\beta 7$, similitud de secuencia). Las inmunoglobulinas humanizadas que comprenden las partes deseada (por ejemplo, región que enlaza con el antígeno, CDR, FR, región
 35 constante) de origen humano y no humano se pueden producir usando ácidos nucleicos sintéticos y/o recombinantes para preparar genes (por ejemplo, ADNc) que codifican la cadena humanizada deseada. Para preparar una parte de una cadena, se pueden introducir uno o más codones de parada en la posición deseada. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que codifican regiones variables humanizadas recién diseñadas pueden ser construidos usando métodos de mutagénesis PCR para alterar las secuencias de ADN existentes (ver por ejemplo, Kamman, M., y otros Nucl. Acids Res. 17:5404 (1989)). Los cebadores PCR que codifican las nuevas CDRs se pueden hibridizar a una plantilla de ADN de una región variable previamente humanizada que se basa en la misma, o una muy similar, región variable (Sato, K. y otros, Cancer Research 53:851-856 (1993)). Si una secuencia de ADN similar no está disponible para el uso como plantilla, un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una secuencia de la región variable se puede construir de oligonucleótidos sintéticos (ver por ejemplo, Kolbinger, F., Protein Engineering 8:971-980 (1993)). También se puede incorporar una secuencia que codifica un péptido señal en el ácido nucleico (por ejemplo, en la síntesis, en el momento de la inserción en un vector). Si la secuencia del péptido señal natural no está disponible, se puede usar una secuencia del péptido señal de otro anticuerpo (ver por ejemplo, Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4:773-783 (1991)).
 40 Usando estos métodos, los métodos descritos en la presente u otros métodos adecuados, las variantes pueden ser producidas fácilmente. En una realización, las regiones variables clonadas (por ejemplo, de la LDP-02) pueden ser mutagenizadas, y se pueden seleccionar las secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, de una biblioteca de fagos; ver por ejemplo, Krebber y otros., U.S. 5.514.548; Hoogenboom y otros, WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993)).

55 Las inmunoglobulinas humanas y/o humanizadas pueden administrarse (por ejemplo a un humano) con propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico.

60 Por ejemplo, puede administrarse una cantidad efectiva de una inmunoglobulina humana que tiene especificidad de enlace par ala integrina $\alpha 4\beta 7$ a un humano para tratar una enfermedad asociada con la infiltración de leucocitos de los tejidos de la mucosa (por ejemplo enfermedad de colon inflamatoria, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa). El tratamiento incluye tratamiento terapéutico o profiláctico (por ejemplo, terapia de mantenimiento). De acuerdo con el método, la enfermedad se puede prevenir o retrasar (por ejemplo, aparición retrasada, remisión prolongada o quiescencia) o la severidad de la enfermedad se puede reducir en su totalidad o en parte.
 65

En una realización, no se administran más de alrededor de 8 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal durante un periodo de alrededor de 1 mes. En realizaciones adicionales, no se administran más de alrededor de 7 o alrededor de 6 o alrededor de 5 o alrededor de 4 o alrededor de 3 o alrededor de 2 o alrededor de 1 mg de inmunoglobulina por kg de peso corporal durante un periodo de alrededor de 1 mes. Como se usa en la presente, el término "mes" se refiere a un mes de calendario y abarca periodos de 28, 29, 30 y 31 días. Cuando se va a administrar un fragmento que enlaza con el antígeno de una inmunoglobulina humanizada, la cantidad que se administra durante el periodo de alrededor de un mes se puede ajustar de acuerdo con el tamaño del fragmento. Por ejemplo, si el fragmento que enlaza con el antígeno es de alrededor de la mitad del tamaño del anticuerpo intacto por peso (por ejemplo, medido en kDa), la cantidad administrada durante un periodo de alrededor de 1 mes puede ser de alrededor de 4 mg por kg de peso corporal o menos. La cantidad de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno administrada se puede expresar como mg/kg de peso corporal o usando cualquier otra unidad adecuada. Por ejemplo, la cantidad de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno administrado se puede expresar como moles de sitios que enlazan con el antígeno por kg de peso corporal. El número de moles de sitios que enlazan con el antígeno es dependiente del tamaño, cantidad y valencia de la inmunoglobulina o fragmento y se puede determinar fácilmente. por ejemplo, los fragmentos de IgG y F(ab')₂ de la misma son divalentes y una dosis que comprende 1 nanomol de fragmento IgG o F(ab')₂ comprende 2 nanomoles de sitios que enlazan con el antígeno. El tamaño de un anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno se puede determinar usando cualquier método adecuado (por ejemplo, filtración en gel).

El anticuerpo humanizado o el fragmento que enlaza con el antígeno se puede administrar en una única dosis o en una dosis inicial seguida por una o más dosis posteriores. Cuando se desean múltiples dosis, el intervalo entre dosis y la cantidad de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno pueden ser ajustados para conseguir el efecto terapéutico deseado pero no es más de hasta alrededor de 8 mg de inmunoglobulina o fragmento por kg de peso corporal durante un periodo de alrededor de 1 mes. Preferiblemente, cada dosis comprende independientemente de alrededor de 0,1 a alrededor de 8 mg o de alrededor de 0,1 a alrededor de 5 mg de inmunoglobulina o fragmento por kg de peso corporal. Más preferiblemente, cada dosis comprende independientemente de alrededor de 0,1 a alrededor de 2,5 mg de inmunoglobulina o fragmento por kg de peso corporal. Más preferiblemente, cada dosis comprende independientemente alrededor de 0,15, alrededor de 0,5, alrededor de 1,0, alrededor de 1,5 o alrededor de 2,0 mg de inmunoglobulina o fragmento por kg de peso corporal.

El intervalo entre dos dosis cualquiera (por ejemplo, dosis inicial y primera dosis posterior, primera dosis posterior y segunda dosis posterior) puede variar independientemente.

Por ejemplo, se puede administrar la dosis inicial y una primera dosis posterior puede ser administrada alrededor de 1 día después. Después de eso, la segunda y tercera dosis posteriores se pueden administrar en intervalos de alrededor de 1 mes. Generalmente el intervalo mínimo entre dosis es un periodo de al menos alrededor de 1 día o al menos alrededor de 7 días. En realizaciones particulares, el intervalo mínimo entre dosis es un periodo de al menos alrededor de 14 días, o al menos 21 días o al menos alrededor de 1 mes (por ejemplo, 28, 29, 30, 31 días. En realizaciones adicionales, el intervalo entre dosis puede ser de al menos alrededor de 40, alrededor de 50, alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 110 o alrededor de 120 días.

La cantidad de inmunoglobulina humanizada o fragmentos que enlazan con el antígeno de la misma administrada en cada dosis puede ser una cantidad que es suficiente para producir un efecto farmacocinético o farmacodinámico deseado. Una variedad de parámetros farmacocinéticos y farmacológicos de inmunoglobulinas humanas y/o humanizadas o fragmentos que enlazan con el antígeno de las mismas se puede medir usando métodos adecuados. Por ejemplo, los parámetros farmacocinéticos de los anticuerpos y fragmentos que enlazan con el antígeno (por ejemplo, saturación de antígeno, inhibición inducida por anticuerpos de expresión del antígeno) se pueden medir usando inmunoensayos adecuados. Por ejemplo, como se describe en la presente, la señal de $\alpha\beta 7$ (es decir, enlace de anticuerpo etiquetado a $\alpha\beta 7$) después de la administración de LDP-02 se midió por citometría de flujo. Los resultados del ensayo revelaron que la administración de LDP-02 puede resultar en la saturación de la $\alpha\beta 7$ y/o la inhibición de la expresión de la $\alpha\beta 7$ en la superficie de los linfocitos circulantes.

Por lo tanto, cada dosis a ser administrada puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir a) alrededor del 50% o mayor saturación de los sitios de enlace de la integrina $\alpha\beta 7$ en linfocitos circulantes (por ejemplo, células CD8⁺) y/o b) alrededor del 50% o más inhibición de la expresión de la integrina $\alpha\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes durante un periodo de al menos alrededor de 10 días después de la administración de la dosis. En otras realizaciones, cada dosis puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir y mantener a) alrededor del 60% o más, alrededor del 70% o más, alrededor del 80% o más o alrededor del 85% o más saturación de los sitios de enlace de la integrina $\alpha\beta 7$ en linfocitos circulantes y/o b) alrededor del 60% o más, alrededor del 70% o más, alrededor del 80% o más o alrededor del 85% o más inhibición de la expresión de la integrina $\alpha\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes durante un periodo de al menos alrededor de 10 días después de la administración de la dosis.

En otras realizaciones particulares, cada dosis puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir un grado deseado de saturación de los sitios de enlace de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes (por ejemplo células CD8+) y/o inhibir la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes al grado deseado durante un periodo de al menos alrededor de 14 días, al menos alrededor de 20 días, al menos alrededor de 25 días o al menos alrededor de un mes después de la administración de la dosis. En realizaciones adicionales, cada dosis puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir un grado deseado de saturación de los sitios de enlace de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes (por ejemplo células CD8+) y/o inhibir la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes al grado deseado durante un periodo de al menos alrededor de 40, alrededor de 50, alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 110 o alrededor de 120 días.

Los ensayos adecuados para determinar la dosis de anticuerpo requerida para conseguir una concentración sérica deseada o para saturar y/o inhibir la expresión de un antígeno objetivo se puede diseñar fácilmente. Por ejemplo, se puede usar un ensayo basado en la citometría de flujo para medir la expresión de la $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de las células aisladas de un sujeto después de la administración de una inmunoglobulina (por ejemplo, humanizada) que enlaza con la $\alpha 4\beta 7$. En una realización, se puede usar un anticuerpo murino que enlaza con la $\alpha 4\beta 7$ humana. Preferiblemente, el anticuerpo murino puede enlazar con un epítipo en la $\alpha 4\beta 7$ que es distinto del epítipo enlazado por la inmunoglobulina humanizada y el enlace del anticuerpo murino con la $\alpha 4\beta 7$ no se inhibe (por ejemplo, bloquea) por el enlace anterior de la inmunoglobulina humanizada. Los anticuerpos murinos u otros anticuerpos con estas propiedades se pueden preparar y seleccionar usando los métodos descritos en la presente u otros métodos adecuados. El nivel de la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes (por ejemplo células CD8+) aisladas de un humano se puede medir o determinar usando cada uno de los anticuerpos (es decir, inmunoglobulina a ser administrada, anticuerpo murino) por citometría de flujo u otros métodos adecuados. Entonces, el anticuerpo humano o humanizado a ser administrado se puede administrar al humano, se puede sacar sangre periférica en momentos predeterminados después de la administración, y los linfocitos pueden ser aislados (por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad) para el análisis. Los linfocitos de la sangre periférica (por ejemplo, células CD8) pueden ser teñidos con cada uno de los anticuerpos y la cantidad de $\alpha 4\beta 7$ detectada por cada anticuerpo puede ser medida o detectada por citometría de flujo u otros métodos adecuados. Una disminución en la cantidad de integrina $\alpha 4\beta 7$ medida o determinada usando la inmunoglobulina humana o humanizada es indicativa de a) ocupación de integrina persistente por la inmunoglobulina administrada (por ejemplo, saturación de antígeno) y/o b) inhibición de la expresión de la $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de los linfocitos (por ejemplo, modulación detenida de la $\alpha 4\beta 7$, derramamiento de la $\alpha 4\beta 7$). Una disminución en la cantidad de integrina $\alpha 4\beta 7$ medida o detectada usando la inmunoglobulina humana o humanizada junto con ningún cambio en la cantidad de integrina $\alpha 4\beta 7$ medida o determinada usando el anticuerpo murino es indicativa de ocupación persistente de la $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, saturación) por la inmunoglobulina humana o humanizada administrada. Una disminución en la cantidad de integrina $\alpha 4\beta 7$ medida o detectada usando la inmunoglobulina humana o humanizada junto con una disminución en la cantidad de integrina $\alpha 4\beta 7$ medida o detectada usando el anticuerpo murino es indicativa de la inhibición de la expresión de la $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de los linfocitos circulantes.

Los parámetros farmacocinéticos, como la concentración sérica del anticuerpo a lo largo del tiempo después de la administración de dicho anticuerpo pueden ser medidos usando un inmunoensayo como un ELISA o un ensayo basado en células. Por ejemplo, como se describe en la presente, la concentración sérica de una inmunoglobulina $\alpha 4\beta 7$ humanizada (LDP-02) en puntos temporales predeterminados después de una única administración del anticuerpo (LDP-02) se midió usando un ensayo basado en células. Los resultados del ensayo revelaron que la concentración sérica de la LDP-02 puede permanecer elevada (por ejemplo, en o por encima de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante un periodo de alrededor de 10 días o más después de la administración del anticuerpo humanizado. La presencia prolongada de la LDP-02 en el suero puede ser indicativa de eficacia superior como resultado de la inhibición persistente de la función de la $\alpha 4\beta 7$, por ejemplo inhibición persistente de la adhesión mediada por la $\alpha 4\beta 7$ de leucocitos con MAdCAM.

En consecuencia, cada dosis a ser administrada puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir y mantener una concentración sérica de al menos 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante un periodo de al menos alrededor de 10 días después de la administración de la dosis. En realizaciones particulares, cada dosis puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir y mantener una concentración sérica de al menos 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante un periodo de al menos alrededor de 14 días, al menos alrededor de 20 días, al menos alrededor de 25 días o al menos alrededor de un mes después de la administración de la dosis. En realizaciones adicionales, cada dosis puede comprender una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para conseguir y mantener una concentración sérica de al menos 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante un periodo de al menos alrededor de 40, alrededor de 50, alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 110 o alrededor de 120 días.

Como se discute en la presente, los fragmentos que enlazan con el antígeno de una inmunoglobulina humana o humanizada pueden ser sustancialmente más pequeños y, por lo tanto, enlazar más antígenos ($\alpha 4\beta 7$) por unidad de proteína (μg) que la inmunoglobulina intacta o nativa. En consecuencia, la concentración sérica de un fragmento que enlaza con el antígeno de una inmunoglobulina humana o humanizada que puede ser indicativa de

eficacia superior puede ser inferior a 1 µg/mL. Así, cuando se desea la administración de un fragmento que enlaza con el antígeno de una inmunoglobulina humanizada, la dosis puede comprender una cantidad de fragmento que enlaza con el antígeno que es suficiente para conseguir una concentración sérica que es proporcional a 1 µg/mL, para una inmunoglobulina intacta. Por ejemplo, si el fragmento que enlaza con el antígeno es de alrededor de la mitad de tamaño del anticuerpo intacto por peso (por ejemplo, medido en kDa), la dosis puede comprender una cantidad suficiente para conseguir y mantener una concentración sérica de alrededor de 0,5 µg/mL durante un periodo de al menos alrededor de 10 días. La concentración de suero deseada de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con los antígenos puede ser expresada como µg/mL o usando cualquier unidad adecuada. Por ejemplo, la cantidad de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno administrada puede ser expresada como moles de sitios de enlace del antígeno por volumen de suero (por ejemplo, M).

Las inmunoglobulinas humanizadas pueden ser administradas para aplicaciones de diagnóstico *in vivo* o para modular la función de la integrina α4β7 en aplicaciones terapéuticas (incluyendo profilácticas). Por ejemplo, las inmunoglobulinas humanizadas se pueden usar para detectar y/o medir el nivel de integrina α4β7 en un sujeto. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada que tiene una especificidad de enlace para la integrina α4β7 se puede administrar a un humano y complejos anticuerpo-integrina α4β7 que están formados se pueden detectar usando métodos adecuados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser etiquetado con, por ejemplo, radionucleidos (¹²⁵I, ¹¹¹In, tecnecio-99m), una etiqueta de epítipo (tag), una etiqueta de afinidad (por ejemplo, biotina, avidina), un marcador espín, un enzima, un grupo fluorescente o un grupo quimioluminiscente y se pueden usar métodos de detección adecuados. En una aplicación del método, las inmunoglobulinas humanizadas pueden ser usadas para analizar tejidos normales frente a inflamados (por ejemplo, de un humano) para la reactividad y/o expresión de la integrina α4β7 (por ejemplo, radiológicamente) o para detectar asociaciones entre EII u otras condiciones y la expresión aumentada de la α4β7 (por ejemplo, en tejidos afectados). Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden ser administradas para la valoración de la presencia de la integrina α4β7 en tejidos normales frente a inflamados, a través de la cual se puede valorar la presencia de enfermedad, progreso de la enfermedad y/o eficacia de la terapia anti-integrina α4β7 en la enfermedad inflamatoria.

Las inmunoglobulinas humanizadas (incluyendo los fragmentos que enlazan con el antígeno) se pueden administrar a un individuo para modular (por ejemplo, inhibir (reducir o evitar) la función de enlace y/o la función de infiltración del leucocito (por ejemplo, linfocito, monocito) de la integrina α4β7. Por ejemplo, las inmunoglobulinas humanizadas que inhiben el enlace de la integrina α4β7 a un ligando (es decir, uno o más ligandos) se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infiltración de leucocitos (por ejemplo, linfocitos, monocitos) de tejidos (incluyendo el reclutamiento y/o acumulación de leucocitos en tejidos), particularmente de tejidos que expresan la molécula MAdCAM. Se administra una cantidad efectiva de una inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma (es decir, una o más inmunoglobulinas o fragmentos) a un individuo (por ejemplo, un mamífero, como un humano u otro primate) para tratar la mencionada enfermedad. Por ejemplo, se pueden tratar las enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades que están asociadas con la infiltración de leucocitos del tracto gastrointestinal (incluyendo el endotelio asociado a los intestinos), otros tejidos de la mucosa, o tejidos que expresan la molécula MAdCAM-1 (por ejemplo tejidos asociados a los intestinos, como las vénulas de la lamina propia del intestino delgado y grueso, y la glándula mamaria (por ejemplo, la glándula mamaria lactante)). De manera similar, se puede tratar a un individuo que tiene una enfermedad asociada con la infiltración de leucocitos de tejidos como resultado del enlace de leucocitos con células (por ejemplo, células endoteliales) que expresan MAdCAM-1.

En una realización particularmente preferida, las enfermedades que pueden ser tratadas en consecuencia incluyen la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, enfermedad Celiaca, Esprue no tropical, enteropatía asociada con artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica, o pouchitis resultante después de proctocolectomía, y anastomosis ileoanal.

La pancreatitis y la diabetes mellitus dependiente de la insulina son otras enfermedades que se pueden tratar usando el método descrito en la presente. Se ha informado que la MAdCAM-1 es expresada por algunos vasos en el páncreas exocrino de ratones NOD (diabéticos no obesos), así como de ratones BALB/c y SJL. La expresión de MAdCAM-1 fue inducida según se informa en el endotelio en islotes inflamados del páncreas del ratón NOD, y la MAdCAM-1 fue la adhesina predominante expresada en el endotelio de islotes NOD en etapas tempranas de la insulinitis (Hanninen, A. y otros, C.Clin. Invest., 92:2509-2515 (1993)). Además, se observó la acumulación de linfocitos que expresan la α4β7 dentro de los islotes, y la MAdCAM-1 estaba implicada en el enlace de células de linfoma por la α4β7 a vasos de islotes inflamados (Hanninen, A., y otros., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)).

Ejemplos de enfermedades inflamatorias asociadas con los tejidos de la mucosa que pueden ser tratadas de acuerdo con la invención incluyen colangitis o pericolangitis (conducto biliar y tejido colindante del hígado) y enfermedad injerto contra huésped (por ejemplo, en el tracto gastrointestinal). Como se ve en la enfermedad de Crohn, la inflamación a menudo se extiende más allá de la superficie de la mucosa, por lo tanto las enfermedades inflamatorias crónicas del pulmón que resultan en fibrosis intersticial, como la neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades de colágeno, sarcoidosis, y otras condiciones idiopáticas son susceptibles de tratamiento.

El tratamiento puede ser curativo, inducir la remisión o la quiescencia o evitar la recaída o reaparición de la enfermedad activa. De acuerdo con el método, el tratamiento puede ser episódico o crónico (por ejemplo, tratamiento crónico de la enfermedad activa, para mantener la enfermedad quiescente, para inducir a la quiescencia y mantener a la quiescencia), por ejemplo.

5

En un aspecto particularmente preferido de la divulgación, una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$ se administra a un humano que tiene enfermedad intestinal crónica, como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. La inmunoglobulina puede ser administrada para tratar la enfermedad activa y/o para mantener la quiescencia (es decir, inhibir la recaída o la reaparición). En un aspecto particular de la divulgación la inmunoglobulina humanizada puede ser administrada para mantener la quiescencia de la enfermedad intestinal inflamatoria que ha sido inducida por el tratamiento con uno o más de otros agentes (por ejemplo esteroides (prednisona, prednisolona, hormona adrenocorticotrópica (ACTH)), ciclosporina A, FK506, anticuerpo que tiene especificidad de enlace con la TNF α (infliximab, CDP571), azatiopreno, 6-mercaptopurina, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o compuestos que con tiene 5-ASA (por ejemplo, sulfasalazina, olsalazina, balsalazida), antibióticos (por ejemplo, metronidazol), interleucinas (IL-10, IL-11), nicotina, heparina, talidomida, lidocaine) o cirugía (por ejemplo, resección intestinal).

10

15

La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma es administrado en una cantidad efectiva. Para la terapia, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado (incluyendo profiláctico) (como, una cantidad suficiente para reducir o evitar el enlace mediado por integrina $\alpha 4\beta 7$ con un ligando de la misma y/o la señalización, inhibiendo de este modo la adhesión e infiltración de leucocitos y/o las respuestas celulares asociadas; una cantidad suficiente para inducir la remisión o evitar la recaída o la reaparición de la enfermedad. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma puede ser administrado en una dosis inicial seguida por una o más dosis posteriores como se describe en la presente. La cantidad de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno administrada en una dosis particular así como el intervalo entre dosis puede depender de las características del individuo, como la salud general, edad, sexo, peso corporal, y tolerancia a los fármacos así como el tipo y severidad de la enfermedad. La persona experta será capaz de determinar las dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores.

20

25

De acuerdo con el método descrito en la presente, la inmunoglobulina humanizada puede ser administrada a un individuo (por ejemplo un humano) sola o en conjunción con otro agente (es decir, uno o más agentes adicionales). Una inmunoglobulina humanizada puede ser administrada antes, junto con o posteriormente a la administración del agente adicional. En un aspecto de la divulgación, se administra más de una inmunoglobulina humanizada que inhibe el enlace de la integrina $\alpha 4\beta 7$ con sus ligandos. En otra realización, se administra un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado), como un anticuerpo anti-MAdCAM-1, anti-VCAM-1, o anti-ICAM-1, que inhibe el enlace de leucocitos con un ligando endotelial además de una inmunoglobulina humanizada que enlaza con la integrina $\alpha 4\beta 7$. En otro aspecto de la divulgación, se puede administrar un ingrediente farmacológicamente activo adicional (por ejemplo, un compuesto antiinflamatorio, como el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o compuestos que contienen 5-ASA (por ejemplo, sulfasalazina, olsalazina, balsalazida), otro compuesto antiinflamatorio no esteroideo, o un compuesto antiinflamatorio esteroideo (por ejemplo, prednisona, prednisolona, hormona adrenocorticotrópica (ACTH)), agentes inmunosupresores (azatiopreno, 6-mercaptopurina, ciclosporina A, FK506), inmunomoduladores (por ejemplo, anticuerpos que tiene especificidad de enlace para la TNF α (infliximab, CDP571), talidomida, interleucinas (por ejemplo, IL-10 humana recombinante, IL-11 humana recombinante)) antibióticos (por ejemplo, motronidazol), nicotina, heparina, lidocaina) en conjunción con una inmunoglobulina humanizada de la presente invención.

30

35

40

45

Son posibles una variedad de vías de administración, incluyendo, pro no limitadas necesariamente a, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal, subcutánea), oral (por ejemplo, dietética), tópica, inhalación, (por ejemplo, intrabronquial, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales), o rectal, dependiendo de la enfermedad o condición a ser tratada. Se prefiere la administración parenteral, particularmente la inyección intravenosas y la inyección subcutánea).

50

La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma se puede administrar al individuo como parte de una composición farmacéutica o fisiológica para el tratamiento de una enfermedad asociada con la infiltración de leucocitos de los tejidos de la mucosa (por ejemplo enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Chron). Dicha composición puede comprender una inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno que tiene una especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$ como se describe en la presente, y un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas o fisiológicas para la co-terapia pueden comprende una inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno que tiene especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$ y uno o más agentes terapéuticos adicionales. Una inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno que tiene especificidad de enlace para la función de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y un agente terapéutico adicional pueden ser componentes de composiciones separadas que se pueden mezclar juntas antes de la administración o ser administrados de forma separada. La formulación variará de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula). Los portadores adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interactúan con la inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno y/o agentes terapéuticos adicionales. Se pueden emplear técnicas de formulación farmacéuticas

55

60

65

estándares, como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los portadores adecuados para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene alrededor de un 0,9% de alcohol bencílico), solución salina regulada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Los métodos para encapsular composiciones (como en un recubrimiento de gelatina dura o ciclodextrano) son conocidos en la técnica (Baker, y otros "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986). Para la inhalación, el agente se puede solubilizar y cargar en un dispensador adecuado para la administración (por ejemplo, un atomizador, nebulizador o dispensador de aerosol presurizado).

La presente invención se ilustrará ahora por los siguientes Ejemplos, que no se pretende que sean limitativos de ninguna manera.

EJEMPLOS

Introducción

La LDP-02 es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que enlaza con al integrina $\alpha 4\beta 7$, una glicoproteína de la superficie celular presente en la superficie de la mayoría de los linfocitos T y B, la $\alpha 4\beta 7$ media el tráfico de linfocitos a la mucosa gastrointestinal y el tejido linfoide asociado a los intestinos a través de la interacción de adhesión con el receptor de guiado MAdCAM-1. Bloqueando las interacciones $\alpha 4\beta 7$ -MAd-CAM-1, la LDP-02 puede inhibir el reclutamiento de leucocitos de la vasculatura a la mucosa gastrointestinal, teniendo así un efecto beneficioso en la actividad inflamatoria en pacientes afligidos con enfermedad intestinal inflamatoria (EII) como colitis ulcerosa y Enfermedad de Crohn.

Esta sección presenta información de las dos pruebas clínicas de LDP-02 que se han completado. Estas pruebas incluyen un estudio de Fase I completado realizado en sujetos sanos (Estudio L297-007) y una prueba de Fase Ib/Ila completada en pacientes con colitis ulcerosa (UC) (Estudio L-297-006). La tabla 1 describe cada uno de estos estudios.

Tabla 1

Nº de Estudio. # Sitios País	Estado del Estudio	Diseño del Estudio/ Población	Régimen de dosificación, Dosis, Vía	Número d Sujetos que participan
L297-007 1 UK	Completado	Estudio de única dosis ascendente, placebo-controlado, doble ciego, aleatorizado, de Fase I, Sujetos Masculinos Sanos de 18-50años de edad	Día 1 (dosis única) 0.15 mg/kg IV 0.15 mg/kg SC 0.5 mg/kg IV 1.5 mg/kg IV 2.5 mg/kg IV	Total= 19 LDP-02= 14 Placebo= 5
L297-006 5 Canadá	Completado	Estudio multicentro, dosis única creciente, placebo-controlada, doble ciego, aleatorizada, Fase Ib/Ila Pacientes con colitis ulcerosa moderadamente severa. Antes el uso de esteroides fue limitado (≤ 20 mg/día). Se permitió el uso de 5-ASAs	Día 1 (única dosis) 0.15 mg/kg SC 0.15 mg/kg IV 0.5 mg/kg IV 2.0 mg/kg IV Placebo IV	Total= 29 LDP-02= 21 Placebo= 8

Ejemplo 1: Estudio L297-007

El estudio L-297-007 titulado, "Un estudio de Dosis Creciente, Doble Ciego, Placebo-Controlado Investigando la Tolerabilidad, Farmacodinámicas y Farmacocinéticas de la LDP02 Dada por las Vías Subcutánea e

Intravenosa en Voluntarios Masculinos Sanos" se ha completado con los resultados finales presentados en esta sección.

Diseño del Estudio

El Estudio L297-007 fue un estudio de dosis única ascendente, placebo-controlado, doble ciego, aleatorizado en voluntarios masculinos sanos. Los voluntarios masculinos sanos de 18 a 50 años de edad que cumplieron todos los criterios de inclusión/exclusión fueron inscritos en el estudio secuencialmente por el grupo de estudio y, dentro de cada grupo de estudio, fueron asignados aleatoriamente para recibir LDP-02 o placebo (es decir, regulador de citrato sódico isotónico). Para minimizar el riesgo a los sujetos, la seguridad y la tolerabilidad fueron revisadas a cada nivel de dosis antes de aumentar al siguiente nivel de dosis. Los grupos de tratamiento y números de sujetos planeados para el estudio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Estudio L-297-007: Grupos de Estudio

Grupo	Vía de Administración *	LDP-02 #		Placebo # sujetos
		Dosis de los sujetos		
1	IV SC	3	0.15 mg/kg	1
		3	0.15 mg/kg	1
2	IV	3	0.5mg/kg)	1
3	IV	3	1.5mg/kg)	
4	IV	3	2.5 mg/kg)	1

*SC= administración subcutánea; IV = administración intravenosa

En el Día 1 del estudio, se administró la LDP-02 o el placebo o por SC en el muslo (grupo 1 de dosificación SC sólo) o por infusión IV a tasa constante de 30 minutos (Grupos 1-4). Las valoraciones de seguridad incluyeron el registro de eventos adversos, exámenes físicos, signos vitales, laboratorios clínicos (es decir, hematología, químicas de sangre, y análisis de orina), niveles de citoquina en sangre, y electrocardiogramas de 12 derivaciones (ECGs). Además, como esta fue a la primera prueba clínica de la LDP-02, se llevó a cabo una monitorización cardiaca constante antes de la dosis hasta 4 horas después de la dosis. las muestras de sangre se obtuvieron para evaluar la respuesta anti-anticuerpos a la LDP-02, los niveles de citoquinas, la concentración de LDP-02 sérica (farmacocinéticas), y la saturación y ocupación del sitio de enlace de los receptores de $\alpha 4\beta 7$ y subconjuntos de linfocitos (farmacodinámicas). Las valoraciones del estudio fueron realizadas en momentos especificados a través de 36 días después del tratamiento. Siguiendo a los resultados de los análisis farmacocinéticos y farmacodinámicos (inmunológicos) del Día 36, se corrigió el protocolo para permitir extracciones adicionales de sangre para sujetos que recibieron la LDP-02. Estas extracciones de sangre se usaron para seguir los niveles séricos de LDP-02 hasta que se volvieron no cuantificables (es decir, por debajo del límite de cuantificación [BLQ] y para asegurar que la saturación de $\alpha 4\beta 7$ y poblaciones de la memoria celular habían retornado los niveles de la línea de base (pre-dosis). Esta corrección fue particularmente importante en los grupos de dosis más altas donde las características de las cinéticas de fase terminal no estaban bien establecidas en el Día 36.

Resultados del Estudio

Farmacocinéticas

El ensayo de la LDP-02 en suero se realizó usando un ensayo basado en células validado. Los estándares y muestras fueron incubados con una línea celular objetivo (HUT-78) que expresa el antígeno $\alpha 4\beta 7$. después del lavado, se añadió un IgG1 antihumano policlonal fluorescentemente etiquetado. La intensidad de la fluorescencia se midió por citometría de flujo y se comparó con la intensidad de la fluorescencia de los estándares de LDP-02. La concentración de suero efectiva de la LDP-02 fue entonces definida por comparación de la muestra con una curva estándar generada con concentraciones conocidas de LDP-02.

Las muestras de sangre para la determinación de la concentración sérica de LDP-02 fueron recogidas antes de la dosis, 1, 1,5, 3, 8, 12 y 24 horas después de la dosificación, y en los Días 3, 5, 7, 8, 15, 22 y 36. Cuando se conoció que la LDP-02 era todavía detectable en el Día 36, las extracciones de sangre para los sujetos que recibieron la LDP-02 continuó hasta que los niveles hubieron caído por debajo de los límites de cuantificación del ensayo. Trece de los 14 sujetos que recibieron la LDP02 volvieron para extracciones de sangre de seguimiento hasta un máximo de 226 días después de la dosis.

Las concentraciones de LDP-02 a lo largo del tiempo por paciente individual y parámetros farmacocinéticos medios por grupo de dosis de LDP-02 se presentan en el Apéndice al Estudio L297-007. Las concentraciones

séricas de LDP-02 medias a lo largo del tiempo están representadas hasta la última extracción de sangre para todos los grupos de tratamiento en la FIGURA 6.

Tabla 3 Estudio L297-007: Parámetros Farmacocinéticos Medios de la LDP-02 en sujetos Sanos¹

Parámetro Farmacocinético	I Dosis y Vía de Administración de la LDP-02 (número de sujetos)				
	0.15 mg/kg SC (n=3)	0.15 mg/kg IV (n=3)	0.5 mg/kg IV (n=3)	1.5 mg/kg IV (n=3)	2.5 mg/kg IV (n=2)
C_{max} (µg/mL)	1.112 (0.519)	7.648 (3.201)	15.760 (7.476)	118.813 (14.544)	101.749 (5.117)
t_{max} (días) (mediana & intervalo)	6.01 (4.01 - 6.01)	0.13 (0.04 - 0.33)	0.5 (0.06-0.5)	0.13 (0.06- 0.33)	0.05 (0.04-0.06)
$T_{1/2z}$ (días)	4.33 (2.23)	4.39 (1.51)	4.02 (0.71)	14.9 (10.3)	17.1 (8.91)
AUC_1 (µg·día/mL)	10.4 (4.40)	19.5 (5.00)	83.6 (18.3)	660 (229)	1651 (229)
λ_z (1/día)	0.1852 (0.0735)	0.1731 (0.0673)	0.1763 (0.0344)	0.0994 (0.1145)	0.0469 (0.0244)
AUC (µg·día/mL)	11.4 (5.80)	20.3 (5.88)	85.1 (18.2)	755 (308)	1747 (95.8)
AUC % Extrapolado	5.9 (7.3)	3.4 (3.2)	1.8 (1.4)	9.5 (16.1)	5.7 (8.0)
CL* (mLdía/kg)	15.3 (6.26)	7.75 (1.93)	6.06 (1.32)	2.31 (1.19)	1.43 (0.08)
V_z * (mL/g)	82.5 (6.88)	46.6 (10.1)	34.3 (2.84)	54.0 (51.4)	35.9 (20.3)

¹Todos los valores son medios +/- SD a menos que se indique lo contrario. El SD aparece entre paréntesis.
*Los plazos de depuración y volumen para los grupos de dosis SC son la depuración aparente (CL/F) y el volumen aparente(V2/F).

Los valores se obtuvieron para los parámetros farmacocinéticos de única dosis IV medios para los 4 grupos de dosis (C_{max} , $t_{1/2z}$ y AUC). Las muestras de seguimientos (es decir, las tomadas más allá del Día 36), donde la atención se centró en la seguridad, permitieron alguna caracterización adicional de los perfiles de concentración-tiempo. La diferencia en los valores de $t_{1/2z}$ entre los 2 grupos de dosis más baja (0,15 y 0,5 mg/kg) y los grupos de dosis más alta (1,5 y 2,5 mg/kg) de alrededor de 10 días se pueden explicar en que la fase terminal "verdadera" para los grupos de dosis más alta no se ha caracterizado. Las farmacocinéticas no compartimentales de las dosis más bajas de la LDP-02 (0,15 y 0,5 mg/kg) fueron bien caracterizadas y las farmacocinéticas no lineales fueron evidentes a medida que la dosis se aumentó hasta 2,5 mg/kg.

Valoración del Efecto Farmacodinámico de la LDP-02

Se uso un análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) para medir la presencia de sitios $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos de la sangre periférica antes y después de la administración de LDP-02. Para detectar las $\alpha 4\beta 7$ que eran reconocidas por el anticuerpo, se añadió a las muestras de la sangre del paciente ACT-1 etiquetada con biotina, el homólogo murino de la LDP-02 y se detectaron usando PR-estreptavidina. La fluorescencia soluble equivalente media estandarizada (MESF) es proporcional al número de sitios $\alpha 4\beta 7$ detectables.

El enlace de la $\alpha 4\beta 7$ sérica a lo largo del tiempo (valores MESF y porcentaje de la línea de base en cada punto temporal post-dosis) son presentados por sujetos individuales y por grupos de tratamiento en el Apéndice al Estudio L297-007.

Como se midió por el análisis FACS, la saturación media de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos a lo largo del tiempo (es decir, al Día 36) para cada tratamiento se presenta en la FIGURA 7. Como se ve en la Figura 7, no hubo

5 detección de sitios de enlace $\alpha\beta 7$ libres en los linfocitos durante al menos dos semanas después de la administración de todas las dosis de LDP-02. entre alrededor del día 7 y el día 2, la señal de $\alpha\beta 7$ empezó a retornar a la línea de base para el grupo de dosis 0,15 mg/kg IV y para el grupo de dosis 0,15 mg/kg SC. Entre el día 22 y el día 36, la señal de $\alpha\beta 7$ empezó a retornar a la línea de base para el grupo de dosis 0,5 mg/kg IV. En las dosis más altas de LDP-02 estudiadas (1,5, y 2,5 mg/kg) la pérdida de la señal de $\alpha\beta 7$ persistió durante más de 36 días después de las dosis IV sencillas. Para el grupo de dosis 2,5 mg/kg, la saturación del enlace de la $\alpha\beta 7$ continuó hasta el Día 70 (ver, datos en Apéndice al Estudio L297-007).

10 El muestro de sangre de seguimiento hasta alrededor del Día de Estudio 200 se hizo para confirmar que los sitios de enlace de $\alpha\beta 7$ libres en los linfocitos habían retornado a los niveles de la línea de base (pre-dosis). La reaparición inicial de los sitios de $\alpha\beta 7$ libres pareció tener lugar cuando las concentraciones de sangre de LDP-02 se volvieron no detectables.

15 Conclusiones

La administración de la LDP-02 en las dosis IV de 0,15, 0,50, 1,50 y 2,5 mg/kg y una dosis SC de 0,15 mg/kg a sujetos masculinos sanos fue bien tolerada.

20 Después de la administración de todas las dosis de LDP-02 no hubo detección de sitios de enlace de $\alpha\beta 7$ libres en linfocitos durante aproximadamente dos semanas después de la dosis. La saturación de los sitios de enlace de $\alpha\beta 7$ continuó hasta aproximadamente 2 semanas después de la dosificación para el grupo 0,15 mg/kg IV y hasta aproximadamente 3 semanas después de la dosis para los grupos 0,15 mg/kg Sc y 0,5 mg/kg IV. La duración del efecto persistió durante un mes o más con la dosis 1,5 mg/kg IV y continuó hasta aproximadamente el Día 70 con el 2,5 mg/kg LDP-02 IV. Las muestras de seguimiento obtenidas después del Día 36 demostraron que la expresión de los sitios de enlace de $\alpha\beta 7$ libres habían retornado a la línea de base (niveles pre-dosis). No surgieron anticuerpos anti-idiotipo contra la LDP-02 indicando que no inició una respuesta inmunogénica humoral. Las farmacocinéticas no-compartimentales de las dosis más bajas de LDP-02 (0,15 y 0,5 mg/kg) se volvieron evidentes a medida que la dosis se aumentó hasta 2,5 mg/kg.

30 APENDICE AL ESTUDIO L297-007

Concentración Sérica de LDP-02 a lo Largo del Tiempo por sujeto y por Grupo de Tratamiento. Los Datos de los pacientes individuales se presentan en las Tablas 4-9.

Tabla 4 0,15 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto #2		Sujeto # 3			Sujeto # 4			Media $\mu\text{g/mL}$ (n=3)	
Tiempo (hr)	Tiempo (día)	$\mu\text{g/mL}$	Tiempo (hr)	Tiempo (día)	$\mu\text{g/mL}$	Tiempo (hr)	Tiempo (día)		$\mu\text{g/mL}$
Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	0.01
1.0	0.042	5.24	1.0	0.042	7.98	1.0	0.042	2.48	5.24
1.5	0.063	5.33	1.5	0.063	6.21	1.5	0.063	3.42	4.99
3.0	0.125	5.47	3.0	0.125	4.66	3.0	0.125	4.29	4.81
8.0	0.333	10.67	8.0	0.333	5.10	8.0	0.333	3.26	6.34
12.0	0.500	4.49	12.0	0.500	4.50	12.0	0.500	2.42	3.80
24.0	1.000	3.23	24.0	1.000	3.63	24.0	1.000	2.24	3.03
72.0	3.000	1.84	72.0	3.000	2.94	72.0	3.000	3.05	2.61
120.0	5.000	1.21	120.0	5.000	1.84	120.0	5.000	1.16	1.40
168.0	7.000	0.94	168.0	7.000	1.29	168.0	7.000	0.74	0.99
192.0	8.000	0.63	192.0	8.000	1.13	192.0	8.000	0.70	0.82
360.0	15.000	0.04	360.0	15.000	0.53	360.0	15.000	0.26	0.28
528.0	22.000	0.02	528.0	22.000	0.21	528.0	22.000	0.09	0.10
864.0	36.000	0.02	864.0	36.000	0.01	864.0	36.000	0.01	0.01
			3912.0	163.000	0.01	3912.0	163.000	0.01	0.01
			4920.0	205.000	0.01	4752.0	198.000	0.01	0.01

ES 2 609 689 T3

5

Tabla 5 0,15 mg/kg LDP-02 SC

10

15

20

25

30

Subject # 5			Subject # 6			Subject # 8			Media µg/mL (n=3)
Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	
Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	0.01
1.0	0.042	0.01	1.0	0.042	0.01	1.0	0.042	0.01	0.01
1.5	0.063	0.01	1.5	0.063	0.01	1.5	0.063	0.01	0.01
3.0	0.125	0.01	3.0	0.125	0.01	3.0	0.125	0.01	0.01
8.0	0.333	0.06	8.0	0.333	0.09	8.0	0.333	0.09	0.08
12.0	0.500	0.11	12.0	0.500	0.12	12.0	0.500	0.10	0.11
24.0	1.000	0.12	24.0	1.000	0.30	24.0	1.000	0.55	0.32
72.0	3.000	0.23	72.0	3.000	0.81	72.0	3.000	0.91	0.65
120.0	5.000	0.54	120.0	5.000	0.93	120.0	5.000	1.13	0.86
168.0	7.000	0.71	168.0	7.000	0.88	168.0	7.000	1.70	1.10
192.0	8.000	0.62	192.0	8.000	0.81	192.0	8.000	1.05	0.83
360.0	15.000	0.28	360.0	15.000	0.08	360.0	15.000	0.53	0.30
528.0	22.000	0.02	528.0	22.000	0.03	528.0	22.000	0.26	0.11
864.0	36.000	0.04	864.0	36.000	0.04	864.0	36.000	0.01	0.03
3912.0	163.000	0.01	3912.0	163.000	0.01	3912.0	163.000	0.01	0.01
5088.0	212.000	0.01	5088.0	212.000	0.01	5088.0	212.000	0.01	0.01

35

Tabla 6 0,5 mg/kg LDP-02 IV

40

45

50

55

60

Sujeto # 9			Sujeto # 10			Sujeto # 12			Media µg/mL (n=3)
Tiempo (hr)	Tiempo (day)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (day)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (day)	µg/mL	
Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	0.01
1.0	0.042	9.06	1.0	0.042	10.74	1.0	0.042	10.93	10.24
1.5	0.063	24.39	1.5	0.063	6.62	1.5	0.063	8.17	13.06
3.0	0.125	16.37	3.0	0.125	10.14	3.0	0.125	9.94	12.15
8.0	0.333	15.04	8.0	0.333	9.30	8.0	0.333	9.35	11.23
12.0	0.500	10.64	12.0	0.500	11.70	12.0	0.500	11.19	11.18
24.0	1.000	9.17	24.0	1.000	9.00	24.0	1.000	8.52	8.90
72.0	3.000	5.34	72.0	3.000	7.55	72.0	3.000	7.60	6.83
120.0	5.000	10.25	120.0	5.000	2.43	120.0	5.000	8.58	7.09
168.0	7.000	5.74	168.0	7.000	6.59	168.0	7.000	4.93	5.75
192.0	8.000	3.79	192.0	8.000	2.48	192.0	8.000	4.32	3.53
360.0	15.000	1.70	360.0	15.000	2.21	360.0	15.000	2.49	2.13
528.0	22.000	0.41	528.0	22.000	0.12	528.0	22.000	1.65	0.73
864.0	36.000	0.01	864.0	36.000	0.01	864.0	36.000	0.11	0.04
3576.0	149.00	0.01	3912.0	163.000	0.01	3576.0	149.000	0.01	0.01
			5424.0	226.000	0.01				0.01

65

5

Tabla 7 1,5 mg/kg LDP-020 IV

10

15

20

25

30

Sujeto # 13			Sujeto #15			Sujeto # 16			Media µg/mL (n=3)
Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	
Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	0.01
1.0	0.042	87.62	1.0	0.042	58.06	1.0	0.042	103.10	82.93
1.5	0.063	63.67	1.5	0.063	134.97	1.5	0.063	86.05	94.90
3.0	0.125	92.78	3.0	0.125	63.78	3.0	0.125	106.78	87.78
8.0	0.333	114.69	8.0	0.333	64.12	8.0	0.333	84.42	87.74
12.0	0.500	73.02	12.0	0.500	43.76	12.0	0.500	44.09	53.62
24.0	1.000	99.61	24.0	1.000	77.77	24.0	1.000	71.80	83.06
72.0	3.000	102.88	72.0	3.000	38.82	72.0	3.000	67.61	69.77
120.0	5.000	42.46	120.0	5.000	25.26	120.0	5.000	23.95	30.56
168.0	7.000	26.10	168.0	7.000	18.42	168.0	7.000	23.85	22.79
192.0	8.000	46.47	192.0	8.000	11.90	192.0	8.000	19.85	26.07
360.0	15.000	19.83	360.0	15.000	5.80	360.0	15.000	19.54	15.06
528.0	22.000	10.93	528.0	22.000	0.11	528.0	22.000	13.89	8.31
864.0	36.000	0.19	864.0	36.000	0.69	864.0	36.000	9.49	3.46
1968.0	82.000	0.48	1968.0	163.000	0.30				0.39
3264.0	136.000	0.01	3264.0	212.000	0.03				0.02
4272.0	178.000	0.01	4824.0	201.000	0.01	3960.0	165.000	0.01	0.01

35

Tabla 8 2,5 mg/kg LDP-02 IV

40

45

50

55

60

65

Sujeto # 18			Sujeto # 19			Media µg/mL (n=2)
Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	Tiempo (hr)	Tiempo (día)	µg/mL	
Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	Pre-Dosis	Pre-Dosis	0.01	0.01
1.0	0.042	105.37	1.0	0.042	84.06	94.72
1.5	0.063	71.27	1.5	0.063	98.13	84.70
3.0	0.125	73.49	3.0	0.125	81.59	77.54
8.0	0.333	84.00	8.0	0.333	80.17	82.09
12.0	0.500	103.81	12.0	0.500	85.53	94.67
24.0	1.000	68.79	24.0	1.000	85.52	77.15
72.0	3.000	63.30	72.0	3.000	69.49	66.40
120.0	5.000	53.33	120.0	5.000	59.11	56.22
168.0	7.000	50.72	168.0	7.000	54.63	52.67
192.0	8.000	43.47	192.0	8.000	67.32	55.40
360.0	15.000	22.82	360.0	15.000	23.85	23.34
528.0	22.000	22.45	528.0	22.000	21.92	22.19
864.0	36.000	17.42	864.0	36.000	20.63	19.03
1680.0	70.000	5.48	1656.0	69.000	4.63	5.06
3312.0	138.000	0.01	2976.0	124.000	0.08	0.04
3984.0	166.000	0.01	3648.0	152.000	0.01	0.01
			4536.0	189.000	0.01	0.01

5

Tabla 9 grupo placebo

10

15

20

25

30

Tiempo (hr)	Tiempo (día)	Sujeto # 1	Sujeto # 7	Sujeto # 11	Sujeto # 14	Sujeto # 17
Pre-Dosis	Pre-Dosis	lts	lts	lts	lts	lts
1.0	0.042	lts	lts	lts	lts	lts
1.5	0.063	lts	lts	lts	lts	lts
3.0	0.125	lts	lts	lts	lts	lts
8.0	0.333	lts	lts	lts	lts	lts
12.0	0.500	lts	lts	lts	lts	lts
24.0	1.000	lts	lts	lts	lts	lts
72.0	3.000	lts	lts	lts	lts	lts
120.0	5.000	lts	lts	lts	lts	lts
168.0	7.000	lts	lts	lts	lts	lts
192.0	8.000	lts	lts	lts	lts	lts
360.0	15.000	lts	lts	lts	lts	lts
528.0	22.000	lts	lts	lts	lts	lts
864.0	36.000	lts	lts	lts	lts	lts
lts = por debajo del límite de detección						

35

Estudio L-297-007: Los Parámetros Farmacocinéticos Medios por Datos de Grupo de Tratamiento de pacientes individuales se presentan en las Tablas 10-14.

40

45

50

55

60

65

Tabla 10 0.15 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto	C _{max} (µg/ml)	t _{max} (días)	AUC _t (µg·día/ml)	λ _z (1/día)	t _{1/2z} (días)	AUC (µg·día/ml)	AUC _{ext} (%)	V _z (ml/kg)	CL (ml/día/kg)
2	10.667	0.33	16.4	0.2486	2.79	16.5	0.3	36.7	9.11
3	7.984	0.04	25.3	0.1196	5.79	27.1	6.7	46.3	5.53
4	4.292	0.13	16.9	0.1510	4.59	17.5	3.3	56.9	8.60
Media	7.648	0.13*	19.5	0.1731	4.39	20.3	3.4	46.6	7.75
SD	3.201		5.00	0.0673	1.51	5.88	3.2	10.1	1.93

* Valor mediano

C_{max} = concentración máxima

t_{max} = tiempo para la máxima concentración

λ_z = una medida de eliminación

t_{1/2z} = vida media terminal

AUC_t = AUC_{an} = área por debajo de la curva usando todos los puntos temporales

AUC = AUC_{ext} = área por debajo de la curva extrapolada

AUC ext (%) = % de área por debajo del acurva atribuido a la extrapolación

V_z = volumen aparente de distribución

CL = Depuración

Tabla 11 0.15 mg/kg LDP-02 SC

Sujeto	C _{max} (µg/ml)	t _{max} (días)	AUC _t (µg·día/ml)	λ _z (1/día)	t _{1/2z} (días)	AUC (µg·día/ml)	AUC _{ext} (%)	V _z (ml/kg)	CL (ml/día/kg)
5	0.711	6.01	7.18	0.2298	3.02	7.32	2.0	89.1	20.5
6	0.927	4.01	8.71	0.2253	3.08	8.83	1.4	75.4	17.0
8	1.699	6.01	15.4	0.1003	6.91	18.0	14.3	82.9	8.32
Media	1.112	6.01*	10.4	0.1852	4.33	11.4	5.9	82.5	15.3
SD	0.519		4.40	0.0735	2.23	5.80	7.3	6.88	6.26

* Valor de la mediana

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 12 0.5 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto	C _{max} (µg/ml)	t _{max} (días)	AUC _t (µg·día/ml)	λ _z (1/día)	t _{1/2z} (días)	AUC (µg·día/ml)	AUC _{ext} (%)	V _z (ml/kg)	CL (ml/día/kg)
9	24.388	0.06	82.2	0.1586	4.37	85.1	3.4	37.0	5.87
10	11.699	0.50	66.1	0.2159	3.21	67.0	1.3	34.6	7.47
12	11.194	0.50	102.5	0.1543	4.49	103	0.8	31.4	4.84
Media	15.760	0.50*	83.6	0.1763	4.02	85.1	1.8	34.3	6.06
SD	7.476		18.3	0.0344	0.71	18.2	1.4	2.84	1.32
*) Valor de la mediana									

Tabla 13 1.5 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto	C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	t _{max} días	AUC _t ($\mu\text{g}\cdot\text{día/ml}$)	λ_z (1/día)	t _{1/2z} (días)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{día/ml}$)	AUC _{ext} (%)	v _z (ml/kg)	CL (ml/día/kg)
13	114.686	0.33	854	0.2316	2.99	855	0.1	7.58	1.75
15	134.975	0.06	408	0.0336	20.6	409	0.2	109	3.67
16	106.779	0.13	719	0.0331	20.9	1000	28.1	45.3	1.50
Media	118.813	0.13*	660	0.0994	14.9	755	9.5	54.0	2.31
SD	14.544		229	0.1145	10.3	308	16.1	51.4	1.19

* Valor de la mediana

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 14 2.5 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto	C _{max} (μg/ml)	t _{max} (días)	AUC _t (μg·día/ml)	λ _z (1/día)	t _{1/2z} (días)	AUC (μg·día/ml)	AUC _{ext} (%)	V _z (ml/kg)	CL (ml/día/kg)
18	105.367	0.04	1489	0.0296	23.4	1680	11.3	50.2	1.49
19	98.131	0.06	1814	0.0642	10.8	1815	0.1	21.5	1.38
Media	101.749	10.05*	1651	0.0469	17.1	1747	5.7	35.9	1.43
SD	5.117		229	0.0244	8.91	95.8	8.0	20.3	0.08
* Valor de la mediana									

ES 2 609 689 T3

L297-007: Enlace de α 4 λ 7 Sérico a lo Largo del Tiempo por Sujeto por Grupo de tratamiento. Los datos de pacientes individuales se presentan en las Tablas 15-20. Para cada sujeto se presenta el tiempo de muestreo de sangre, MESF de la muestra y % de MESF de la línea de base (pre-dosis).

5

Tabla 15 0,15 mg/kg LDP-02 IV

10

15

20

25

Sujeto # 2			Sujeto # 3			Sujeto # 4			Media	
Pre-Dosis	5689	100%	Pre-Dosis	5424	100%	Pre-Dosis	4177	100%	5097	100%
3 hr	605	11%	3 hr	591	11%	3 hr	588	14%	595	12%
24 hrs	589	10%	24 hrs	600	11%	24 hrs	631	15%	607	12%
Día 3	501	9%	Día 3	496	9%	Día 3	548	13%	515	10%
Día 7	474	8%	Día 7	473	9%	Día 7	512	12%	487	10%
Día 15	1819	32%	Día 15	578	11%	Día 15	599	14%	999	20%
Día 22	2426	43%	Día 22	558	10%	Día 22	609	15%	1198	23%
36	3028		Día 36	3570	66%	Día 36	3469	83%	3356	66%
			Día 163	6934	128%	Día 163	6837	164%	6885	135%
			Día 205	4675	86%	Día 205	6755	162%	5715	112%

Tabla 16 0.15 mg/kg LDP-02 SC

30

35

40

45

Sujeto # 5			Sujeto # 6			Sujeto # 8			Media	
Pre-Dosis	6043	00%	Pre-Dosis	6779	100%	Pre-Dosis	5857	100%	6226	100%
3 hr	1797	30%	3 hr	4727	70%	3 hr	1514	26%	2679	43%
24 hrs	637	11%	24 hrs	588	9%	24 hrs	616	11%	614	10%
Día 3	529	9%	Día 3	520	8%	Día 3	527	9%	525	8%
Día 7	486	8%	Día 7	474	7%	Día 7	485	8%	482	8%
Día 15	598	10%	Día 15	642	9%	Día 15	635	11%	625	10%
Día 22	759	13%	Día 22	934	14%	Día 22	579	10%	757	12%
Día 36	1455	24%	Día 36	1452	21%	Día 36	2799	48%	1902	31%
Día 163	2743	45%	Día 163	1989	29%	Día 163	4621	79%	3118	50%
Día 212	4201	170%	Día 212	2601	38%	Día 212	4832	82%	3878	62%

50

Tabla 17 0.5 mg/kg LDP-02 IV

55

60

65

Sujeto # 9			Sujeto # 10			Sujeto # 12			Media	
Pre-Dosis	5519	(100%	Pre-Dosis	5966	100%	Pre-Dosis	8550	100%	6678	100%
24 hrs	533	10%	24 hrs	548	9%	24 hrs	539	6%	540	8%
24 hrs	542	10%	24 hrs	554	9%	24 hrs	527	6%	541	8%
Día 3	565	10%	Día 3	574	10%	Día 3	539	6%	560	8%
Día 7	544	10%	Día 7	551	9%	Día 7	547	6%	547	8%
Día 15	540	10%	Día 15	525	9%	Día 15	520	6%	528	8%
Día 22	555	10%	Día 22	572	10%	Día 22	543	6%	557	8%
Día 36	885	16%	Día 36	1182	20%	Día 36	643	8%	903	14%
Día 149	444	81%	Día 163	5256	88%	Día 149	7810	91%	5838	87%

ES 2 609 689 T3

Tabla 18 1.5 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto # 13			Sujeto # 15			Sujeto # 16			Media	
Pre-Dosis	4966	100%	Pre-Dosis	5544	100%	Pre-Dosis	5622	100%	5378	100%
3 hr	518	10%	3 hr	539	10%	3 hr	545	10%	534	10%
24 hrs	482	10%	24 hrs	487	9%	24 hrs	520	9%	496	9%
Día 3	511	10%	Día 3	475	9%	Día 3	514	9%	500	9%
Día 7	549	11%	Día 7	535	10%	Día 7	569	10%	551	10%
Día 15	472	9%	Día 15	474	9%	Día 15	491	9%	479	9%
Día 22	603	12%	Día 22	617	11%	Día 22	576	10%	599	1%
Día 36	618	12%	Día 36	866	16%	Día 36	606	11%	697	13%
Día 82	922	19%	Día 80	832	15%				877	16%
Día 134	1647	33%	Día 134	1531	28%				1589	30%
Día 176	2322	47%							1589	43%

Tabla 19 2.5 mg/kg LDP-02 IV

Sujeto # 18			Sujeto # 19			Media	
Pre-Dosis	5922	100%	Pre-Dosis	5065	100%	5494	100%
3 hr	527	9%	3 hr	527	10%	527	10%
24 hrs	568	10%	24 hrs	571	11%	569	10%
Día 3	511	9%	Día 3	521	10%	516	9%
Día 7	503	9%	Día 7	513	10%	508	9%
Día 15	530	9%	Día 15	544	11%	537	10%
Día 22	588	10%	Día 22	595	12%	591	11%
Día 36	550	9%	Día 36	554	11%	552	10%
Día 70	615	10%	Día 69	566	11%	590	11%
Día 138	4572	77%	Día 124	1103	22%	2837	52%
Día 166	5603	95%	Día 152	4094	81%	4849	88%

Tabla 20 grupo placebo

	Sujeto # 1		Sujeto # 7		Sujeto # 11		Sujeto # 14		Sujeto # 17	
Pre-Dosis	5807	100%	5198	100%	8747	100%	7017	100%	5982	100%
3 hr	5630	97%	4305	83%	8454	97%	6208	88%	5520	92%
24 hrs	6672	15%	4347	84%	8033	92%	6699	95%	5410	90%
Día 3	6078	105%	4008	77%	8701	99%	6141	88%	5488	92%
Día 7	5617	97%	4047	78%	8668	99%	6327	90%	5194	87%
Día 15	5797	100%	4758	92%	7516	86%	4851	69%	5759	96%
Día 22	5164	89%	4318	83%	6924	79%	5246	75%	5922	99%
Día 36	6200	107%	4686	90%	7065	81%	7857	112%	5349	89%

Ejemplo 2. Estudio L297-006

5 El estudio titulado, "Estudio de Doble Ciego, Aleatorizado, Placebo Controlado, de Fase Ib/Ila de Dosis Sencilla para Determinar la Seguridad, Tolerabilidad, Farmacocinéticas, Farmacodinámicas, y Efectividad de la LDP-02 en Pacientes con Colitis Ulcerosa Moderadamente Severa" se completo y ciertos resultados finales ese presentan en esta sección.

10 Estudio Racional

15 Los Resultados de la prueba de la Fase I (Ejemplo 1. Estudio L297-007) en voluntarios sanos mostraron que la LDP-02 es dosis de 0,15 mg/kg SC y IV, 0,5 mg/kg IV, 1,5 mg/kg IV, y 2,5 mg/kg IV era segura y tolerada bien. Además, las dosis de 0,15 mg/kg IV o SC y 0,5 mg/kg IV mostraron tener un $t_{1/2}$ de aproximadamente 100 a 130 horas y los datos de la citometría de flujo mostraron que la $\alpha\beta7$ no enlazada empieza a reaparecer en los grupos de dosificación 0,15 mg/kg aproximadamente dos semanas después de la dosificación. En base a estos datos, las dosificaciones de LDP-02 de 0,15 mg/kg SC, 0,15 mg IV, 0,5 mg/kg N, y 2,0 mg/kg IV fueron seleccionadas para el uso en el estudio inicial en pacientes con colitis ulcerosa. Este estudio fue diseñado de tal forma que cada dosis de LDP-02 fue determinada para ser segura y bien tolerada antes del incremento al siguiente nivel de dosis.

20 Diseño del Estudio

25 El estudio fue un estudio de dosis sencilla ascendente, controlado por placebo, de doble ciego, aleatorizado en pacientes diagnosticados con colitis ulcerosa moderadamente severa. Los pacientes con un diagnóstico documentado de colitis ulcerosa con una extensión de enfermedad mínima de 25 cm para el margen anal eran potencialmente elegibles para el estudio. Se excluyeron los pacientes con colitis ulcerosa severa como se define por los criterios de Truelove-Witts (Br Med J; 2:1042-1048 (1995)). Los pacientes de colitis ulcerosa que cumplieron todos los criterios de inclusión/exclusión fueron inscritos secuencialmente en cuatro grupos de estudio y, dentro de cada grupo de estudio, fueron asignados aleatoriamente para recibir LDP-02 o placebo (es decir, 0,9% de cloruro sódico). Los grupos de tratamiento y números de pacientes inscritos se muestran en la Tabla 21.

35 Tabla 21: Grupos de Estudio

Grupo	Vía de Administración*	LDP-02		Placebo
		# pacientes	Dosis	# pacientes
1	SC	5	0.15 mg/kg	2
2	IV	5	0.15 mg/kg	2
3	IV	5	0.5 mg/kg	2
4	IV	5	2.0 mg/kg	2

45 La medicación del Estudio (LDP-02 o placebo) se administró en el Día 1 o Sc en el muslo o por infusión IV de 30 minutos. Las valoraciones de seguridad incluían el registro de eventos adversos, exámenes físicos, signos vitales, laboratorios clínicos (es decir, hematología, químicas de sangre, y análisis de orina), niveles de citoquina en sangre, y ECGs. La sangre fue extraída en varios puntos temporales para medir las concentraciones séricas de LDP-02 y para valorar la efectividad de la LDP-02 para saturar y bloquear los receptores de enlace de la $\alpha4\beta7$ en los linfocitos de la sangre periférica. La efectividad de la LDP-02 para reducir la inflamación en el colon se midió por observaciones de enfermedad clínicas, apariencia endoscópica, histopatología, e inmunohistoquímica.

55 Resultados del Estudio

Disposición y Demografía del Paciente

60 Se introdujeron en el Estudio veintinueve pacientes con colitis ulcerosa moderadamente severa y 28 completaron la prueba. Se descubrió que un paciente era positivo para la toxina *Clostridium difficile* en el cribado, pero debido al retraso al informar de los resultados del laboratorio el paciente fue admitido en la prueba y recibió 2,0 mg/kg IV de LDP-02. Una vez que se obtuvieron los resultados del laboratorio, el paciente fue tratado con antibióticos y reemplazado por otro paciente. No hubo otros pacientes suspendidos del estudio. Como los pacientes fueron reclutados al estudio a lo largo del tiempo, no hubo intento de equilibrar los grupos de tratamiento respecto al historial de colitis ulcerosa de la línea de base. Como tal, la severidad y duración de la enfermedad de colitis

ulcerosa y antes de las medicaciones para la colitis ulcerosa variaron de paciente a paciente y de grupo de tratamiento a grupo de tratamiento. estos datos se presentan en la Tabla 22.

5

Tabla 22: Historial de Colitis Ulcerosa por Grupo de Tratamiento

10

15

20

25

30

Grupo de Tratamiento	Tiempo desde el Comienzo de los Síntomas de la UC (años) ¹	Tiempo desde el diagnóstico de la UC (años) ¹	# de Exacerbaciones Agudas en los últimos 12 meses ¹	Semanas de 5-ASA oral continuo en los últimos 6 meses ¹	Semanas de esteroides orales continuos en los últimos 6 meses ¹
0.15 mg/kg SC (n=S)	5.32 (4.8,6.4)	4.6 (4.3,6.4)	3 (1,12)	24.0 (3,26)	0 (0,6)
0.15 mg/kg IV (n=5)	9.58 (2.6,14.2)	4.9 (2.1,14.0)	1 (1,3)	24.0 (6,26)	10 (0,24)
0.5 mg/kg IV (n=5)	10.8 (0.4,11.8)	9.0 (0.3,11.8)	1 (1,2)	26.0 (0,26)	0 (0,15)
2.0 mg/kg IV (n=6)	9.34 (3.4,58.8)	7.65 (3.2,19.4)	2 (1,5)	25.0 (0,26)	5 (0,26)
All LDP-02 (n=21)	5.99 (0.4,58.8)	4.9 (0.3,19.4)	2 (1,12)	26.0 (0,26)	0 (0,26)
Placebo (n=8)	5.27 (0.4,11.0)	4.85 (0.3,9.7)	1.5 (1,4)	24.0 (0,26)	16 (0,26)

¹Valores de la mediana

Mediciones de la enfermedad

35

40

Aunque este era principalmente un estudio de farmacocinéticas y seguridad del intervalo de la dosis, se midieron varios parámetros para evaluar la efectividad del tratamiento. Las valoraciones de efectividad incluían registrar cambios de la línea de base usando un Sistema de Puntuación de Baron (endoscopia) modificado, Puntuación del Índice de Actividad de la Enfermedad de la Clínica Mayo, la Puntuación del Índice de Actividad de la Enfermedad de Powell-Tuck, frecuencia de deposiciones, y el Cuestionario de enfermedad Intestinal Inflamatoria. Los cambios de la línea de base a Día 30 para estos parámetros se muestran en la Tabla 23. Para pacientes en los que no hubo evaluación en el Día 30, la última observación después de la línea de base obtenida se realizó antes del Día 30.

45

Tabal 23: Cambio de la Línea de Base al Día 30 en los Parámetros de la Enfermedad

50

55

60

65

Grupo de Tratamiento	Cambio de la línea de base al día 30 ¹				
	Puntuación de Severidad Endoscópica	Índice de Actividad de la Clínica Mayo	Índice de Actividad de Powell-Tuck	Frecuencia de Deposiciones	IBDQ Total
0.15 mg/kg SC (n=5)	0 (-2,0)	-3.0 (-9,0)	-3.0 (-6,-2)	-1.0 (-7,1)	14.0 (14,72)
0.15 mg/kg IV (n=5)	0 (0,1)	-1.0 (-3,2)	0 (-3,3)	-0.4 (-5,2)	8.0 (-3,95)
0.5 mg/kg IV (n=5)	-2.0 (-3,0)	-10 (-11,0)	-6.0 (-13,-2)	-5.3 (-6,0)	37.0 (14,80)
2.0 mg/kg IV (n=6)	-0.5 (-2,1)	-2.0 (-6,3)	-1.5 (-5,-5)	-3.2 (-8,2)	-2.5 (-59,95)
All LDP-02 (n=21)	0 (-3,1)	-3.0 (-11,3)	-3.0 (-13,5)	-2.4 (-8,2)	14.0 (-59,95)
Placebo (n=8)	-1.0 (-3,2)	-5.0 (-8,4)	-6.0 (-9,-4)	-3.2 (-12,2)	53.5 (-30,82)

¹Valores de la mediana e intervalo. Para pacientes sin una evaluación el Día 30 la última evaluación después de la línea de base llevada a cabo antes del día 30

Como se ve de los resultados presentados en la Tabla 23, hubo variabilidad de respuesta entre los diferentes grupos de tratamiento. Los pacientes que recibieron 0,5 mg/kg IV parece que tienen las mejores respuestas; el valor de la severidad endoscópica mediana se redujo dos grados y la puntuación de la Clínica Mayo se redujo 10 puntos con una disminución en la frecuencia de las deposiciones. Tres de los cinco pacientes que recibían 0,5 mg/kg IV tuvieron una mejora de dos puntos en la puntuación de sigmoidoscopia de Baron modificada que se considera una respuesta endoscópica; sólo un paciente (comparado con un total de cinco tratados por grupo) en ambos grupos 2,0 mg/kg IV y 0,15 mg/kg SC no tuvo respuesta endoscópica. El grupo placebo también experimentó una mejora en la puntuación sigmoidoscópica y en la puntuación de la Clínica Mayo, aunque ambas fueron menores en magnitud en comparación con el grupo, mg/kg IV. dos de los ocho pacientes experimentaron una respuesta endoscópica.

El número de pacientes con una remisión completa, definida como un cero en la puntuación sigmoidoscópica de Baron modificada y en la puntuación de la Clínica Mayo en el Día 30, se registran en la Tabla 24

Tabla 24: Pacientes en Remisión Completa en el Día 30

Grupo de Tratamiento	Medido el Día 30 ¹	
	Número de Pacientes con Remisión Completa	Porcentaje de Pacientes en Remisión completa
0.15 mg/kg SC (n=5)	0	0
0.15 mg/kg IV (n=5)	0	0
0.5 mg/kg IV (n=5)	2	40%
2.0 mg/kg IV (n=6)	0	0
Todo LDP-02 (n=21)	2	9.5%
Placebo (n=8)	0	0

¹Resultados de Cero en la Puntuación de Baron modificada y Puntuación de la Clínica Mayo en el Día 30

Ninguno de los pacientes en el grupo placebo experimentó una remisión completa mientras que dos pacientes de entre los que recibieron La LDP-02 tuvieron remisiones completas. Los dos pacientes estaban en el mismo grupo; ambos pacientes recibieron una única administración de 0,5 mg/kg de LDP-02. Uno de los pacientes estaba recibiendo terapia de mesalamina concurrente, mientras que el otro estaba recibiendo corticoesteroides de baja dosis concurrentes (20 mg de prednisona por día de forma oral).

Farmacocinéticas

El ensayo de la LDP-02 en suero se realizó por Cytometry Associates, Inc. como se ha descrito anteriormente (Estudio L297-007). Las muestras de sangre se recogieron antes e inmediatamente después de la terminación de la infusión (Día 1) y en los Días 2, 3, 5, 10, 14, 21, 30 y 60 para evaluar el perfil farmacocinético de la LDP-02.

Las concentraciones de LDP-02 a lo largo del tiempo por paciente individual y parámetros farmacocinéticos medios por dosis de LDP-02 se presentan en el Apéndice al estudio L296-006.

Como se ve en la FIGURA 8 los niveles séricos de LDP-02 para los grupos 0,15 mg/kg IV y SC cayeron a <1,0 (µg/mL) aproximadamente 20 días después de la dosis. Para el grupo de dosis 2,0 mg/kg, los niveles de LDP-02 permanecieron elevados hasta aproximadamente el Día 60. La Tabla 25 presenta los parámetros farmacocinéticos clave por grupo de tratamiento.

5 Tabla 25: Parámetros Farmacocinéticos de la LDP-02

Parámetro Farmacocinético ¹	Dosis y Vía de Administración de la LDP-02 (número de sujetos con datos) ²			
	0.15 mg/kg SC (n=5)	0.15 mg/kg IV (n=5)	0.5 mg/kg IV (n=5)	2.0 mg/kg IV (n=4) ³
C_{max} (µg/mL)	1.44 (0.33)	3.602 (0.958)	10.544 (2.582)	32.933 (3.360)
t_{max} (días) (mediana & intervalo)	5 (3-10)	0.13 (0.13-0.13)	0.13 (0.13-0.13)	0.13 (0.13-2)
$t_{1/2z}$ (días)	15.63 (15.92)	18.91 (20.97)	10.62 (5.23)	15.0 (5.36)
AUC_{all} (µg·día/mL)	25 (16)	27 (11)	91 (32)	515 (93)
λ_z (1/día)	0.1226 (0.1064)	0.0879 (0.0757)	0.0927 (0.0775)	0.0542 (0.0298)
$AUC(INF)$ (µg·día/mL)	31 (23)	34 (18)	100 (39)	553 (116)
CL^4 (mL/día/kg)	9.21 (9.54)	7.75 (1.93)	6.06 (1.32)	2.31 (1.19)
V_z^4 (mL/kg)	95.08 (54.19)	101.05 (62.87)	77.63 (30.90)	76.64 (20.03)
¹ Todos los valores son medios +/- SD a menos que se indique lo contrario. El SD aparece en paréntesis. ² Dos pacientes, uno en el grupo 0.15 mg/kg Sc y otro en el grupo 0.5 mg/kg IV tuvieron datos evaluables a través del Día de estudio 21 con medición en momentos posteriores que no fueron fisiológicamente posibles. ³ Un paciente en el grupo de dosificación 2.0 mg/kg IV fue retirado en el Día de Estudio 10 y tuvo una intervención quirúrgica. Los resultados farmacocinéticos para este paciente no están incluidos. ⁴ Los términos de depuración y volumen para el grupo de dosis SC son la depuración aparente (CL/F) y volumen aparente (V_z/F)				

45 No parece que haya linealidad con la dosis para la concentración máxima de LDP-02 y el área por debajo de la curva medida después de la administración IV. La depuración y la vida media de eliminación terminal parecen ser independientes de la dosis IV administrada. El volumen de distribución parece disminuir ligeramente con dosis crecientes de LDP-02 IV.

Valoración del Efecto Farmacocinético de la LDP-02

50 El análisis FACS para medir la presencia de sitios de $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos sanguíneos se ha descrito anteriormente (Estudio L296-007). El enlace de la $\alpha 4\beta 7$ sérico a lo largo del tiempo (es decir valores MESF y porcentaje de la línea de base en cada punto temporal post-dosis) se presentan por paciente individual y por grupo de tratamiento en el Apéndice al Estudio L297-006.

55 Los porcentajes medios de MESF de la línea de base a lo largo del tiempo para todos los tratamientos están presentados en la FIGURA 9. Como se ve en la FIGURA 9, el porcentaje de MESF de la línea de base cae rápidamente a aproximadamente un 10% después de la administración SC y IV de la LDP-02 con duración del efecto dependiente de la dosis. Comenzando alrededor del día 10, la señal de $\alpha 4\beta 7$ empezó a retornar a la línea de base para los grupos de dosis 0,15 mg/kg IV y SC. Sin embargo, la señal de $\alpha 4\beta 7$ empezó a retornar a la línea de base entre el día 30 y el día 60 para los grupos de dosis 0,5 mg/kg IV y 2,0 mg/kg.

Conclusiones

65 La administración de la LDP-02 en dosis de 0,15 mg/kg IV y SC, 0,5 mg/kg IV, y 2,0 mg/kg IV a pacientes con colitis ulcerosa moderadamente severa fue bien tolerada.

Los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los pacientes con colitis ulcerosa fueron consistentes con los descubiertos en voluntarios sanos. Parece haber una linealidad con la dosis para la concentración máxima de LDP-02 y el área por debajo de la curva medida tras la administración IV. El volumen de distribución pareció aumentar ligeramente con dosis crecientes de LDP-02 IV. El porcentaje de MESF de la línea de base disminuyó a ~10% rápidamente después de la administración SC y IV de la LDP-02 con una duración del efecto dependiente de la dosis. Para los grupos de dosificación 0,15 mg/kg IV y SC, el porcentaje de la MESF de la línea de base comenzó a retornar a la línea de base aproximadamente 10 días después de la dosificación mientras este comenzó a tener lugar a los -30 días y -60 días para los grupos de dosis 0,5 mg/kg IV y 2, mg/kg, respectivamente.

10 Apéndice al Estudio L297-006

Concentración Sérica de LDP-02 a lo Largo del Tiempo por Sujeto y Grupo de Tratamiento. Los datos obtenidos de sujetos individuales se presentan en las Tablas 26-30. Los datos presentados en las Tablas 26-30 están en µg/mL.

15

Tabla 26 Grupo 1: 0.15 mg/kg LDP-02 SC

20	25	30	35	40	45	50	55
Time (día)	Sujeto # 201101	Sujeto # 301103	Sujeto # 302105	Sujeto # 304107	Sujeto # 401104		
Pre-Dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL		
0.125	BQL	0.07	BQL	BQL	NS		
2	0.61	0.91	0.94	1.01	1.29		
3	0.90	1.10	1.29	1.49	1.65		
5	0.76	1.48	NR	1.66	1.74		
10	0.15	1.12	1.40	0.92	1.44		
14	BQL	0.61	0.78	0.24	0.99		
21	BQL	BQL	NS	0.11	0.65		
30	BQL	0.33	0.84	0.26	0.12		
60	BQL	0.23	0.37	0.30	BQL		
BQL= registrado como no detectable							
NS= no se recibió muestra del laboratorio							

35

Tabla 27 Grupo 2: 0.15 mg/kg LDP-02 IV

40	45	50	55	60	65
Time (Día)	Sujeto # 101201	Sujeto # 102202	Sujeto # 305204	Sujeto # 402203	Sujeto # 403206
Pre-Dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
0.125	4.14	4.88	3.35	2.34	3.30
2	NR	2.74	1.92	1.83	2.34
3	3.12	3.15	1.55	1.42	2.03
5	1.82	1.83	1.33	0.82	1.19
10	0.81	0.88	0.86	0.37	0.79
14	0.32	0.15	BQL	0.23	0.26
21	0.38	0.12	0.10	BQL	BQL
30	0.38	BQL	0.40	BQL	0.05
60	0.24	BQL	0.36	BQL	0.14
NR= no se informó del resultado de la muestra del laboratorio					

55

60

65

5

Tabla 28 Grupo 3: 0.5 mg/kg LDP-02 IV

10

15

20

Tiempo(día)	Sujeto # 206302	Sujeto # 208303	Sujeto # 309306	Sujeto # 502304	Sujeto # 503307
Pre-Dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
0.125	14.06	12.33	7.90	8.67	9.76
2	10.01	8.51	5.73	5.84	8.26
3	6.56	6.45	4.96	4.67	7.27
5	4.15	5.52	3.59	2.94	5.61
10	3.17	4.46	2.81	3.11	4.21
14	2.51	0.14	2.46	1.14	3.01
21	BQL	0.17	*0.14	BQL	2.04
30	BQL	0.48	BQL	0.06	1.29
60	0.41	1.73	0.10	0.28	BQL

25

Tabla 29 Grupo 4: 2.0 mg/kg LDP-02 IV

30

35

40

Tiempo (día)	Sujeto # 104403	Sujeto # 210402	Sujeto # 310415	Sujeto # 404401	Sujeto # 504405	Sujeto # 506407
Pre-Dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
0.125	30.45	38.83	37.66	29.71	28.90	32.18
2	32.18	28.22	35.14	27.49	27.49	26.87
3	23.93	17.40	27.49	24.45	22.92	22.46
5	21.52	15.34	21.52	18.42	21.52	17.79
10	13:10	41.11	14.82	13.10	10.99	11.96
14	11.72	3.13	13.10	11.23	1.22	9.03
21	7.53	0.08	10.99	8.55	0.12	5.70
30	5.80	BQL	8.26	7.02	NR	4.19
60	1.71	0.41	2.24	1.95	NR	0.06

45

Tabla 30 Grupo placebo

50

55

60

Tiempo (día)	Sujeto # 202102	Sujeto# 303106	Sujeto# 103205	Sujeto # 306207	Sujeto # 308305	Sujeto # 501301	Sujeto # 209404	Sujeto # 505406
Pre-Dosis	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
0.125	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
2	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
3	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
5	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
10	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
14	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
21	BQL	BQL	NR	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
30	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
60	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL

BQL = por debajo del límite de cuantificación.

65

Parámetros Farmacocinéticos Medios por Grupo de Tratamiento. Los datos obtenidos de sujetos individuales se presentan en las Tablas 31-34.

5

Tabla 31 Grupo 1: 0.15 mg/kg LDP-02 SC

10

Sujeto	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (días)	t _{1/2z} (días)	AUC _{all} (µg·día/mL)	λ _z (1/día)	AUC (µg·día/mL)	CL (mL/día/kg)	V _z (mL/kg)
201101	0.90	3	2.58	5.30	0.2692	5.86	25.61	95.15
301103	1.48	5	34.61	30.39	0.0200	41.87	3.58	178.87
15 302105	1.40	10	31.35	46.94	0.0221	63.68	2.36	106.55
304107	1.66	5	3.88	15.41	0.1788	16.02	9.36	52.37
401104	1.74	5	5.72	28.17	0.1212	29.16	5.14	42.45
20 Media	1.436	5.6	15.628	25.242	0.1223	31.318	9.21	95.078
SD	0.329	2.607	15.921	15.813	0.1064	22.613	9.54	54.190

20

25

30

C_{max} = concentración máxima
 t_{max} = tiempo para la concentración máxima
 λ_z = una medida de eliminación
 t_{1/2z} = vida media terminal
 AUC_i = AUC_{all} = área por debajo de la curva usando todos los puntos temporales
 AUC = AUC_{ext} = área por debajo de la curva extrapolada
 AUC ext (%) = % de área por debajo de la curva atribuida a la extrapolación de la extrapolación
 V_z = volumen aparente de distribución
 CL = Depuración

Tabla 32 Grupo 2: 0.15 mg/kg LDP-02 IV

35

40

45

50

Sujeto	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (días)	t _{1/2z} (días)	AUC _{all} (µg·día/mL)	λ _z (1/día)	AUC (µg·día/mL)	CL (mL/día/kg)	V _z (mL/kg)
101201	4.14	0.13	54.69	39.64	0.0127	58.58	2.56	202.06
102202	4.88	0.13	3.62	25.15	0.1914	25.78	5.82	30.39
305204	3.35	0.13	19.37	34.17	0.0358	44.23	3.39	94.77
402203	2.34	0.13	4.88	12.10	0.1420	13.72	10.94	77.03
403206	3.30	0.13	11.99	23.28	0.0578	25.70	5.84	100.99
Media	3.602	0.13	18.91	26.868	0.0879	33.602	5.71	101.05
SD	0.9579	0	20.97	10.611	0.0757	17.718	3.27	62.87

Tabla 33 Grupo 3: 0.5 mg/kg LDP-02 IV

55

60

65

Sujeto	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (días)	t _{1/2z} (días)	AUC _{all} (µg·día/mL)	λ _z (1/día)	AUC (µg·día/mL)	CL (mL/día/kg)	V _z (mL/kg)
206302	14.06	0.13	17.21	139.26	0.0403	149.44	3.35	83.08
208303	12.33	0.13	3.02	74.99	0.2293	75.73	6.60	28.79
309306	7.90	0.13	9.22	67.49	0.0751	68.82	7.27	96.69
502304	8.67	0.13	10.52	65.34	0.0659	69.59	7.19	109.09
503307	9.76	0.13	13.11	109.80	0.0529	134.20	3.73	70.48
Media	10.544	0.13	10.616	91.376	0.0927	99.556	5.628	77.626
SD	2.582	0	5.229	32.207	0.0775	39.048	1.928	30.90

5

Tabla 34 Grupo 4: 2.0 mg/kg LDP-021V

Sujeto	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (días)	t _{1/2z} (días)	AUC _{all} (µg·día/mL)	λ _z (1 día)	AUC (µg·día/mL)	CL (mL/día/kg)	V _z (mL/kg)
104403	32.18	2.00	17.92	510.32	0.0387	554.52	3.61	93.22
310415	37.66	0.13	16.72	626.06	0.0415	680.08	2.94	70.92
404401	29.71	0.13	18.34	525.63	0.0378	577.22	3.46	91.68
15 506407	32.18	0.13	7.02	398.45	0.0988	399.06	5.01	50.75
506407 Media	32.933	0.13	15.0	515.12	0.0542	552.72	3.755	76.643
20 SD	3.360	0.935	5.364	93.19	0.0298	116.10	0.885	20.034

25

Enlace de α4β7 Sérica a lo Largo del Tiempo por Sujeto por Grupo de Tratamiento. Los datos obtenidos de sujetos individuales se presentan en las Tablas 35-40. Para cada sujeto se presenta el tiempo de muestro sanguíneo, MESF de la muestra y % de la línea de base (pre-dosis).

Tabla 35 Grupo 1: 0.15 mg/kg LDP-02 SC

Tiempo Días	Sujeto # 201101		Sujeto # 301103		Sujeto # 302105		Sujeto # 304107		Sujeto # 401104		Media	
Pre- Dosis	1004 6	100 %	732 6	100%	1268 4	100 %	1311 7	100 %	3369	100%	9308	100%
35 0.125	951	9%	762	10%	1700	13%	857	7%	1105	33%	1075	12%
3	797	8%	383	5%	707	6%	853	7%	575	17%	663	17%
5	845	8%	723	10%			815	16%	1052	31%	859	9%
40 10	675	7%	717	10%	862	7%	865	7%	941	28%	812	9%
14	4197	42%	754	10%	830	7%	905	7%	1058	31%	1549	17%
21	9610	96%	803	11%	834	7%	3443	26%	948	28%	3128	34%
45 30	9462	94%	114 2	16%	1275	10%	1587	12%	1113	33%	2916	31%
60	9839	98%	752	10%	849	7%	1262	10%	2849	85%	3110	33%

50

55

60

65

ES 2 609 689 T3

Tabla 36 Grupo 2: 0.15 mg/kg LDP-02 IV

Tiempo Días	Sujeto # 101201		Sujeto # 102202		Sujeto # 305204		Sujeto # 402203		Sujeto # 403206		Media		
	5	Pre-Dosis	2588	100%	271 2	100%	8394	100%	10016	100%	8342	100%	6410
10	0.125	701	27%	827	30%	848	10%	642	6%	875	10%	779	12%
	3	760	29%	784	29%	820	10%	679	7%	875	10%	784	12%
	5	677	26%	884	33%	1012	12%	639	6%	859	10%	814	13%
	10	671	26%	753	28%	943	11%	690	7%	856	10%	783	12%
	15	14	1008	39%	151 5	56%	1377	16%	608	6%	744	9%	1050
20	21	953	37%	422 0	156%	1860	22%	2044	20%	1606	19%	2137	33%
	30	988	38%	328	12%	2332	28%	3302	33%	2560	31%	1902	30%
	60	1680	65%	367 0	135%	3275	39%	6851	68%	1168	14%	3329	52%

Tabla 37 Grupo 3: 0.5 mg/kg LDP-02 IV

Tiempo Días	Sujeto # 206302		Sujeto # 208303		Sujeto # 309306		Sujeto # 502304		Sujeto # 503307		Media		
	25	Pre-Dosis	3830	100%	11267	100%	5084	100%	5615	100%	9400	100%	7039
30	10.125	1322	35%	1577	14%	887	17%	879	16%	1021	11%	1137	16%
	3	1189	31%	2012	18%	914	18%	775	14%	982	10%	1174	17%
35	5	1054	28%	1717	15%	962	19%	809	14%	1147	12%	1138	16%
	10	1195	31%	2108	19%	965	19%	829	15%	732	8%	1166	17%
	14	1339	35%	2405	21%	1106	22%	610	11%	801	9%	1252	18%
40	21	1296	34%	2085	19%	671	13%	636	11%	733	8%	1084	15%
	30	1483	39%	1706	15%	1203	24%	860	15%	611	7%	1173	17%
	60	985	26%	1038	9%	1611	32%	764	14%	7611	81%	2402	34%

45

50

55

60

65

ES 2 609 689 T3

Tabla 38 Grupo 4: 2.0 mg/kg LDP-02 IV*

Tiempo Días	Sujeto # 104403		Sujeto # 210402		Sujeto # 310415		Sujeto # 404401		Sujeto # 506407		Media	
	Pre-Dosis	6714	100%	5026	100%	4642	100%	4235	100%	7418	100%	5607
0.125	695	10%	666	13%	736	16%	671	16%	738	10%	701	13%
3	659	10%	671	13%	632	14%	760	18%	683	9%	681	12%
5	633	9%	659	13%	663	14%	730	17%	665	9%	670	12%
10	703	10%	636	13%	556	12%	778	18%	734	10%	681	12%
14	681	10%	590	12%	640	14%	658	16%	755	10%	665	12%
21	528	8%	621	12%	568	12%	586	14%	756	10%	612	11%
30	639	10%	1218	24%	599	13%	682	16%	740	10%	776	14%
60												
*Sin datos para el Sujeto # 505405												

Tabla 39 Grupo Placebo

Tiempo Días	Sujeto # 202102		Sujeto # 303106		Sujeto # 103205		Sujeto # 306207		Sujeto # 308305		Sujeto # 501301	
	Pre-Dosis	7657	100%	21074	100%	4935	100%	8070	100%	15162	100%	5274
0.125	5643	74%	23312	111%	4935	100%	6837	85%	15162	100%	6424	122%
3	8831	115%	19528	93%	4593	93%	7162	89%	13876	92%	6022	114%
5	7158	93%	16567	79%	4452	90%	5044	63%	13094	86%	5530	105%
10	7413	97%	17575	83%	5499	111%	4750	59%	14531	96%	8201	155%
14	6092	80%	17827	85%	3222	65%	4169	52%	10294	68%	6740	128%
21	8463	111%	18048	86%			4491	56%	12700	84%	7205	137%
30	7353	96%	15817	75%	2317	47%	11458	142%	9328	62%	5745	109%
60	3385	44%	11810	56%			4771	59%	9648	64%	3262	62%

ES 2 609 689 T3

Tabla 40 Grupo placebo

Tiempo Días	Sujeto # 209404		Sujeto # 505406		Media	
Pre-Dosis	11012	100%	7579	100%	10095	100%
0.125	11826	107%	9025	119%	10396	103%
3	10549	96%	8792	116%	9919	98%
5	11614	105%	6217	82%	8710	86%
10	8238	75%	7150	94%	9170	91%
14	8382	76%	4787	63%	7689	76%
21	7031	64%	7160	94%	9300	92%
30	6817	62%	8166	108%	8375	83%
60						

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

5 1. Una inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma que tiene especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$, para su uso en el tratamiento de un humano que tiene una enfermedad seleccionada del grupo consistente de una enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de la insulina, colangitis, pericolangitis y enfermedad de injerto contra huésped, en donde dicho uso comprende administrar la inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma en una dosis inicial seguida por una o más dosis posteriores y el intervalo mínimo entre dos dosis cualquiera es un periodo de al menos 1 día, y en donde no se administran más de 8 mg de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno por kg de peso corporal durante un periodo de un mes, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno enlaza específicamente con $\alpha 4\beta 7$ pero no enlaza con $\alpha 4\beta 1$ y en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma inhibe el enlace de la integrina $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM-1.

15 2. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma comprende una región de enlace con el antígeno que comprende tres regiones determinantes complementarias (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena ligera y tres regiones determinantes complementarias (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos enunciada a continuación:

20 cadena ligera: CDR1 SEQ ID NO:9
 CDR2 SEQ ID NO:10
 CDR3 SEQ ID NO:11
 cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO:12
 CDR2 SEQ ID NO:13
25 CDR3 SEQ ID NO:14.

30 3. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma comprende una cadena pesada y una cadena ligera, la cadena ligera comprendiendo regiones determinantes complementarias derivadas de un anticuerpo de origen no humano que enlaza con $\alpha 4\beta 7$ y una región marco derivada de una cadena ligera de origen humano, en donde cada una de dichas regiones determinantes complementarias (CDR1, CDR2 y CDR3) comprende la secuencia de aminoácidos enunciada a continuación:

35 cadena ligera: CDR1 SEQ ID NO:9
 CDR2 SEQ ID NO:10
 CDR3 SEQ ID NO:11

40 la cadena pesada comprendiendo regiones determinantes complementarias derivadas de un anticuerpo de origen no humano que enlaza con $\alpha 4\beta 7$ y una región marco derivada de una cadena pesada de origen humano, en donde cada una de dichas regiones determinantes complementarias (CDR1, CDR2 y CDR3) comprende la secuencia de aminoácidos enunciada a continuación:

45 cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO:12
 CDR2 SEQ ID NO:13
 CDR3 SEQ ID NO:14.

50 4. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 3, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma comprende la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:6.

55 5. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 3 ó 4, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma comprende a región variable de cadena ligera SEQ ID NO:8.

60 6. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para lograr:

- a) 50% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes,
- b) 50% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes, o
- c) 50% o más de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes y 50% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes

65 en donde (i) dicha saturación se puede mantener durante un periodo de al menos 10 días tras la administración de dichas dosis; (ii) dicha inhibición se puede mantener durante un periodo de al menos 10 días tras la administración

de dichas dosis; o (iii) dicha saturación e inhibición se pueden mantener cada una durante un periodo de al menos 10 días tras la administración de dichas dosis.

- 5 7. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente una cantidad de inmunoglobulina o fragmento que es suficiente para lograr y mantener dicha saturación y/o inhibición durante un periodo de al menos 14 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días, o al menos 60 días tras la administración de dicha dosis.
- 10 8. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas dosis comprende una cantidad de inmunoglobulina que es suficiente para lograr y mantener una concentración sérica de inmunoglobulina de al menos 1 µg/ml durante un periodo de al menos 10 días, o al menos 14 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días, o al menos 60 días tras la administración de dicha dosis.
- 15 9. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente de 0,1 a 8 mg de inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma por kg de peso corporal.
- 20 10. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente 0,15, 0,5, 1,0, 1,5 ó 2,0 mg de inmunoglobulina o fragmento por kg de peso corporal.
- 25 11. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el intervalo entre dosis es de al menos 14 días, o al menos 21 días, o al menos 28 días, o al menos 30 días.
- 30 12. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además el uso de una cantidad efectiva de uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 35 13. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho uso es para tratar a un humano que tiene enfermedad inflamatoria intestinal.
- 40 14. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho intervalo entre dos dosis cualquiera es un periodo de 7 días.
- 45 15. Una inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma que tiene especificidad de enlace para la integrina $\alpha 4\beta 7$, para su uso en el tratamiento de recaída y/o recurrencia de enfermedad inflamatoria intestinal quiescente (stet) en donde dicho uso comprende administrar una cantidad efectiva de una inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma que enlaza específicamente con $\alpha 4\beta 7$, pero no enlaza con $\alpha 4\beta 1$, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma inhibe el enlace de la integrina $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM-1, y en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma se administra en dosis y el intervalo mínimo entre dos dosis cualquiera es un periodo de al menos 7 días, y en donde no se administran más de 8 mg de inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma por kg de peso corporal durante un periodo de un mes.
- 50 16. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 15, en donde el intervalo entre dosis es de al menos 14 días, o al menos 21 días, o al menos un mes.
- 55 17. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 15, en donde el intervalo entre dosis es de al menos 40 días.
- 60 18. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 15, en donde el intervalo entre dosis es de al menos 50 días.
- 65 19. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 15, 16, 17 ó 18, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente de alrededor de 0,1 a alrededor de 8 mg o de alrededor de 0,1 a alrededor de 5 mg o de alrededor de 0,1 a alrededor de 2,5 mg de inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno por kg de peso corporal.
20. La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 15, 16, 17, 18 ó 19, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma comprende una región de enlace con el antígeno que comprende tres regiones determinantes complementarias (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena ligera y tres regiones determinantes

complementarias (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos enunciada a continuación:

5 cadena ligera: CDR1 SEQ ID NO:9
 CDR2 SEQ ID NO:10
 CDR3 SEQ ID NO:11
 cadena pesada: CDR1 SEQ ID NO:12
 CDR2 SEQ ID NO:13
 10 CDR3 SEQ ID NO:14.

15 **21.** La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente una cantidad de inmunoglobulina que es suficiente para lograr a) 60% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes, b) 60% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes, o c) 60% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes y 60% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes.

20 **22.** La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente una cantidad de inmunoglobulina que es suficiente para lograr a) 70% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes, b) 70% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes, o c) 70% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes y 70% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes.

25 **23.** La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente una cantidad de inmunoglobulina que es suficiente para lograr a) 80% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes, b) 80% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes, o c) 80% o más de saturación de sitios de enlace de integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos circulantes y 80% o más de inhibición de expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie celular de linfocitos circulantes.

30 **24.** La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas dosis comprende independientemente una cantidad de inmunoglobulina que es suficiente para a) lograr y mantener dicha saturación durante un periodo de al menos 14, 30 ó 60 días tras la administración de dicha dosis, b) lograr y mantener dicha inhibición durante un periodo de al menos 14, 30 ó 60 días tras la administración de dicha dosis, o c) lograr y mantener dicha saturación e inhibición durante un periodo de al menos 14, 30 ó 60 días tras la administración de dicha dosis.

35 **25.** La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo consistente de Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

40 **26.** La inmunoglobulina humanizada o fragmento que enlaza con el antígeno de la misma para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento que enlaza con el antígeno se administra a dicho humano subcutáneamente o intravenosamente.

50

55

60

65

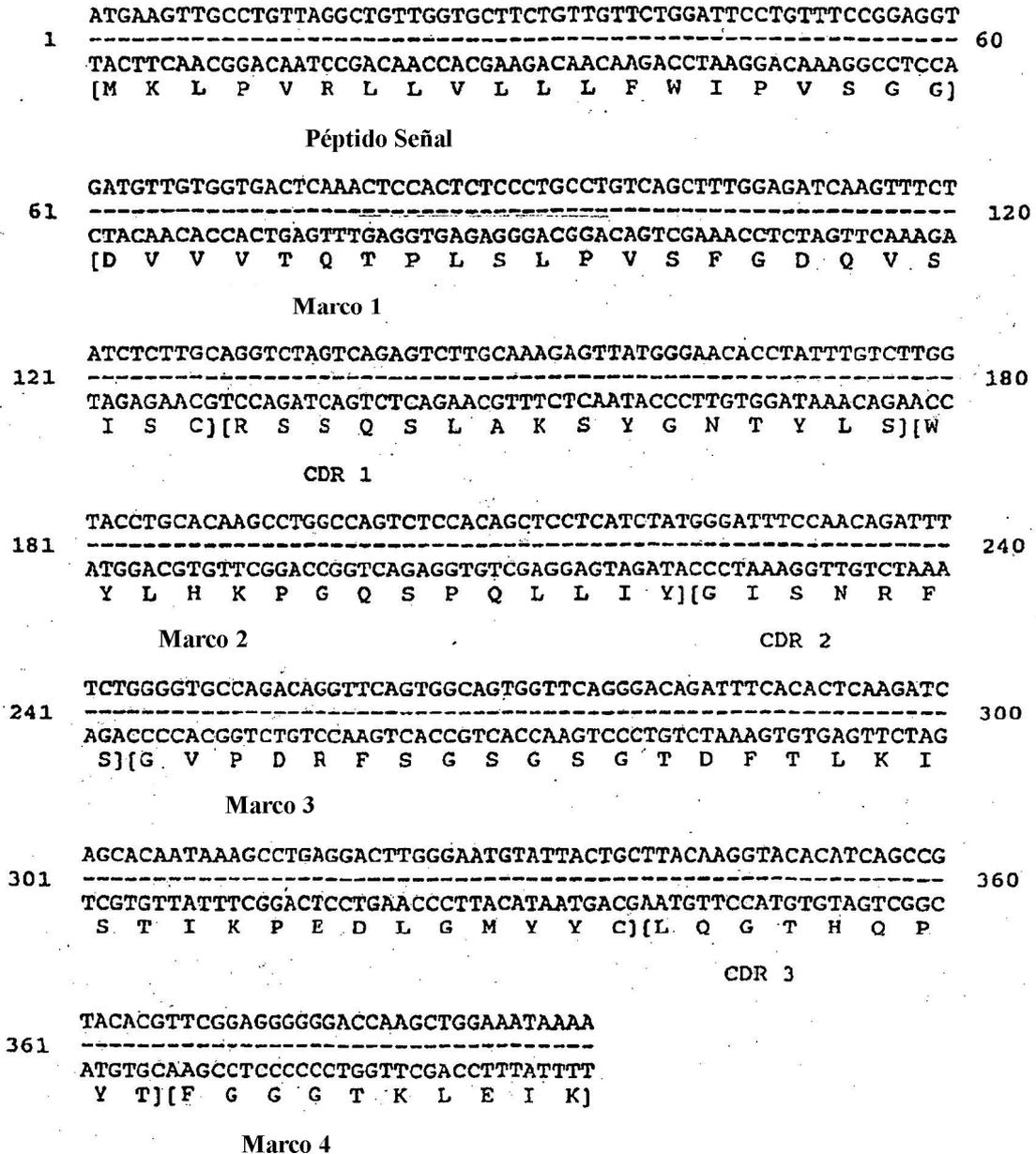


FIG. 1

1 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAAGTGTCCACTCCCAG 60

 TACCCTACCTCGACATAGTAGGAGAAGAACCATAGTTGTCGATGTTACAGGTGAGGGTC
 M G W S C I I L F L V S T A T S V H S][Q

Péptido Señal

61 GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTCC 120

 CAGGTTGACGTCGTCGGACCCCGACTCGAACACTTCGGACCCTGAAGTCACTTCGACAGG
 V Q L Q Q P G A E L V K P G T S V K L S

Marco 1

121 TGCAAGGGTTATGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCT 180

 ACGTCCCAATACCGATGTGGAAGTGGTCGATGACCTACGTGACCCACTTCGTCTCCGGA
 C K G Y G Y T F T][S Y W M H][W V K Q R P

CDR 1

181 GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGAGAGTAATACTAACTACAAT 240

 CCGTTCGGAACTCACCTAGCCTCTCTAACTAGGAAGACTCTCATTATGATTGATGTTA
 G Q G L E W I G][E I D P S E S N T N Y N

Marco 2 CDR 2

241 CAAAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACATTTCCCTCCAGCACAGCCTACATG 300

 GTTTTTAAGTTCCCGTTCGGGTGAACTGACATCTGTAAAGGAGGTCGTGTCGGATGTAC
 Q K F K G][K A T L T V D I S S S T A Y M

Marco 3

301 CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTAC 360

 GTCGAGTCGTCGGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATGATAACACGTTCTCCCCCAATG
 Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R][G G Y

361 GACGGATGGGACTATGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCTCAGTCACCGTCTCCTCA 420

 CTGCCTACCCTGATACGATAACTGATGACCCAGTTCGGTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGT
 D G W D Y A I D Y][W G Q G T S V T V S S]

CDR 3 Marco 4

FIG. 2

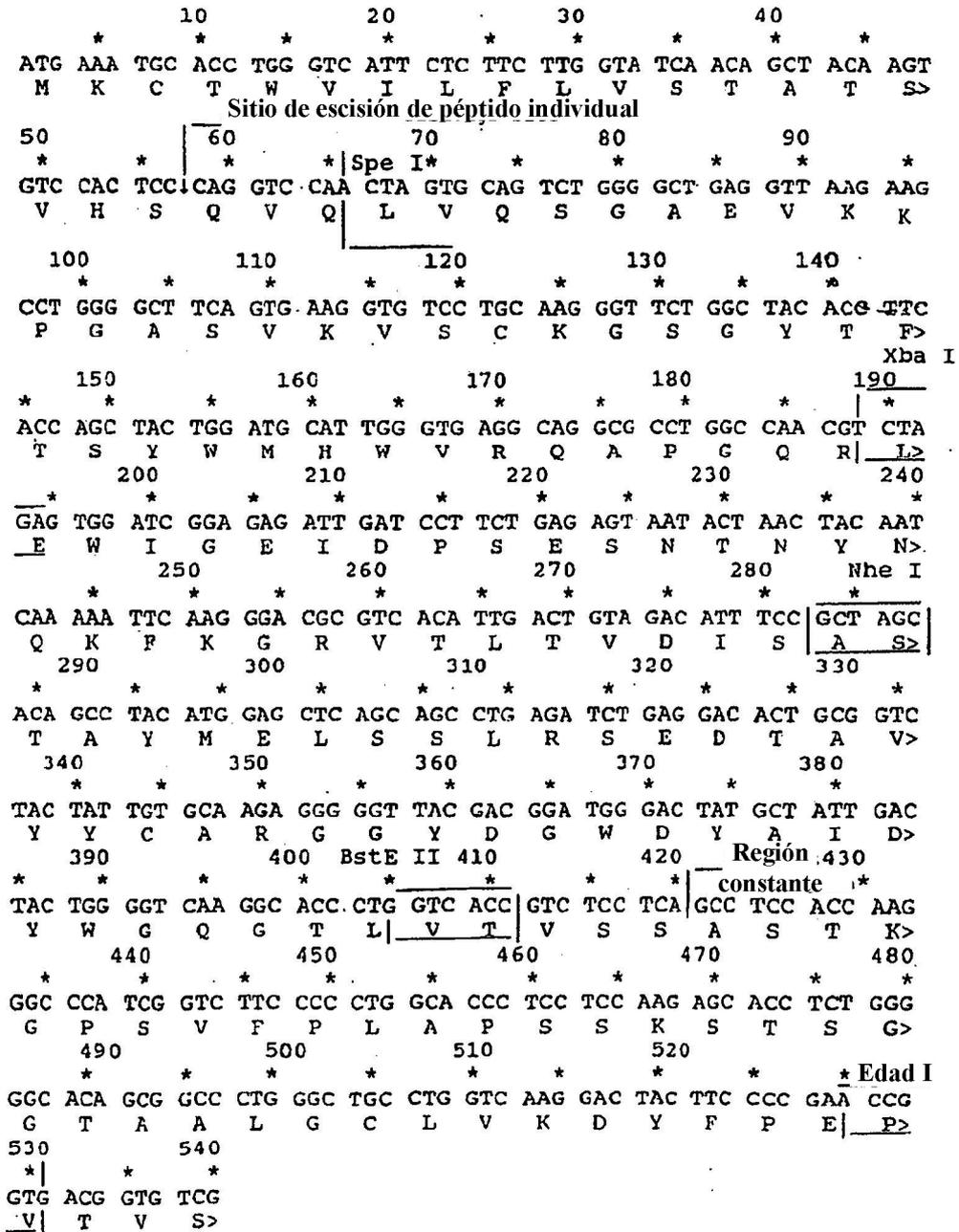


FIG. 3

```

          10          20          30          40
      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT CCT
M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  L  L  L  F  W  I  P>
      Sitio de escisión de péptido individual
50  BspE I 60 70 80 90
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG ATG ACT CAA AGT CCA CTC TCC CTG CCT
V  S  G  G  D  V  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P>

100          110          120          130          140
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
GTC ACC CCT GGA GAA CCA GCT TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT
V  T  P  G  E  P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S>

150          160          170          180 Asp 718 190
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG TAC CTG CAG AAG
L  A  K  S  Y  G  N  T  Y  L  S  W  Y L  Q  K>

200          210          220          230          240
      *Msc I *   *   *   *   *   *   *   *
CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT
P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  G  I  S  N  R  F>

250          260          270          280
      *   *   *   *   *   *   *   *
TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F>

290          300 NruI          310          320          330
      *   *   *   *   *   *   *   *
ACA CTC AAG ATC TCG CGA GTA GAG GCT GAG GAC GTG GGA GTG TAT TAC
T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y>

340          350          360          370          380
      *   *   *   *   *   *   *   *
TGC TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG
C  L  Q  G  T  H  Q  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K>

390          400          410 Kas I
      *   *   *   *   *
GTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCG GCG CC
V  E  I  K  R  A  D  A  A  P>

```

FIG. 4

Cadena Ligera

CDR1 R S S Q S L A K S Y G N T Y L S
CDR2 G I S N R F S
CDR3 L Q G T H Q P Y T

Cadena Pesada

CDR1 S Y W M H
CDR2 E I D P S E S N T N Y N Q K F K G
CDR3 G G Y D G W D Y A I D Y

FIG. 5

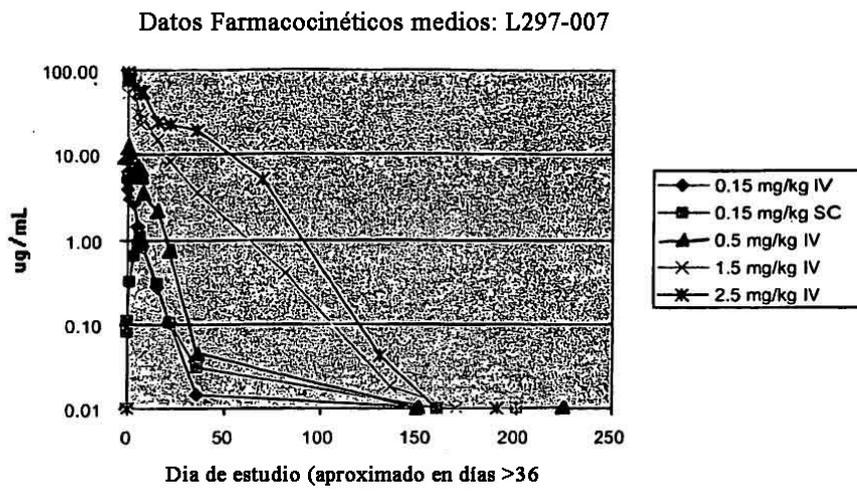


FIG. 6

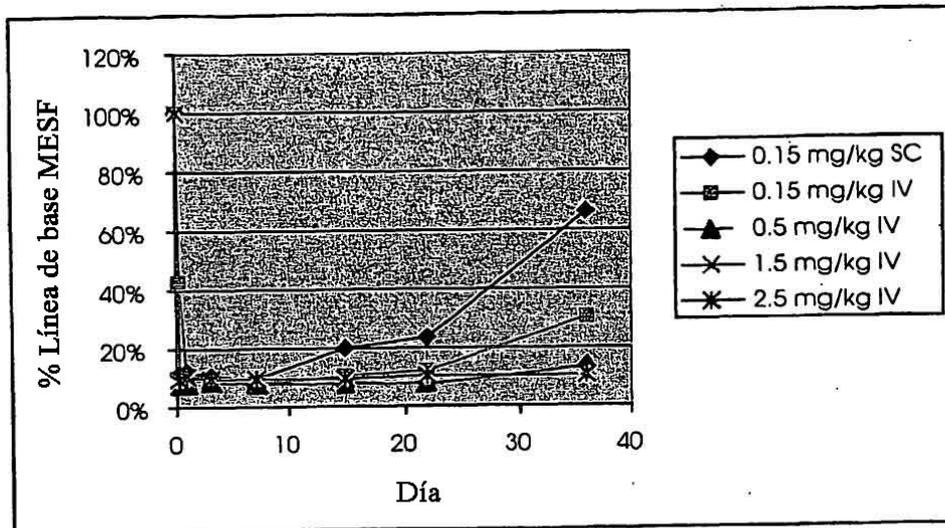


FIG. 7

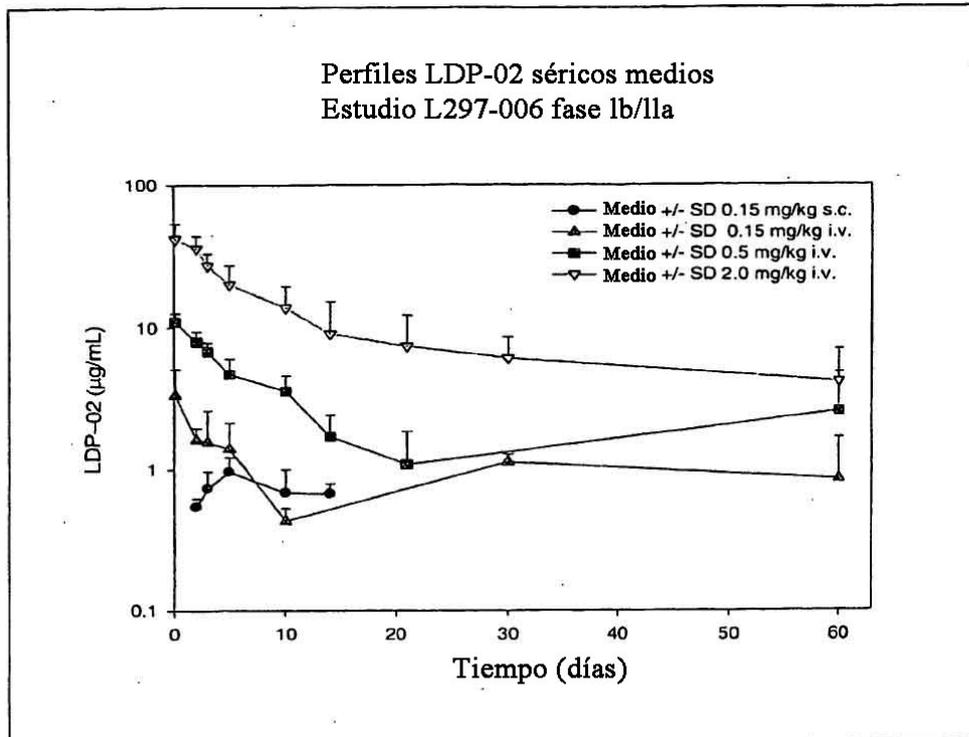


FIG. 8

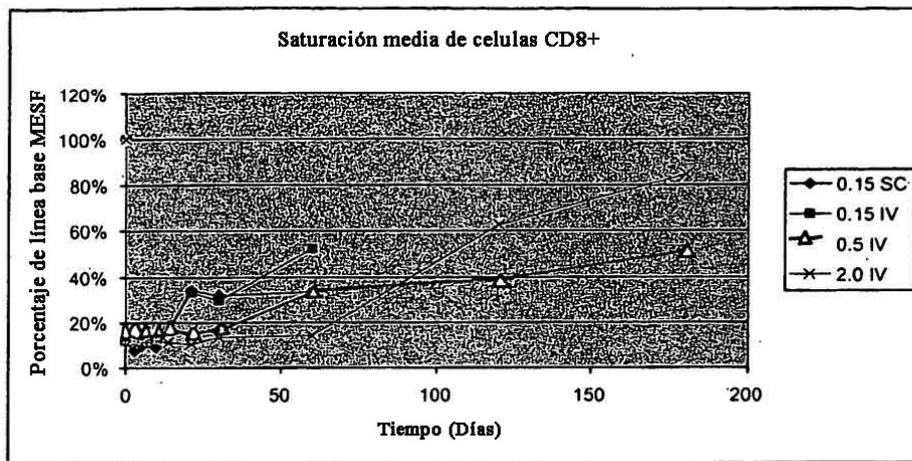


FIG. 9