

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 200**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/EP2012/068146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO2013037970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12759150 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2748611**

54 Título: **Procedimientos para supervisar la capacidad de respuesta al tratamiento anti-SMAD7**

30 Prioridad:

**15.09.2011 EP 11425234**

**16.12.2011 US 201161576556 P**

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

**15.06.2017**

73 Titular/es:

**NOGRA PHARMA LIMITED (100.0%)**

**33 Sir John Rogerson's Quay**

**Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**MONTELEONE, GIOVANNI;**

**VITI, FRANCESCA y**

**BELLINIA, SALVATORE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 617 200 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para supervisar la capacidad de respuesta al tratamiento anti-SMAD7

### Antecedentes

5 La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) es un trastorno inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal que padece aproximadamente un millón de pacientes en Estados Unidos. Las dos formas más habituales de la EII son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Aunque la EC puede afectar a todo el tracto gastrointestinal, afecta principalmente al íleon (parte distal o inferior del intestino delgado) y al intestino grueso. La CU afecta principalmente al colon y al recto. El tratamiento actual tanto de la CU como la EC incluyen aminosalicilatos (por ejemplo, ácido 5-aminosalicílico, sulfasalazina y mesalamina), antibióticos (por ejemplo, ciprofloxacina y metronidazol), corticosteroides (por ejemplo, budesonida o prednisona), inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina o metotrexato) y antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, infliximab (Remicade®)). La respuesta del paciente a estos tratamientos varía con la gravedad de la enfermedad y puede variar a lo largo de ciclos de inflamación activa y remisión. Además, muchos de los tratamientos actuales para la EII están asociados con efectos secundarios indeseables.

15 Aunque las etiologías de la EC y CU son desconocidas, ambas se consideran enfermedades inflamatorias de la mucosa intestinal. Estudios recientes han demostrado que el TGF- $\beta$ 1 actúa como un potente inmunorregulador capaz de controlar la inflamación de la mucosa intestinal. TGF- $\beta$ 1 se une a un receptor heterodimérico transmembrana serina/treonina quinasa que contiene dos subunidades, R1 de TGF- $\beta$ 1 y R2 de TGF- $\beta$ 1. Tras la unión del ligando, el receptor R1 de TGF- $\beta$ 1 receptor se fosforila mediante el receptor R2 de TGF- $\beta$ 1 activado constitutivamente y la señal se propaga al núcleo mediante proteínas que pertenecen a la familia SMAD. El R1 de TGF- $\beta$ 1 activado fosforila directamente las proteínas SMAD2 y SMAD3, que a continuación interactúan con SMAD4. El complejo de SMAD2/SMAD3/SMAD4 se transloca al núcleo y modula la transcripción de ciertos genes.

25 Estudios adicionales han demostrado que la otra proteína SMAD, SMAD7, tiene también un papel en la inflamación. SMAD7, una proteína intracelular, ha demostrado interferir con la unión de SMAD2/SMAD3 al R1 de TGF- $\beta$ 1 evitando la fosforilación y la activación de estas proteínas. Adicionalmente, un aumento en la expresión de la proteína SMAD7 está asociada con la inhibición de la señalización mediada por TGF- $\beta$ 1. Las muestras de mucosa de pacientes con EII se caracterizan por niveles altos de SMAD7 y niveles reducidos de SMAD3 fosforilada, lo que indica la señalización mediada por TGF- $\beta$ 1 está alterada en dichos pacientes.

30 Estudios recientes se han centrado en SMAD7 como diana para el tratamiento de los pacientes que padecen EII. Dichos tratamientos incluyen tratamientos de sentido contrario dirigidos contra SMAD7. Fanitini y col. (Gastroenterology 2009) se refiere al problema de determina la respuesta a un tratamiento con linfocitos T dirigidos contra SMAD7 de pacientes de EII y divulgan que, el tratamiento con anti-SMAD7 reduce los linfocitos T que expresan CD4 en muestras de la mucosa. De este modo, sigue existiendo una necesidad de procedimientos basados en biomarcadores predictivos que se pueda usar para identificar pacientes que probablemente responderán (o no responderán) al tratamiento con terapias anti-SMAD7.

### Sumario

40 La invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que la modulación de determinadas poblaciones de linfocitos T (por ejemplo, aumento de los linfocitos T CCR9+ FoxP3+, reducción de los linfocitos T CCR9+ IFN-gamma positivo (IFN- $\gamma$ +), reducción de los linfocitos T CCR9+ IL17A+, reducción de los linfocitos T FoxP3+, reducción de los linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o reducción de los linfocitos T IL17A+) en una muestra de sangre periférica de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que padece enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) se correlaciona con la capacidad de respuesta al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7.

45 Se apreciará que supone una ventaja poder predecir por adelantado, o poco después de comenzar el tratamiento, si es probable que un paciente de EII se responda al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7. La modulación de las poblaciones celulares como se describe en el presente documento es predictiva de la eficacia del tratamiento de un sujeto de EII con una terapia dirigida contra SMAD7. De manera ventajosa, los procedimientos de la invención ayudarán definitivamente a los médicos para seleccionar tratamientos eficaces, y conducirá a mejoras en la patología del paciente, una mejor atención sanitaria y la reducción global del coste del paciente.

50 De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene enfermedad inflamatoria del intestino (EII) al tratamiento con al menos una terapia dirigida contra SMAD7, comprendiendo el procedimiento:

55 determinar la cantidad de al menos una población celular seleccionadas entre el grupo que consiste en: linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-gamma y linfocitos T IL17A+, en al menos una muestra obtenida del sujeto, en el que, mayores cantidades de la población celular de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, y/o menores cantidades de al menos una de las poblaciones celulares de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos

T FoxP3+, linfocitos T IFN-gamma y linfocitos T IL17A+, en el al menos una muestra con respecto a un nivel de control conocido de la al menos una población celular es predictivo de la capacidad de respuesta del sujeto que padece EII a una terapia dirigida contra SMAD7.

5 Se debe apreciar que "determinar la capacidad de respuesta de un sujeto" incluye la predicción o el seguimiento de la eficacia o la capacidad de respuesta de un sujeto que padece EII al tratamiento con al menos una terapia dirigida contra SMAD7.

La muestra es una muestra de sangre periférica.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la identificación de la modulación de dos o más de los siguientes puede ayudar a determinar la capacidad de respuesta del sujeto al tratamiento:

- 10 un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
- una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+ indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
- 15 una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
- una disminución en la cantidad de linfocitos T FoxP3+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
- una disminución en la cantidad de linfocitos T IFN-gamma+ indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7; y
- 20 una disminución en la cantidad de linfocitos T IL17A+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7.

En una primera realización preferida, la población celular son linfocitos T CCR9+ FoxP3+. En una segunda realización preferida, la población celular son linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+. En una tercera realización preferida, la población celular son linfocitos T CCR9+ IL17A+. En una cuarta realización preferida, la población celular preferida son linfocitos T FoxP3+. En una quinta realización preferida, la población celular son linfocitos T IFN-gamma+. En una sexta realización preferida, la población celular son linfocitos T IL17A+. Otras poblaciones celulares preferidas son cualquiera de linfocitos T FoxP3+ CD103+, linfocitos T CD103+ o linfocitos T integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

De forma adecuada, los procedimientos de la presente invención se pueden llevar a cabo in vitro.

30 La etapa de determinación de la cantidad puede ir precedida de una etapa de obtención de la muestra de un sujeto que padece EII. La muestra se puede obtener mediante extracción de sangre periférica.

De forma adecuada, el sujeto puede recibir al menos una terapia dirigida contra SMAD7 en el momento en que al menos una muestra se obtiene del sujeto.

Preferentemente, en el procedimiento de la invención, la identificación de un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma, una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A, una disminución en la cantidad de linfocitos T FoxP3, una disminución en la cantidad de linfocitos T IFN- $\gamma$  o una disminución en la cantidad de linfocitos T IL17A+ indica que es probable que el sujeto inicie una remisión.

40 De forma adecuada, la cantidad de la al menos una población celular se puede determinar mediante citometría de flujo, con inmunohistoquímica (por ejemplo, ELISA) y/o mediante análisis de ARN/ADN utilizando reactivos/procedimiento conocidos por el experto en la técnica.

Se apreciará que la citometría de flujo y/o la inmunohistoquímica se pueden llevar a cabo usando un anticuerpo seleccionadas entre el grupo que consiste en: un anticuerpo dirigido contra CCR9, un anticuerpo dirigido contra FoxP3, un anticuerpo dirigido contra IFN-gamma y un anticuerpo dirigido contra anti-IL17A.

45 Como alternativa, la determinación de la cantidad de linfocitos se puede llevar a cabo midiendo la cantidad de ARN que codifica al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en: CCR9, FoxP3, IFN-gamma, e IL17A.

Preferentemente, el control significa un nivel de control, que es un nivel inicial de las cantidades de la al menos una población celular obtenida del paciente (de EII) antes de administrar al menos una terapia dirigida contra SMAD7 u obtenida inmediatamente después de administrar al menos una terapia dirigida contra SMAD7. Por inmediatamente después de la administración se entiende en el primer/mismo día tras iniciarse al tratamiento.

50 En un aspecto relacionado, se divulga en el presente documento un procedimiento para el seguimiento de un sujeto que padece EII que está en tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 para determinar si el sujeto es sensible a la terapia, y/o determinar si la terapia debería continuar. El procedimiento incluye: (a) determinar las cantidades de la menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto de EII y que está en tratamiento con una

terapia dirigida contra SMAD7; y (b) comparar las cantidades de la muestra con un nivel de control de al menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+, respectivamente. Un sujeto se puede identificar como sensible (por ejemplo, susceptible) al tratamiento, y/o que probablemente continuará siendo sensible al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control, o si se produce una disminución en las cantidades de al menos uno de los linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+, en una muestra obtenida de un sujeto en comparación con el control. Como alternativa, un sujeto se puede identificar como no sensible (por ejemplo, resistente) al tratamiento y/o que probablemente no seguirá siendo sensible al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3 en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control, o si se produce un aumento en las cantidades de al menos uno de los linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto en comparación con el control.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un procedimiento para identificar sujetos que padecen EII que probablemente sean sensibles, o vayan a ser sensibles, al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 (por ejemplo, un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7). El procedimiento incluye: (a) determinar las cantidades de la menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII; y (b) comparar las cantidades de la muestra con un nivel de control de al menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+, respectivamente. Un sujeto se puede identificar como probablemente sensible, o sensible (por ejemplo, susceptible), al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3 en la muestra obtenida del sujeto en comparación con el control, o si se produce una disminución en las cantidades de al menos uno de los linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto en comparación con el control. Como alternativa, un sujeto se puede identificar como probablemente no sensible, o no sensible (por ejemplo, resistente), al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto en comparación con el control, o si se produce un aumento en las cantidades de al menos uno de los linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto en comparación con el control.

En otras palabras, se proporciona un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta de un sujeto que padece la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) al tratamiento con al menos una terapia dirigida contra SMAD7, comprendiendo el procedimiento:

- (a) determinar una cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII;
- (b) comparar la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra con un nivel de control de linfocitos T CCR9+ FoxP3+,

en el que un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7; y/o

- (a) determinar una cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$  en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII;
- (b) comparar la cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$  en la muestra con un nivel de control de linfocitos CCR9+ IFN- $\gamma$ +,

en el que una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$  indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7; y/o

- (a) determinar una cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII;
- (b) comparar la cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A+ en la muestra con un nivel de control de linfocitos T CCR9+ IL17A+,

en el que una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7; y/o

- (a) determinar una cantidad de linfocitos T FoxP3+ en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII;
- (b) comparar la cantidad de linfocitos T FoxP3+ en la muestra con un nivel de control de linfocitos T FoxP3+,

en el que una disminución en la cantidad de linfocitos T FoxP3+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7; y/o

- (a) determinar una cantidad de linfocitos T IFN- $\gamma$  en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII;
- (b) comparar la cantidad de linfocitos T IFN- $\gamma$  en la muestra con un nivel de control de linfocitos IFN- $\gamma$ +,

en el que una disminución en la cantidad de linfocitos T IFN-gamma+ indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7; y/o

- (a) determinar una cantidad de linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII;
- (b) comparar la cantidad de linfocitos T IL17A+ en la muestra con un nivel de control de linfocitos IL17A+;

5 en el que una disminución en la cantidad de linfocitos T IL17A+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7.

En un aspecto relacionado, se proporciona al menos un anticuerpo contra marcadores celulares de al menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+,  
 10 linfocitos T IFN-gamma y linfocitos T IL17A+, y linfocitos T FoxP3+ CD103+, linfocitos T CD103+ y linfocitos T integrina  $\alpha 4\beta 7+$ , para su uso en un procedimiento diagnóstico realizado en un organismo humano o animal.

De forma adecuada, el procedimiento diagnóstico se puede usar para predecir o vigilar la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene enfermedad inflamatoria del intestino (EII) al tratamiento con al menos una terapia dirigida contra SMAD7 o para determinar la idoneidad de un sujeto que tiene enfermedad inflamatoria del intestino (EII) para el  
 15 tratamiento con al menos una terapia dirigida contra SMAD7, para determinar si es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7.

Un kit que comprende determinados componentes para llevar a cabo los procedimientos de la invención comprende al menos un anticuerpo dirigido contra CCR9, anticuerpo dirigido contra FoxP3, anticuerpo dirigido contra IFN-gamma  
 y/o anticuerpo dirigido contra IL17A para identificar poblaciones celulares o reactivos para detectar la expresión de un  
 20 ARN que codifica una marcadores de proteínas celulares para al menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-gamma+ y linfocitos T IL17A+.

De forma adecuada, el kit comprende además al menos uno de tampones, reactivos e instrucciones detalladas para identificar, clasificar, y contar células, usando tecnología FACS.

De forma deseable, en el kit, el anticuerpo es un anticuerpo primario dirigido contra una proteína CCR9, un anticuerpo primario dirigido contra una proteína FoxP3, y un anticuerpo secundario conjugado con una enzima indicadora, y el kit  
 25 comprende opcionalmente además al menos tampones, reactivos e instrucciones detalladas para identificar, poblaciones celulares usando tecnología IFIC.

De forma adecuada, en el kit, se incluye un anticuerpo de captura dirigido contra una proteína CCR9, un anticuerpo de detección dirigido contra una proteína FoxP3, y/o un anticuerpo secundario conjugado con una enzima indicadora; y  
 30 opcionalmente comprende además tampones, reactivos e instrucciones detalladas para identificar poblaciones celulares usando la tecnología ELISA.

En el presente documento se contempla que los procedimientos, usos y kits divulgados se puedan usar para personalizar el tratamiento con terapias dirigidas contra SMAD7 para sujetos que sean sensibles o vayan a responder a dichas terapias.

También se contempla en el presente documento que los procedimientos, usos, y kits divulgados se puedan usar para  
 35 determinar si es probable que un sujeto inicie una remisión tras padecer EII. Por ejemplo, se puede identificar que un sujeto inicie probablemente una remisión si se produce un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3 en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control, y/o si existe una disminución en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control.

40 Tal como se ha mencionado anteriormente, la muestra obtenida del sujeto es una muestra de sangre periférica, tal como una muestra de células mononucleares aisladas de sangre periférica.

El control, o la muestra de nivel de control puede incluir una muestra de sangre obtenida del sujeto antes del tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7. La muestra de control proporciona un nivel inicial de las cantidades de al menos una de las poblaciones celulares de la invención presentes antes del tratamiento y que se puede usar para  
 45 seguir la respuesta del sujeto al tratamiento. Un control, o la muestra de nivel de control se puede obtener del sujeto el mismo día en que se administra por primera vez la terapia dirigida contra SMAD7 (por ejemplo, el Día 1 de un régimen de tratamiento). En otras realizaciones, un control, o la muestra de nivel de control se puede obtener del sujeto al menos un día antes de iniciar una terapia dirigida contra SMAD7 (por ejemplo, el Día 0 de un régimen de tratamiento).

En determinadas realizaciones, las cantidades de al menos uno de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y linfocitos T IL17A+ en una muestra se determinan mediante citometría de flujo. En otras realizaciones, la determinación se lleva a cabo mediante  
 50 inmunohistoquímica o mediante un ensayo ELISA. Los ensayos FACS, de inmunohistoquímica y ELISA se pueden llevar a cabo usando anticuerpos seleccionados entre el grupo que consiste en al menos un anticuerpo dirigido contra CCR9, un anticuerpo dirigido contra FoxP3, un anticuerpo dirigido contra IFN-gamma, y un anticuerpo dirigido contra IL17A. En otra realización, la cantidad de una población de células se determina midiendo la cantidad de ARN que  
 55

codifica al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en CCR9, FoxP3, IFN-gamma, e IL17A. En determinadas realizaciones, la terapia dirigida contra SMAD7 es un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7. La terapia con un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 puede ser un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9. En una realización ilustrativa, el oligonucleótido de sentido contrario SMAD7 comprende la SEQ ID NO: 6.

Los aspectos y realizaciones anteriores de la invención se entenderán mejor con referencia a las siguientes figuras, descripción detallada y reivindicaciones.

### **Breve descripción de los dibujos**

- 10 La Fig. 1 (A) proporciona la secuencia de ácidos nucleicos de SMAD7 (SEQ ID NO: 1) y (B) proporciona la secuencia de aminoácidos de SMAD7 (SEQ ID NO: 2).  
La Fig. 2 es un diagrama de flujo que muestra los resultados del cribado de solicitantes y la división de pacientes inscritos en cohortes. La Fig. 3 muestra datos demográficos y clínicos relacionados con los pacientes inscritos en el ensayo clínico.
- 15 La Fig. 4 ilustra diferentes tipos de eventos adversos, su frecuencia durante el ensayo clínico, y su asociación con GED0301. La Fig. 5 (A y B) son fotografías de análisis inmunohistoquímicos que muestran que SMAD7 se expresa en los folículos del intestino humano y en las placas de Peyer de un sujeto que padece la enfermedad de Crohn. En B, la flecha muestra la expresión de SMAD7 en el núcleo y el citoplasma. Panel A, aumento del 100x; Panel B, aumento del 200x.
- 20 La Fig. 6 muestra el efecto de PBMC aisladas de pacientes de EC sin estimular (NoT) o tratados con SMAD7 de sentido directo (Directo) u oligonucleótidos GED0301 (AS) sobre el porcentaje de linfocitos IFN- $\gamma$  o IL-17A en las poblaciones (A) CCR9+ o (B)  $\beta$ 7+.  
La Fig. 7 muestra la fracción de linfocitos T que dan un valor positivo en el ensayo de varios marcadores al principio y los días 8 y 28 del ensayo clínico.
- 25 La Fig. 8 muestra gráficos que muestran el porcentaje de linfocitos T (A) IFN- $\gamma$ +, (B) IFN- $\gamma$ + CCR9+, (C) IL-17A+, (D) CCR9+ IL-17A+, (E) FoxP3+, y (F) FoxP3+ CCR9+ T después de 0, 8, 28 y 84 días.  
La Fig. 9 muestra los valores CDAI promedio al principio, día 8, y día 28 del ensayo clínico para cada cohorte, así como los valores CDAI promedio en cada punto temporal para la totalidad del grupo de pacientes.

### **Descripción detallada**

- 30 Se divulgan procedimientos para determinar si un sujeto será sensible (por ejemplo, susceptible o resistente) al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7. Los procedimientos se basan, en parte, en el descubrimiento de que la modulación de determinadas poblaciones de linfocitos T (por ejemplo, aumento de los linfocitos T CCR9+ FoxP3+, reducción de los linfocitos T CCR9+ IFN-gamma positivo (IFN- $\gamma$ +), reducción de los linfocitos T CCR9+ IL17A+, reducción de los linfocitos T FoxP3+, la reducción de los linfocitos IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos IL17A+T) en una muestra de sangre de un sujeto que padece EII, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, se correlacionan con la capacidad de respuesta al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7.

- Como se describe en el presente documento, una o más poblaciones de linfocitos T de un sujeto que padece EII y se ha tratado o está en tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 se vigilan para determinar si el sujeto es sensible al tratamiento y/o para determinar si debe continuar con el tratamiento. En un aspecto, el procedimiento comprende (a) determinar las cantidades de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto de EII y que está en tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7; y (b) comparar las cantidades de la muestra con un nivel de control de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+, respectivamente. Un sujeto se puede identificar como sensible (por ejemplo, susceptible) al tratamiento y/o que probablemente continúe respondiendo al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si existe un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control y/o si hay una disminución en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control.

- 50 Como alternativa, un sujeto se puede identificar como no sensible (por ejemplo, resistente) al tratamiento y/o que probablemente no seguirá siendo sensible al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control, o si existe un aumento en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control.

- 55 En otro aspecto, Una o más poblaciones de linfocitos T de un sujeto que padece EII se vigilan para determinar si es probable que el sujeto responda al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7. El procedimiento incluye: (a) determinar las cantidades de linfocitos T CCR9+ FoxP3+T, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida de un sujeto que padece EII; y (b) comparar las cantidades de la muestra con un nivel de control de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+

IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+, respectivamente. Un sujeto se puede identificar como probablemente sensible, o sensible (por ejemplo, susceptible), al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3 en la muestra obtenida del sujeto en comparación con el control, y/o si existe una disminución en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control.

Como alternativa, un sujeto se puede identificar como probablemente no sensible, o no sensible (por ejemplo, resistente), al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto en comparación con el control, y/o si existe un aumento en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control.

En determinadas realizaciones, la cantidad de linfocitos T FoxP3+ CD103+, linfocitos T CD103+ y/o linfocitos T integrina  $\alpha 4\beta 7$ +, también se puede medir. Los sujetos que son sensibles al tratamiento muestran una cantidad constante de estas poblaciones celulares durante el tratamiento, en comparación con los niveles anteriores al tratamiento.

En otras realizaciones, los procedimientos divulgados se pueden usar para determinar si es probable que un sujeto inicie una remisión tras padecer EII. Por ejemplo, se puede identificar que un sujeto inicie probablemente una remisión si se produce un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3 en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control, y/o si existe una disminución en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una muestra obtenida del sujeto, en comparación con el control.

Por comodidad de uso, algunos términos de la memoria descriptiva, ejemplos, y reivindicaciones adjuntas, se recogen en esta sección.

Como se usa en el presente documento, "CCR9" (receptor 9 de quimiocina (motivo C-C) también conocida como CDw199, GPR-9-6, GPR28, CKR-9 C-C, receptor 28 acoplado a la proteína G) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 10803 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "FoxP3"(secuencia P3 de forkhead también conocida como JM2, AND, DIETER, IPEX, MGC141961, MGC141963, PIDX, XPID) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 50943 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "IFN-gamma" o "IFN- $\gamma$ " (interferón gamma también conocida como IFNG, IFG, IFI) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 3458 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "IL17A" (interleucina 17A también conocida como CTLA8, IL-17, IL-17A, IL17, antígeno 8 asociado a linfocitos T citotóxicos; proteína 8 asociada a linfocitos T citotóxicos; serina esterasa 8 asociada a linfocitos T citotóxicos) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 3605 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "CD103" (antígeno CD103 también conocido como integrina, alfa e; antígeno 1 del linfocito de la mucosa, péptido alfa; HUMINAE, integrina alfa-IEL; integrina alfa-E; antígeno HML-1; y MGC141996) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 3682 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "a4 $\beta$ 7" (integrina, alfa 4 beta 7 también conocida como subunidad beta del receptor de dirección intestinal ITGB7) significa el gen humano codificado por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 3695 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "SMAD7" (también conocido como CRCS3, FLJ16482, MADH7, MADH8, homólogo 7 de MAD (*mothers against decapentaplegic*, Drosophila), homólogo 8 de MAD, SMAD, homólogo 7 de madres contra DPP, homólogo 8 de madres contra DPP) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por mediante el n.º ID Entrez Gene 4092 y variantes alélicas de la misma.

Como se usa en el presente documento, "Índice de actividad de la enfermedad de Crohn" o "CDAI" se refiere a una medida o índice utilizado para evaluar el progreso de los pacientes que padecen EC como se describe en Best y col., GASTROENTEROLOGY, 70:439-44 (1976). Puntuaciones CDAI de 150 o menores están generalmente asociadas con la enfermedad inactiva, y son indicativas de mejores pronósticos que puntuaciones más altas. Los valores mayores de 150 están generalmente asociados con una enfermedad más activa, y valores por encima de 450 están asociados con una enfermedad muy grave. Las puntuaciones CDAI se pueden utilizar para determinar lo bien que un paciente responde a un tratamiento, y se puede utilizar para identificar pacientes en remisión. En determinadas realizaciones, una respuesta clínica de referencia significa que el sujeto muestra una disminución en la puntuación CDAI de al menos 100 puntos. En un ensayo clínico, una puntuación de 150 o menos está generalmente asociada con

la remisión.

5 Como se usa en el presente documento, "índice de actividad de la colitis ulcerosa" o "UCDAI" se refiere a una medida o índice utilizado para evaluar el progreso de los pacientes que padecen CU como se describe en Sutherland y col., Gastroenterology, 92:1894-98 (1987). El UCDAI es una serie de calificadores relacionados con los síntomas de la CU  
 10 incluyendo frecuencia de deposición, sangrado rectal, el aspecto del revestimiento del colon, y una puntuación del médico de la actividad de la enfermedad. Cada uno de estos calificadores recibe un número del 0 al 3, donde 3 es la actividad patológica más elevada. En un ensayo clínico, la remisión se define frecuentemente como una puntuación UCDAI de 1 o menos, y la mejora es una reducción en 3 o más puntos de la puntuación obtenida al principio del ensayo clínico. El UCDAI se puede utilizar en ensayos clínicos para determinar lo bien que un paciente responde a un  
 15 tratamiento, y se puede utilizar para identificar pacientes en remisión. Otros índices habitualmente utilizados para medir la gravedad de la CU en pacientes incluyen los índices Truelove y Witts, el índice de St. Mark, el índice de actividad de colitis ulcerosa simple (SCCAI), el índice Lichtiger, la puntuación de síntomas de colitis ulcerosa (UCSS), y el índice de la clínica Mayo.

20 Como se usa en el presente documento, "respuesta" o "capacidad de respuesta" al tratamiento significa que un sujeto que tiene enfermedad de Crohn muestra: (a) una disminución en la puntuación CDAI, por ejemplo, una disminución en la puntuación CDAI de 20 puntos, 30 puntos, 40 puntos, 50 puntos, 60 puntos, 70 puntos, 80 puntos, 90 puntos, 100 puntos o más; (b) una puntuación CDAI de menos de 150; y/o (c) la inducción de la remisión. Con respecto a un sujeto con CU, "respuesta" o "capacidad de respuesta" al tratamiento significa que el sujeto muestra (a) una disminución en la puntuación UCDAI, por ejemplo, una disminución en la puntuación UCDAI de 1 punto, 2 puntos o más; (b) una  
 25 puntuación CDAI de 1 o menos; y/o (c) la inducción de la remisión.

#### Terapia dirigida contra SMAD7

El tratamientos anti-SMAD7 incluye terapias dirigidas contra SMAD7 (por ejemplo, terapias de sentido contrario dirigidos contra SMAD7 y anticuerpos dirigidos contra SMAD7). Los oligonucleótidos de sentido contrario son  
 30 secuencias de oligonucleótidos cortas complementarias del ARNm mensajero (ARNm), que codifica la proteína diana (por ejemplo, SMAD7). Las secuencias de oligonucleótidos de sentido contrario se hibridan con el ARNm produciendo un híbrido bicatenario que puede llevar a la activación de enzimas catalíticas ubicuas, tal como RNasa H, que degrada las hebras híbridas ADN/ARN evitando de esta forma la traducción de proteínas.

En determinadas realizaciones, un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 puede dirigirse al sitio de destino 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299, y/o 533 (es decir, los nucleótidos 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299, y  
 35 533, respectivamente) del ARNm humano SMAD7 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1).

En determinadas realizaciones, un oligonucleótido de sentido contrario se puede derivar del siguiente oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 5'-GTCGCCCTTCTCCCCGAGC-3' (SEQ ID NO: 3).

Se contempla en el presente documento que un oligonucleótido de sentido contrario dirigido a SMAD7 puede comprender una estructura mixta en la que los restos citosina de un par CpG se sustituye por una 5'-metilcitosina (abreviada como Me-dC). También se pueden situar enlaces metilfosfonato en los extremos 5' y/o 3' de un oligonucleótido de sentido contrario (abreviado como MeP).  
 35

Las terapias con un oligonucleótido de sentido contrario dirigido a SMAD7 incluyen, pero no se limita a 5'-GTXYCCCCTTCTCCCXGAG-3' (SEQ ID NO: 4), en la que X es un nucleótido que comprende una base nitrogenada seleccionada entre el grupo que consiste en citosina y 5-metilcitosina o un nucleósido de  
 40 2'-O-metilcitosina, y en la que Y es un nucleótido que comprende una base nitrogenada seleccionada entre el grupo que consiste en guanina y 5-metilguanina o un nucleósido de 2'-O-metilguanina, siempre que al menos uno de los nucleótidos X o Y comprenda una base nitrogenada metilada;

5'-GTXGCCCTTCTCCCXGAG-3' (SEQ ID NO: 5), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidin 5'-monofosfato;  
 45 5'-GTXGCCCTTCTCCCXGAGC-3' (SEQ ID NO: 6), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidin 5'-monofosfato;  
 5'-ZTXGCCCTTCTCCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 7), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidin 5'-monofosfato y Z es metilfosfonato de 2'-desoxiguanosina;

5'-ZTXGCCCTTCTCCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 8), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidin 5'-monofosfato y Z es metilfosfonato de 2'-desoxiguanosina;

50 5'-GTXGCCCTTCTCCCXGAG-3' (SEQ ID NO: 9), en la que X es 5-metil 2'-desoxicitidin 5'-monofosfato. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 7.807.818 y 6.159.697).

En una realización ilustrativa, la terapia dirigida contra SMAD7 de sentido contrario se puede formular en un transportador farmacéuticamente aceptable y se puede administrar por vía oral a un sujeto que padece EII.

#### Muestra de sangre

55 Se puede obtener una muestra de sangre periférica de un sujeto usando técnicas bien conocido en la materia. Las muestras de sangre pueden incluir células mononucleares de sangre periférica (PMBC) o sangre completa con agotamiento de RBC. PMBC se puede aislar a partir de muestras de sangre completa usando procedimientos de

centrifugación con densidad diferente (por ejemplo, gradiente de densidad en Ficoll). Por ejemplo, sangre completa (por ejemplo, sangre completa anticoagulada) se distribuye sobre el medio de separación y se centrifuga. Al finalizar la etapa de centrifugación, las siguientes capas aparecen a la vista, observadas de arriba abajo: plasma/plaquetas, PBMC, medio de separación y eritrocitos/granulocitos. La capa PBMC se puede recoger y lavar para eliminar contaminantes.

#### Muestra de tejido

Una muestra de tejido de un sujeto (por ejemplo, una muestra de tejido obtenida del intestino delgado y/o del intestino grueso de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que padece EC o CU), se puede usar como fuente de células, fuente de ARN, fuente de proteínas, o una fuente de secciones finas para inmunohistoquímica (IHQ) para medir la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN-γ+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-γ+ y/o linfocitos T IL17A+ en la muestra. La muestra de tejido se puede obtener usando instrumentos y procedimientos de biopsia convencionales. La biopsia endoscópica, la biopsia con escisión y la biopsia con incisión son ejemplos de procedimientos médicos reconocidos que puede usar el experto en la técnica para obtener muestras de tejido gastrointestinal. La muestra de tejido debe ser lo suficientemente grande como para proporcionar un número suficiente de células, ARN, proteína, o secciones finas para medir el nivel de expresión del gen marcador (por ejemplo, CCR9, FoxP3, IFN-γ, y/o IL17A) o visualizar las células individuales mediante citometría de flujo, IHC, o ELISA, por ejemplo, el nivel de expresión de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN-γ+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-γ+ y/o IL17A+.

La muestra de tejido puede estar en cualquier forma suficiente para clasificación celular, extracción de ARN, extracción de proteínas, o preparación de secciones finas. De acuerdo con ello, la muestra de tejido puede ser reciente, estar conservada mediante técnicas criogénicas adecuadas, o conservada mediante técnicas no criogénicas. Un procedimiento normalizado para manipular especímenes de biopsia clínica es fijar la muestra de tejido en formalina y, a continuación, incluirla en parafina. Las muestras de esta forma se conocen normalmente con tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE). Las técnicas adecuadas de preparación de tejidos para análisis posterior son bien conocidas del experto en la técnica.

#### Citometría de flujo

Las poblaciones de células se pueden clasificar en función de marcadores superficiales mediante citometría de flujo (por ejemplo, análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACTS)). Los procedimientos para clasificar y contar células mediante análisis FACS están bien descritas y son conocidas del experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Robinson "Current Protocols in Cytometry" John Wiley & Sons Inc., Nueva York. En general, las células obtenidas a partir de una muestra de sangre se pueden preparar en una suspensión monocelular. A continuación las muestras se marcan con una etiqueta fluorescente (por ejemplo, un anticuerpo marcado de forma fluorescente con un marcador de la superficie celular presente en la población o poblaciones de células a identificar). La fluorescencia puede ser un director indirecto. Para la fluorescencia directa, una etiqueta fluorescente (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, u otro fluorocromo) está unido covalentemente unido a un anticuerpo primario. Para la fluorescencia indirecta, el anticuerpo primario que se une a un marcador presente en la superficie celular no está marcado con una etiqueta fluorescente. El anticuerpo primario se une a la superficie de la célula de la población celular diana. El anticuerpo no unido se elimina en un paso de lavado. Se añade un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente que se une al anticuerpo primario, y cualquier anticuerpo no unido se elimina en un paso de lavado.

El análisis FACS se puede llevar a cabo sobre células vivas o fijadas. Los instrumentos FACS están disponibles para los expertos en la técnica e incluyen FACScan, FACStar Plus, y FACSCalibur (Becton-Dickinson). Programas informáticos de análisis FACS están disponibles para los expertos en la técnica e incluyen FlowJo, CellQuest Pro (Becton-Dickinson), y WinMDI (interfaz de documento múltiple de Windows para citometría de flujo).

Un experto en la técnica apreciará que el análisis FACS se puede llevar a cabo con un solo anticuerpo o con múltiples anticuerpos para identificar, contar, y clasificar diferentes poblaciones celulares. Por ejemplo, se puede detectar una marca de población celular y clasificarse a partir de las células que no expresan el marcador especificado (por ejemplo, se pueden identificar poblaciones de linfocitos T FoxP3+ mediante un anticuerpo específico de FoxP3; se pueden identificar poblaciones de linfocitos T IFN-γ+ mediante un anticuerpo específico de IFN-γ; y se pueden identificar poblaciones de linfocitos T IL17A+ mediante un anticuerpo específico de IL17A).

Un instrumento FACS provisto de múltiples láseres y detectores de fluorescencia permite el uso de etiquetas de anticuerpos múltiples y pueden identificar con precisión una población de células diana. Para conseguir la detección, las células se pueden marcar con múltiples anticuerpos, cada uno de ellos marcados con una etiqueta fluorescente diferente. Por ejemplo, una muestra de sangre se puede marcar simultáneamente con un anticuerpo de ratón marcado con APC dirigido contra CCR9 humana y un anticuerpo marcado con PE dirigido contra FoxP3 humana para la detección de poblaciones de linfocitos T CCR9+ FoxP3+.

Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar para determinar poblaciones de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, poblaciones de linfocitos T CCR9+ IFN-γ+, y/o poblaciones de linfocitos T CCR9+ IL17A+ mediante análisis FACS incluyen anticuerpos con marca fluorescente dirigidos contra CCR9 humana, tales como anticuerpo de ratón marcado

5 con alofococianina (APC) dirigido contra CCR9 humana (R&D Systems, números de catálogo FAB179A y FAB1791A), anticuerpo de ratón marcado con Alexa Fluor® 647 dirigido contra CCR9 humana (BD Pharmigen, número de catálogo 557975), anticuerpo de ratón marcado con fluoresceína dirigido contra CCR9 humana (R&D Systems, número de catálogo FAB 179F), y anticuerpo de ratón marcado con ficoeritrina (PE) dirigido contra CCR9 humana (R&D Systems, número de catálogo FAB 179P).

10 Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar para determinar poblaciones de linfocitos T FoxP3+ y poblaciones de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ mediante análisis FACS incluyen anticuerpos con marca fluorescente dirigidos contra FoxP3 humana, tales como anticuerpo marcado con ficoeritrina (PE) dirigido contra FoxP3 humana (Miltenyi Biotec, número de catálogo 130-093-014), anticuerpo marcado con alofococianina (APC) dirigido contra FoxP3 humana (Miltenyi Biotec, número de catálogo 130-093-013), anticuerpo de ratón marcado con Alexa Fluor® 647 dirigido contra FoxP3 humana (BD Pharmigen, número de catálogo 560045), anticuerpo de ratón marcado con Alexa Fluor® 488 dirigido contra FoxP3 humana (AbD Serotec, número de catálogo MCA2376A488), y anticuerpo de ratón marcado con FITC dirigido contra FoxP3 humana (Abeam, número de catálogo ab93512).

15 Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar para determinar poblaciones de linfocitos T IFN-gamma+ y poblaciones de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+ mediante análisis FACS incluyen anticuerpos con marca fluorescente dirigidos contra IFN-gamma humana tal como anticuerpo de ratón marcado con FITC dirigido contra IFN-gamma humana (Abeam, número de catálogo ab47344), anticuerpo de ratón marcado con ficoeritrina (PE) dirigido contra IFN-gamma humana (Abeam, número de catálogo ab47345, y R&D Systems, número de catálogo IC285P), y anticuerpo de ratón marcado con fluoresceína dirigido contra IFN-gamma humana (R&D Systems, número de catálogo IC285F).

25 Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar para determinar poblaciones de linfocitos T IL17A+ y poblaciones de linfocitos T CCR9+ IL17A+ mediante análisis FACS incluyen anticuerpos con marca fluorescente dirigidos contra IL17A humana tales como anticuerpo de ratón marcado con Alexa Fluor 647 dirigido contra IL17A humana (eBioscience, número de catálogo 51-7179-42), anticuerpo de ratón marcado con ficoeritrina (PE) dirigido contra IL17A humana (R&D Systems, número de catálogo IC3171P), y anticuerpo de ratón marcado con alofococianina (APC) dirigido contra IL17A humana (R&D Systems, número de catálogo IC3171A).

30 Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar para determinar poblaciones de linfocitos T CD103+ y poblaciones de linfocitos T FoxP3+ CD103+ mediante análisis FACS incluyen anticuerpos con marca fluorescente dirigidos contra CD103 humana tales como anticuerpo de ratón marcado con ficoeritrina dirigido contra el anticuerpo monoclonal E dirigido contra integrina alfa humana (Abeam, número de catálogo ab33267) y anticuerpo monoclonal de ratón marcado con FITC dirigido contra CD103 humana (AbD Serotec, número de catálogo MCA1416FT).

Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar para determinar poblaciones de linfocitos T  $\alpha 4\beta 7$ + mediante análisis FACS incluyen anticuerpos con marca fluorescente dirigidos contra  $\alpha 4\beta 7$  humana, todos disponibles de BD Biosciences.

35 En otra realización, la cantidad de una población de células se determina clasificando las células mediante citometría de flujo y midiendo a continuación la cantidad de ARN que codifica al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en CCR9, FoxP3, IFN-gamma, e IL17A a partir de la población clasificada. Los procedimientos para el aislamiento y cuantificación del ARN son bien conocidos en la técnica.

#### Inmunohistoquímica

40 También se pueden determinar diferentes poblaciones celulares mediante inmunohistoquímica (IHC). Específicamente, el número de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ en una población de células dada se puede determinar (por ejemplo, visualizarse) mediante IHC. Por ejemplo, someter a ensayo una población de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ mediante IHC requiere, por ejemplo, al menos un anticuerpo dirigido contra una proteína CCR9, *por ejemplo*, al menos un anticuerpo contra CCR9, al menos un anticuerpo dirigido contra un anticuerpo de FoxP3, *por ejemplo*, al menos un anticuerpo contra FoxP3. El anticuerpo dirigido contra CCR9 y el anticuerpo dirigido contra FoxP3+ se pueden marcar con etiquetas diferentes, *por ejemplo*, diferentes etiquetas fluorescentes. El anticuerpo dirigido contra CCR9 y el anticuerpo dirigido contra FoxP3+ pueden ser anticuerpos diferentes, *por ejemplo*, ratón, rata, un conejo, *etc.*, así, permitiendo la detección diferencial mediante anticuerpos secundarios marcados, por ejemplo, fluorescentes.

50 Para los estudios IFIC, por ejemplo, las muestras de tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina se pueden cortar en secciones, *por ejemplo*, secciones de 5 micrómetros. Normalmente, los cortes de tejidos se tratan inicialmente de tal forma como medio de recuperar la estructura antigénica de las proteínas que se fijaron en el procedimiento inicial de recogida y conservación del material tisular. A continuación, los cortes se bloquean para impedir la unión no específica con los anticuerpos de detección. La presencia de, por ejemplo, las proteínas CCR9, FoxP3, IFN-gamma, y/o IL17A, se detecta a continuación por la unión de los anticuerpos anti-CCR9, anti-FoxP3, anti-IFN-gamma, y/o anti-IL17A a las correspondientes proteínas. El anticuerpo de detección (primario) está unido a una etiqueta fluorescente, de forma tanto directa como indirecta, por ejemplo, mediante un anticuerpo o polímero secundario que reconoce específicamente el anticuerpo de detección (primario). Normalmente, los cortes de tejido se

lavan y se bloquean con una proteína no específica como la albúmina de suero bovino entre etapas. Las muestras se pueden contrateñir con hematoxilina y/o eosina.

5 Los anticuerpos dirigidos contra CCR9 adecuados para IFIC están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra CCR9 humana de Enzo Life Sciences (número de catálogo ALX-210-847-C200), un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CCR9 humana de GenWay Biotech (número de catálogo 18-461-10269-0.05 ml), un anticuerpo CCR9 de Novus Biologicals (número de catálogo NBP1-44201), y un anticuerpo policlonal de ratón dirigido contra CCR9 humana de R&D Systems (número de catálogo MAB179).

10 Los anticuerpos dirigidos contra FoxP3 adecuados para IFIC están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra FoxP3 de Abbiotec (número de catálogo 250655), un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra FoxP3 humana de Abgen (número de catálogo AF1438a), un anticuerpo policlonal de ratón dirigido contra FoxP3 humana de LifeSpan BioSciences (número de catálogo LS-C51576-40), y un anticuerpo policlonal de ratón dirigido contra FoxP3 humana de MBL International (número de catálogo M120-3).

15 Los anticuerpos dirigidos contra IFN-gamma adecuados para IFIC están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IFN-gamma de Abbiotec (número de catálogo 250707), un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IFN-gamma humana de BioLegend (número de catálogo 506512), un anticuerpo monoclonal de cabra dirigido contra IFN-gamma humana de R&D Systems (número de catálogo AF-285-NA), y un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IFN-gamma humana de Cell Sciences (número de catálogo CP2008).

20 Los anticuerpos dirigidos contra IL17A adecuados para IFIC están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IL17A humana de Proteintech Group (número de catálogo 13082-1-AP) y un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IL17 humana de R&D Systems (número de catálogo AF-317-NA).

25 Los anticuerpos dirigidos contra CD103 adecuados para IFIC están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal E de ratón dirigido contra integrina alfa humana de Abeam (número de catálogo ab33266) y un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD103 humana de AbD Serotec (número de catálogo P38570).

Los anticuerpos dirigidos contra integrina  $\alpha 4\beta 7$  están comercialmente disponibles de BD Biosciences.

#### Enzimoimmunoanálisis de adsorción

30 En algunas realizaciones, las poblaciones de células se pueden identificar mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Específicamente, linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ + y/o linfocitos T IL17A+ de una población de células dada se puede determinar mediante, por ejemplo, un ELISA celular. Por ejemplo, someter a ensayo una población de linfocitos CCR9+ FoxP3+ mediante ELISA requiere al menos un anticuerpo contra una proteína CCR9, *por ejemplo*, al menos un anticuerpo contra CCR9, al menos un anticuerpo dirigido contra una proteína FoxP3, *por ejemplo*, al menos un anticuerpo contra FoxP3, y/o al menos un anticuerpo secundario, por ejemplo, al menos un anticuerpo secundario marcado. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo dirigido contra CCR9 y el anticuerpo dirigido contra FoxP3 puede estar no marcados o bien estar marcados con etiquetas diferentes, *por ejemplo*, diferentes etiquetas fluorescentes. En determinadas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra CCR9 y el anticuerpo dirigido contra FoxP3+ son anticuerpos diferentes, *por ejemplo*, ratón, rata, un conejo, *etc.*, así, permitiendo la detección diferencial mediante anticuerpos secundarios marcados, por ejemplo, fluorescentes o unidos a enzimas.

40 La realización de una prueba ELISA, *por ejemplo*, un ELISA celular, requiere al menos un anticuerpo de captura, al menos un anticuerpo de detección, y/o al menos un anticuerpo secundario unido a una enzima o marcado fluorescente. Por ejemplo, someter a ensayo una población de linfocitos CCR9+ FoxP3+ mediante la prueba ELISA celular puede requerir un anticuerpo policlonal dirigido contra CCR9 como el anticuerpo de captura. El anticuerpo policlonal dirigido contra CCR9 se inmoviliza sobre un soporte sólido tal como una placa de microtitulación de poliestireno. Las células obtenidas a partir de una muestra de sangre se añaden a continuación, y se deja formar el complejo con el anticuerpo unido. Las células no unidas se eliminan con un lavado. Un anticuerpo de detección, *por ejemplo*, un anticuerpo monoclonal dirigido contra FoxP3, se añade a lo anterior y se deja unir a las células. El anticuerpo de detección está unido a una enzima, de forma tanto directa como indirecta, *por ejemplo*, mediante un anticuerpo secundario que reconoce específicamente el anticuerpo de detección. Normalmente, entre cada una de las etapas, la placa, con las células unidas, se lava con un tampón de lavado, *por ejemplo*, una solución detergente suave. Los protocolos ELISA también incluyen una o más etapas de bloqueo, que implican el uso de una proteína de unión no específica tal como una albúmina de suero bovino para bloquear la unión no específica de reactivos proteicos a la placa. Tras una etapa de lavado final, la placa se revela mediante la adición de un sustrato enzimático adecuado, para producir una señal visible, que indica la cantidad de linfocitos CCR9+ FoxP3+ de la muestra. El sustrato puede ser, *por ejemplo*, un sustrato cromogénico o un sustrato fluorogénico.

55 Los procedimientos ELISA, los reactivos y los equipos, son bien conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles.

Están comercialmente disponibles muchos anticuerpos dirigidos contra CCR9 adecuados para ELISA, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal dirigido contra CCR9 de Abeam (número de catálogo ab38567), un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra CCR9 humana de Enzo Life Sciences (número de catálogo ALX-210-847-C200), y un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CCR9 humana de Novus Biologicals (número de catálogo H00010803-D01P).

Están comercialmente disponibles muchos anticuerpos dirigidos contra FoxP3 adecuados para ELISA, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra FoxP3 de Abbiotec (número de catálogo 250655), un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra FoxP3 humana de Abgen (número de catálogo AF1438a), y un anticuerpo policlonal de ratón dirigido contra FoxP3 humana de LifeSpan BioSciences (número de catálogo LS-C82119-100).

Están comercialmente disponibles muchos anticuerpos dirigidos contra IFN-gamma adecuados para ELISA, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IFN-gamma de Abbiotec (número de catálogo 250707), un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IFN-gamma humana de BioLegend (número de catálogo 507502), y un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IFN-gamma humana de Cell Sciences (número de catálogo CP2008).

Los anticuerpos dirigidos contra IL17A adecuados para ELISA están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IL17A humana de Proteintech Group (número de catálogo 13082-1-AP) y un anticuerpo monoclonal de cabra dirigido contra IL17A humana de R&D Systems (número de catálogo MAB317).

Los anticuerpos dirigidos contra CD103 adecuados para ELISA están comercialmente disponibles, tales como, por ejemplo, un anticuerpo E de conejo dirigido contra integrina alfa humana de Novus Biologicals (número de catálogo 36520002).

Los anticuerpos dirigidos contra integrina  $\alpha 4\beta 7$  están comercialmente disponibles de BD Biosciences.

En otra realización, la cantidad de una población de células se determina clasificando las células mediante citometría de flujo y midiendo a continuación la cantidad de ARN que codifica al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en CCR9, FoxP3, IFN-gamma, e IL17A a partir de la población clasificada. Los procedimientos para el aislamiento y cuantificación del ARN son bien conocidos en la técnica.

#### Muestras de control

Una muestra de control puede incluir una muestra de sangre obtenida del sujeto antes del tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7. La muestra de control proporciona un nivel inicial para seguir la evolución de un sujeto en tratamiento. Una muestra de control se puede obtener del sujeto el mismo día en que se administra por primera vez la terapia dirigida contra SMAD7 (por ejemplo, el Día 1 de un régimen de tratamiento). En otras realizaciones, una muestra de control se puede obtener del sujeto al menos un día antes de iniciar una terapia dirigida contra SMAD7 (por ejemplo, el Día 0 de un régimen de tratamiento). Como alternativa, una muestra de control se puede obtener de un sujeto 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más antes de iniciar una terapia dirigida contra SMAD7. Por ejemplo, la regulación en exceso o defecto de determinadas muestras celulares se puede medir antes del tratamiento (por ejemplo, una muestra del control), durante el tratamiento, y/o después del tratamiento para seguir la respuesta del sujeto al tratamiento, por ejemplo, una terapia dirigida contra SMAD7.

En algunas realizaciones, se puede establecer un nivel de control para un sujeto basándose en la vigilancia a largo plazo de determinadas poblaciones de células en el sujeto. En tales casos, se contempla que un sujeto puede someterse a varios ciclos de tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7. La cantidad de una determinada población de células detectada después de múltiples ciclos de tratamiento se puede comparar con un nivel de control anterior para el sujeto para determinar si el sujeto ha respondido al tratamiento y/o es probable que responda a un tratamiento posterior con una terapia dirigida contra SMAD7. En otras realizaciones, se puede establecer un nivel de control o inicial para un sujeto basándose en una medición promedio de una determinada población de células determinada a partir de múltiples muestras iniciales obtenidas con el tiempo (por ejemplo, obtenidas durante varias semanas, meses, o años). De acuerdo con ello, cualquier prueba o ensayo realizado como se divulga en el presente documento se puede comparar con un nivel de control anterior o establecido, y puede que no sea necesario obtener una nueva muestra de control de un sujeto para la comparación, por ejemplo, si el sujeto está recibiendo más de un ciclo de tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7.

#### Interpretación de datos

La capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 se puede interpretar con respecto a la muestra del control obtenida del sujeto antes del tratamiento. un sujeto se puede identificar como sensible al tratamiento (por ejemplo, susceptible o con respuesta probable) al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto, o una disminución en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$  y/o linfocitos T IL17A+ en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con la muestra

del control. La muestra se puede obtener en el día 8 o posterior al inicio de la terapia para determinar la capacidad de respuesta al tratamiento. En algunas realizaciones, la muestra se puede obtener a 28, 56, y/o 84 días y/o más. En otras realizaciones, la muestra se puede obtener después del día 8, por ejemplo, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, y/o un año o más después del inicio de la terapia para controlar la capacidad de respuesta al tratamiento.

Como alternativa, un sujeto se puede identificar como resistente al tratamiento (por ejemplo, incapacidad de respuesta o sin respuesta probable) al tratamiento con una terapia dirigida contra SMAD7 si se produce una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ en la muestra obtenida del sujeto, o un aumento en las cantidades de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, y/o linfocitos T CCR9+ IL17A+ en la muestra obtenida del sujeto, en comparación con la muestra del control. La muestra se puede obtener en el día 8 o posterior al inicio de la terapia para determinar la resistencia al tratamiento. En algunas realizaciones, la muestra se puede obtener el día 28, 56, 84 o más días después del tratamiento inicial. En otras realizaciones, la muestra se puede obtener después del día 8, *por ejemplo*, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, y/o un año o más después del inicio de la terapia para controlar la capacidad de respuesta al tratamiento.

### 15 Kits de ensayo

Se describe un kit de ensayo que comprende determinados componentes para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento. Un kit de ensayo puede aumentar la comodidad, velocidad y reproducibilidad del comportamiento de los ensayos divulgados. Por ejemplo, un kit de ensayo basado en FACS ilustrativo puede incluir anticuerpos para identificar, clasificar, y contar células, *por ejemplo*, anticuerpos dirigidos contra CCR9, anticuerpos dirigidos contra FoxP3, anticuerpos dirigidos contra anti-IFN y/o anticuerpos dirigidos contra anti-IL17A. El kit de ensayo puede contener no solamente anticuerpos, sino también tampones, reactivos e instrucciones detalladas para identificar, clasificar, y contar células, usando tecnología FACS. El kit puede incluir también un protocolo de ensayo y todos los componentes fungibles necesarios para el ensayo, salvo la muestra o muestras de células y tejidos.

un kit de ensayo basado en IHC ilustrativo puede contener materiales para determinar las poblaciones celulares mediante IHC. Un kit de IHC, por ejemplo, puede contener un anticuerpo primario dirigido contra una proteína CCR9, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón dirigido contra CCR9 humana, y un anticuerpo primario dirigido contra una proteína FoxP3, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón dirigido contra FoxP3 humana, y un anticuerpo secundario conjugado con una enzima indicadora, *por ejemplo*, peroxidasa de rábano picante. El kit de ensayo puede contener no solamente anticuerpos, sino también tampones, reactivos e instrucciones detalladas para identificar, poblaciones celulares usando tecnología IHC.

un kit de ensayo basado en ELISA ilustrativo puede contener materiales para determinar las poblaciones celulares mediante ELISA. Un kit para prueba ELISA celular, por ejemplo, puede contener un anticuerpo de captura dirigido contra una proteína CCR9, *por ejemplo*, un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CCR9 humana, y un anticuerpo de detección contra una proteína FoxP3, *por ejemplo*, un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra FoxP3 humana, y/o un anticuerpo secundario conjugado con una enzima indicadora, *por ejemplo*, peroxidasa de rábano picante. En otras realizaciones, el kit de ensayo contiene no solamente anticuerpos, sino también tampones, reactivos e instrucciones detalladas para identificar poblaciones celulares usando la tecnología ELISA.

### Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no deben considerarse como limitantes del alcance o el contenido de la invención en forma alguna.

#### **Ejemplo 1: Ensayo Clínico en fase I para evaluar la seguridad y eficacia de un tratamiento con una molécula de sentido contrario dirigida contra SMAD7 en pacientes con EC**

Quince pacientes con EC activa se inscribieron en un ensayo clínico en fase I para evaluar la seguridad y eficacia de una terapia con una molécula de sentido contrario dirigida contra SMAD7 para el tratamiento de la EC. Los pacientes se seleccionaron inicialmente entre un grupo de 21 solicitantes y los inscritos se asignaron a una de tres cohortes de igual tamaño (Fig. 2). No había diferencias significativas en las características demográficas o clínicas entre los pacientes inscritos. Sin embargo, los pacientes de la cohorte 1 tenían una duración de la enfermedad más prolongada, en comparación con los pacientes de las otras dos cohortes, y los pacientes de las cohortes 1 y 2 se habían sometido con mayor frecuencia a resección intestinal en comparación con los pacientes de la cohorte 3 (Fig. 3). Los pacientes recibieron 40 mg/día (N= 5; Cohorte 1); 80 mg/día (N=5; Cohorte 2); o 160 mg/día (N=5; Cohorte 3) de GED-0301, un oligonucleótido de sentido contrario Smad7 (GTGXCCCTTCTCCXGCGAGC, en la que X es 5-metil-2'-desoxicitidin 5' monofosfato (5-Me-dC) (SEQ ID NO: 6)) durante 7 días.

Los pacientes que cumplen todos los criterios siguientes fueron candidatos para su inclusión: 1.) Consentimiento informado por escrito, firmado y fechado personalmente por el paciente antes de cualquier procedimiento relacionado con el estudio; 2.) Pacientes de sexo masculino o femenino entre 18-45 años de edad; 3.) Pacientes femeninas no en edad fértil; las pacientes femeninas en edad fértil con un resultado negativo en la prueba de embarazo durante la sección inicial, y que utilicen un procedimiento anticonceptivo eficaz durante el estudio; 4.) Los pacientes con EC activa en el momento de la visita de selección, definida como una puntuación CDAI >220 y <400 durante al menos una

semana antes de la inscripción; 5.) EC limitada al íleon final y/o colon derecho; 6.) sin tratamiento con anti TNF- $\alpha$ , otras sustancias biológicas, inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, mercaptopurina, metotrexato), en los 90 días anteriores a la inscripción; 7.) Pacientes con resistencia a esteroides o corticodependencia; y 8.) Capacidad para comprender y cumplir con los procedimientos y restricciones del estudio.

- 5 Los sujetos se excluyeron del estudio si cumplían alguno de los siguientes criterios: 1.) Mujeres embarazadas o lactantes; 2.) Pacientes con EC en estómago y/o intestino delgado proximal, o pacientes con lesiones confinadas al colon transversal y/o izquierdo; 3.) Uso en los 90 días anteriores a la primera dosis de inmunomoduladores y sustancias biológicas (por ejemplo, azatioprina, mercaptopurina, metotrexato, infliximab, adalimumab, natalizumab); 4.) Presencia de complicaciones locales (por ejemplo, abscesos, estructuras y fístulas), displasias y neoplasias, y manifestaciones extraintestinales; 5.) Dilatación endoscópica con globo anterior, estricturaplastia o resección quirúrgica de constricciones por EC; 6.) Pacientes sometidos a proctocolectomía; 7.) Cualquiera de las siguientes alteraciones en valores de laboratorio: APTT > 1,5 x límite superior normal del laboratorio clínico (ULN); recuento de plaquetas <100.000/mm<sup>3</sup>; creatinina sérica >1,5 x ULN; bilirrubina total >1,5 x ULN (salvo el síndrome de Gilbert); AST y ALT >1,5 x ULN; intervalo QTc >450 ms para hombres y >470 ms para mujeres; 8.) Antecedentes médicos actuales o relevantes de enfermedad física o psiquiátrica grave, severa o inestable (aguda o progresiva), incluidas las infecciones, neoplasias, trastornos médicos que pueden requerir tratamiento (por ejemplo, insuficiencia renal o hepática) o que hace que el sujeto probablemente no pueda completar el estudio en su totalidad, o cualquier dolencia que suponga un riesgo indebido derivado de la medicación o los procedimientos del estudio; 9.) Pacientes que fuman o que consumen productos de tabaco de cualquier otra forma; 10.) Antecedentes de alcoholismo o drogodependencia en el último año; 11.) Pacientes que presentan potencialmente poca fiabilidad (por ejemplo, alteraciones mentales); 12.) Hiper capacidad de respuesta conocida a oligonucleótidos o cualquier ingrediente de los productos del estudio; 13.) Pacientes que usaron otro agente en investigación, o que participaron en un ensayo clínico en los 12 meses anteriores a la aleatorización.

25 La seguridad del GED-0301 se evaluó diariamente teniendo en cuenta los siguientes puntos: exploraciones físicas, peso corporal (kg), signos vitales (presión arterial sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal), ECG (12 puntas), recopilación de EA y EAG. Las muestras de sangre se analizaron para determinar: hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos, total y diferencial, MCH, recuento de plaquetas, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, creatinina, BUN, glucosa, ácido úrico, proteínas, bilirrubinas, fosfatasa alcalina, CPK, AST, ALT,  $\gamma$ -GT, Na, K, colesterol y triacilglicéridos, activación del complemento (mediante la supervisión de BB, C5a y C3a). También se realizó un análisis de orina (pH, cetonas, leucocitos, proteína, glucosa, exploración citobacteriológica).

35 No se observaron anomalías en los valores de laboratorio ni cambios en los signos vitales de ningún paciente durante el estudio. No se documentó un aumento significativo en los niveles séricos de los factores del complemento. Todas las muestras de las tres cohortes proporcionaron valores por debajo del límite de cuantificación inferior, salvo una muestra de un solo paciente de la cohorte 1 (paciente 5, día 7, 6 horas), que proporciona un resultado de 11,2 ng/ml de GED0301.

40 No se registraron eventos adversos graves. Se registraron veinticinco efectos adversos (EA) en 11 pacientes, y los eventos más normales se calificaron como leves (Fig. 4). Los investigadores clasificaron los EA como no relacionados con el tratamiento en 14 (56 %) de los casos. Once de estos 14 EA, incluidas anomalías en valores de laboratorio, se registraron en 8 pacientes antes de la administración del fármaco. Se consideró que era improbable que los EA estuvieran relacionados con el fármaco del estudio en 12 casos (48 %), y probablemente relacionados con el fármaco del estudio en un caso (4 %). Este fue un aumento en el recuento de triacilglicéridos séricos durante la administración del fármaco del estudio. No se apreció una relación aparente entre la dosis y la respuesta en los EA derivados del tratamiento. Un paciente de la cohorte 2 tuvo una leve recaída de la enfermedad en el día 84, mientras que otro paciente de la cohorte 3 experimentó dos episodios de dolor abdominal y vómitos, que requirieron tratamiento diario con esteroides. Un paciente tratado con 80 mg/día experimentó una elevada presión diastólica en el día 1, pocos minutos después de la administración de GED0301 y una inversión de la onda T (en puntas precordiales) el día 84. Después de un cuidadoso examen por cardiólogos, ambos EA se consideraron secundarios al tratamiento con budesonida recibido por el paciente durante los últimos meses. El día 31 un paciente con antecedentes de enfermedad alérgica registró una rinitis alérgica. Este EA se resolvió muy rápidamente después de la administración de un compuesto antihistamínico.

55 Un comité de seguridad independiente (con experiencia en toxicología, farmacovigilancia y enfermedad inflamatoria del intestino clínica) se reunió para supervisar y evaluar los parámetros de seguridad. También se tomaron muestras de sangre el día 1 y el día 7 a las 0, 2, 6, 12 y 24 horas después de la dosificación, para análisis farmacocinético y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La eficacia del tratamiento se estableció mediante la evaluación en diferentes puntos temporales (por ejemplo, día 8, 28, 60, y 90) el número de pacientes que cumplieron los criterios de remisión (CDAI <150) o consiguieron una respuesta clínica definida como una disminución de 70 puntos o más, desde el valor inicial de la puntuación CDAI.

#### **Ejemplo 2: SMAD7 se expresa en los folículos del intestino humano y en las placas de Peyer**

60 Se dispuso de muestras intestinales de cuatro pacientes de EC que se han sometido a resección quirúrgica de la

enfermedad crónicamente activa y que respondieron mal al tratamiento médico. Estas muestras se usaron para el análisis de SMAD7 por inmunohistoquímica.

Se cortaron secciones de tejido de pacientes con EC, se desparafinizaron, y se deshidrataron en xileno y etanol. Con el fin de la recuperación del antígeno, los cortes se incubaron en un horno microondas durante 10 minutos en tampón citrato 0,01 M, pH 6. Para bloquear la peroxidasa endógena, los cortes se incubaron a continuación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. La incubación con un anticuerpo de ratón dirigido contra SMAD7 humana se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con suero salino tamponado con Tris, los cortes se incubaron con un anticuerpo de conejo dirigido contra el anticuerpo de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células inmunorreactivas se visualizaron mediante adición de diaminobenzadina como sustrato, y se contratiñeron levemente con hematoxilina. Como control negativo los cortes de tejido se procesaron usando antisuero de conejo normal purificado en lugar del anticuerpo primario contra SMAD7.

Estos estudios mostraron que SMAD7 se expresa en los folículos del intestino humano y en las placas de Peyer (Fig. 5). Estas observaciones sugieren que la regulación por defecto o la inactivación génica de SMAD7 con la SEQ ID NO: 6 puede permitir que TGF-beta 1 actúe en dichas estructuras, así, reduciendo la fracción de linfocitos T que expresan citoquinas inflamatorias (por ejemplo, IFN-gamma) y mejorando el porcentaje de linfocitos T reguladores (que se denominan en el presente documento como Tregs).

### **Ejemplo 3: El tratamiento con un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 modula la expresión de citoquinas inflamatorias en linfocitos T cultivados**

Se investigó el efecto de GED0301 sobre la expresión de citoquinas inflamatorias en linfocitos positivos para CCR9. Para determinar el efecto de la exposición a GED0301 en linfocitos positivos para CCR9, PBMC, aisladas de cinco pacientes con EC activa corticodependiente que no estaban inscritos en el ensayo clínico, se suspendieron en medio de cultivo sin suero X-vivo (Lonza, Verviers, Bélgica), suplementado con penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 U/ml), y cultivado en presencia o ausencia de oligonucleótido contra Smad7 de sentido contrario (GED0301) o de sentido directo (2 µg/ml) durante 48 horas. Los oligonucleótidos contra Smad7 tanto de sentido directo como de sentido contrario se combinaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para facilitar la transfección eficaz de las células cultivadas. Las células se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos dirigidos contra CCR9, β7, **IFN-γ**, e IL17A para determinar el porcentaje de linfocitos T que expresan bien IFN-γ o IL17A en las poblaciones CCR9+ o β7+ en cada condición de tratamiento.

La expresión de IFN-γ e IL17A en las poblaciones CCR9+ and β7+ de las PBMC cultivadas anteriores se analizó para determinar si GED0301 inhibe directamente la expresión de citoquinas inflamatorias en linfocitos CCR9+. El tratamiento de las PBMC con EC con GED0301 (Smad7 de sentido contrario) redujo significativamente los porcentajes de linfocitos CCR9+ que expresan IFN-γ e IL-17A (Fig. 6A), mientras que la fracción de linfocitos T β7+ que expresan citoquinas permanece inalterada (Fig. 6B). Por ejemplo, el porcentaje de linfocitos CCR9+ que expresan IFN-γ fue 78,9 ± 7,3 en las células no tratadas; 78,3 ± 7,3 en las células tratadas con la hebra de sentido directo; y 54 ± 7,2 en las células tratadas con GED0301. De manera similar, el porcentaje de linfocitos CCR9+ que expresan IL-17A fue 77,4 ± 7,3 en las células no tratadas; 74,3 ± 6,4 en las células tratadas con la hebra de sentido directo; y 53,9 ± 5,7 en las células tratadas con GED0301. Por el contrario, los porcentajes de linfocitos β7+ que expresan IFN-γ no tratados, tratados con la hebra directa, y con GED0301 fueron 13,1 ± 1,2; 11,7 ± 0,7, y 11 ± 0,8, respectivamente, y los porcentajes de linfocitos β7+ que expresan IL-17A no tratados, tratados con la hebra directa, y con GED0301 fueron 12,1 ± 1,5; 10,4 ± 1,2, y 10,6 ± 1,1. Por lo tanto, la exposición directa de PBMC de EC cultivadas CCR9+ a GED0301 da como resultado una disminución en la expresión de citoquinas inflamatorias.

### **Ejemplo 4: El tratamiento con un oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 modula la expresión de poblaciones de linfocitos T**

En este ejemplo se describe un estudio que investiga la fracción circulante de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T CCR9+ IFN-γ+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-γ+, linfocitos T IL17A+, linfocitos T FoxP3+ CD103+ y linfocitos T integrina α4β7+ ya que el estado de activación de estas poblaciones de linfocitos Treg reflejan la respuesta inmunitaria que se produce en los folículos y en las placas de Peyer del intestino. En los estudios descritos a continuación, para cada cohorte sometida a ensayo, las poblaciones de linfocitos T se midieron en el Día 0 para determinar una medida inicial para cada paciente. Se administró GED-0301 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 durante 7 días, y las poblaciones de linfocitos T se volvieron a medir el Día 8, Día 28, y para algunas poblaciones de células, en el Día 84.

La manipulación de la combinación periférica de linfocitos Treg ha sido una diana particular para el tratamiento de las enfermedades inmunomediadas y el trasplante. Estudios anteriores habían demostrado que el número de linfocitos Treg de sangre periféricas se podía aumentar mediante anticuerpos dirigidos contra TNF alfa, y dicho aumento solamente se observaba en pacientes que respondían a las terapias dirigidas contra TNF alfa. El efecto de una terapia contra TNF alfa sobre los linfocitos Treg se puede mediar con TGF-beta1.

El efecto de la terapia con el oligonucleótido de sentido contrario SMAD7 se investigó para determinar si terapia con el oligonucleótido de sentido contrario SMAD7 regula positivamente el número de linfocitos Treg como resultado de una

mayor actividad de TGF-beta 1. El efecto de la terapia con el oligonucleótido de sentido contrario SMAD7 también se estudió para determinar si un tratamiento de ese tipo conduce a cambios en el número de linfocitos Treg FoxP3+ y si este efecto está asociada con cambios en los porcentajes de los linfocitos efectores Th1/Th17.

- 5 Además, los linfocitos T CCR9+ se enriquecen en la circulación periférica de pacientes con enfermedad de Crohn y tienen características de células T de la mucosa, incluyendo un fenotipo de activación, capacidad de respuesta a la activación de CD2, y la capacidad de fabricar citoquinas tanto inflamatorias (por ejemplo, IFN-gamma) como reguladoras (por ejemplo, MO). El efecto de la terapia con el oligonucleótido de sentido contrario SMAD7 también se estudió para determinar si un tratamiento de ese tipo conduce a cambios en el número de linfocitos CCR9+ en circulación.
- 10 Para el aislamiento de PBMC y el análisis mediante citometría de flujo, se recogieron muestras de sangre (10 mg) en tubos que contenían heparina, se diluyeron con RPMI1640(1:1) y se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque. Con este fin, los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 30 minutos, y las PBMC resultantes se recogieron y se lavaron en RPMI1640 dos veces.
- 15 Las PBMC se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 % inactivado, penicilina (100 U/ml), y estreptomycin (100 mg/ml). Se caracterizó el fenotipo de las células mediante citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos: anticuerpo marcado con APC dirigido contra CCR9 humana y anticuerpo marcado con PE dirigido contra Foxp3 humana. Todos los anticuerpos se usaron a una dilución final 1:50.
- 20 Las PBMC se sembraron también en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo en U, y se estimularon con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 10 ng/ml), ionomicina (1 mg/ml), y brefeldina A (10 mg/ml). Después de 5 horas, las células se tiñeron para determinar la expresión de CCR9 usando los anticuerpos anteriores, así como para IFN-gamma e IL-17A usando los siguientes anticuerpos: anticuerpo para FITC dirigido contra IFN-gamma humana, anticuerpo marcado con Alexa Fluor® 647 dirigido contra IL-17A humana, y anticuerpo marcado con PE dirigido contra IL17A humana. Todos los anticuerpos se usaron a una dilución final 1:50. Se incluyeron controles adecuados emparejados por isotipo en todos los experimentos. El anticuerpo para FITC dirigido contra IFN-gamma humana se obtuvo de Beckton Dickinson y el resto de los anticuerpos usados en el presente documento se obtuvieron de EBiosciences.
- 25 Los valores se expresan como promedio, y las diferencias entre grupos se compararon usando la prueba U de Mann Whitney. La significancia estadística ( $p < 0,05$ ) se determinó usando la prueba de pares coincidentes de Wilcoxon.
- 30 Se investigó el efecto del tratamiento con GED0301 sobre la fracción de linfocitos inflamatorios/contrarreguladores. El tratamiento con GED0301 no alteró significativamente el porcentaje de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+, CD25+, CD161+, CD62L+,  $\alpha 4\beta 7+$ , o CCR9+ en circulación, según se controla los días 8 y 28 del ensayo clínico (Fig. 7). De manera similar, no se observaron cambios significativos en la fracción de linfocitos interleucina (IL)-17A+, linfocitos IL-10+, linfocitos FoxP3+, interferón (IFN)- $\gamma$  y linfocitos  $\alpha 4\beta 7+$  que expresan IL-17A, o linfocitos CD103+ que expresan FoxP3 después del tratamiento con GED0301.
- 35 Las Tablas I y la muestran los resultados de la Cohorte 1, que recibió 40 mg de GED-0301/día durante 7 días. La Tabla I muestra el porcentaje de una población dada de linfocitos T sobre la población total de células los días 0, 8, 28. La Tabla la muestra el porcentaje de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T FoxP3+ y linfocitos T CD103+ FoxP3+ en el total de la población celular los días 0, 8, 28 y 84.
- 40 La Tabla II muestra los resultados de la Cohorte 2, que recibió 80 mg de GED-0301/día durante 7 días. La Tabla II muestra el porcentaje de una población dada de linfocitos T sobre la población total de células los días 0, 8, y 28. La Tabla IIa muestra el porcentaje de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T FoxP3+ y linfocitos T CD103+ FoxP3+ en el total de la población celular los días 0, 8, 28 y 84.
- 45 La Tabla III muestra los resultados de la Cohorte 3, que recibió 160 mg de GED-0301/día durante 7 días. La Tabla III muestra el porcentaje de una población dada de linfocitos T sobre la población total de células los días 0,8, y 28. La Tabla III muestra el porcentaje de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T FoxP3+ y linfocitos T CD103+ FoxP3+ en el total de la población celular los días 0, 8, 28 y 84.
- 50 La Tabla IV muestra los resultados combinados del total de pacientes procedentes de las Cohortes 1-3. La Tabla IV muestra el porcentaje de una población dada de linfocitos T sobre la población total de células los días 0, 8, y 28. La Tabla IVa muestra el porcentaje de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, linfocitos T FoxP3+ y linfocitos T CD103+ FoxP3+ en el total de la población celular los días 0, 8, 28 y 84.

Tabla I

Población celular	Día 0			Día 8			Día 28		
	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.
CCR9+IFN-g+	<b>1,5 %</b>	3,25 %	0,70 %	<b>0,3 %</b>	1,6 %	0,13 %	<b>0,80 %</b>	0,85 %	0,40 %
CCR9+IL-17A+	<b>0,28 %</b>	2,8 %	0,02 %	<b>0,44 %</b>	2,7 %	0,05 %	<b>0,15 %</b>	0,90 %	0,00 %
CCR9+FoxP3+	<b>0,07 %</b>	0,20 %	0,01 %	<b>0,25 %</b>	0,70 %	0,02 %	<b>0,18 %</b>	0,21 %	0,10 %
IFN-g+	<b>14,5 %</b>	22,99 %	6,29 %	<b>7,97 %</b>	13,82 %	3,5 %	<b>11,00 %</b>	27,00 %	4,95 %
IL-17A+	<b>1,4 %</b>	2,50 %	0,4 %	<b>1,2 %</b>	2,80 %	0,64 %	<b>1,02 %</b>	4,70 %	0,30 %
FoxP3+	<b>0,80 %</b>	2,20 %	0,19 %	<b>0,90 %</b>	2,50 %	0,21 %	<b>1,50 %</b>	3,20 %	0,20 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,18 %</b>	4,60 %	0,03 %	<b>0,30 %</b>	0,40 %	0,07 %	<b>0,28 %</b>	0,80 %	0,10 %
integrina $\alpha 4\beta 7+$	<b>2,70 %</b>	2,90 %	2,30 %	<b>1,35 %</b>	2,40 %	0,51 %	<b>0,99 %</b>	2,60 %	0,73 %

Tabla Ia

	Día 0			Día 8			Día 28			Día 84		
	Med.	Máx.	Min.	Med.	Máx.	Min.	Med.	Máx.	Min.	Med.	Máx.	Min.
Pob. celular												
CCR9+ FoxP3+	<b>0,07 %</b>	0,20 %	0,01 %	<b>0,25 %</b>	0,70 %	0,02 %	<b>0,18 %</b>	0,21 %	0,10 %	0,46 %	2,50 %	0,01 %
FoxP3+	<b>0,80 %</b>	2,20 %	0,19 %	<b>0,90 %</b>	2,50 %	0,21 %	<b>1,50 %</b>	3,20 %	0,20 %	1,06 %	2,8 %	0,05 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,18 %</b>	4,60 %	0,03 %	<b>0,30 %</b>	0,40 %	0,07 %	<b>0,28 %</b>	0,80 %	0,10 %	0,28 %	1,2 %	0,05 %

Tabla II

Población celular	Día 0			Día 8			Día 28		
	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.
CCR9+IFN-g+	<b>1,40 %</b>	14,00 %	0,40 %	<b>1,00 %</b>	5,20 %	0,50 %	<b>9,40 %</b>	20,00 %	0,56 %
CCR9+IL-17A+	<b>0,80 %</b>	9,80 %	0,28 %	<b>0,3 %</b>	5,20 %	0,09 %	<b>1,21 %</b>	4,50 %	0,40 %
CCR9+FoxP3+	<b>0,50 %</b>	0,60 %	0,20 %	<b>0,40 %</b>	0,50 %	0,20 %	<b>0,40 %</b>	0,50 %	0,16 %
IFN-g+	<b>9,80 %</b>	20,90 %	4,80 %	<b>5,70 %</b>	34,00 %	1,70 %	<b>14,95 %</b>	34,00 %	4,50 %
IL-17A+	<b>0,70 %</b>	5,80 %	0,20 %	<b>0,19 %</b>	4,60 %	0,00 %	<b>1,00 %</b>	4,60 %	0,22 %
FoxP3+	<b>1,70 %</b>	2,30 %	0,60 %	<b>1,10 %</b>	1,60 %	0,80 %	<b>0,80 %</b>	1,60 %	0,60 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,20 %</b>	0,40 %	0,12 %	<b>0,23 %</b>	0,34 %	0,14 %	<b>0,34 %</b>	0,06 %	0,07 %
integrina $\alpha 4\beta 7+$	<b>2,40 %</b>	4,20 %	0,92 %	<b>3,29 %</b>	7,00 %	1,40 %	<b>3,38 %</b>	4,80 %	1,10 %

Tabla IIa

Pob. celular	Día 0			Día 8			Día 28			Día 84		
	Med.	Máx.	Mín.									
CCR9+ FoxP3+	<b>0,50 %</b>	0,60 %	0,20 %	<b>0,40 %</b>	0,50 %	0,20 %	<b>0,40 %</b>	0,50 %	0,16 %	<b>0,60 %</b>	5,00 %	0,10 %
FoxP3+	<b>1,70 %</b>	2,30 %	0,60 %	<b>1,10 %</b>	1,60 %	0,80 %	<b>0,80 %</b>	1,60 %	0,60 %	<b>1,80 %</b>	4,00 %	0,15 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,20 %</b>	0,40 %	0,12 %	<b>0,23 %</b>	0,34 %	0,14 %	<b>0,34 %</b>	0,06 %	0,07 %	<b>0,20 %</b>	1,10 %	0,10 %

Tabla III

Población celular	Día 0			Día 8			Día 28		
	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.
CCR9+IFN-g+	<b>14,00 %</b>	35,00 %	2,80 %	<b>8,00 %</b>	16,00 %	0,40 %	<b>10,30 %</b>	31,00 %	1,30 %
CCR9+IL-17A+	<b>4,40 %</b>	7,80 %	3,50 %	<b>4,00 %</b>	8,00 %	0,30 %	<b>1,50 %</b>	280,00 %	1,00 %
CCR9+FoxP3+	<b>0,80 %</b>	1,20 %	0,10 %	<b>1,30 %</b>	1,90 %	0,70 %	<b>0,70 %</b>	1,5 %	0,28 %
IFN-g+	<b>10,80 %</b>	26,00 %	3,60 %	<b>8,50 %</b>	15,00 %	1,70 %	<b>13,00 %</b>	29,00 %	3,40 %
IL-17A+	<b>2,10 %</b>	3,60 %	1,00 %	<b>1,20 %</b>	5,30 %	1,10 %	<b>1,50 %</b>	5,60 %	0,80 %
FoxP3+	<b>2,80 %</b>	3,30 %	1,70 %	<b>2,10 %</b>	4,60 %	1,60 %	<b>1,50 %</b>	4,40 %	0,80 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,80 %</b>	1,20 %	0,20 %	<b>0,70 %</b>	1,80 %	0,50 %	<b>0,70 %</b>	1,40 %	0,24 %
integrina $\alpha 4\beta 7+$	<b>2,80 %</b>	6,30 %	2,50 %	<b>1,10 %</b>	6,80 %	0,60 %	<b>3,50 %</b>	5,20 %	0,90 %

Tabla IIIa

Pob. celular	Día 0			Día 8			Día 28			Día 84		
	Med.	Máx.	Mín.									
CCR9+ FoxP3+	<b>0,80 %</b>	1,20 %	0,10 %	<b>1,30 %</b>	1,90 %	0,70 %	<b>0,70 %</b>	1,5 %	0,28 %	<b>0,40 %</b>	0,8 %	0,12 %
FoxP3+	<b>2,80 %</b>	3,30 %	1,70 %	<b>2,10 %</b>	4,60 %	1,60 %	<b>1,50 %</b>	4,40 %	0,80 %	<b>0,40 %</b>	8,49 %	0,23 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,80 %</b>	1,20 %	0,20 %	<b>0,70 %</b>	1,80 %	0,50 %	<b>0,70 %</b>	1,40 %	0,24 %	<b>0,20 %</b>	1,40 %	0,10 %

Tabla IV

Población celular	Día 0			Día 8			Día 28		
	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.	Mediana	Máx.	Mín.
CCR9+IFN-g+	<b>2,8 %</b>	35,00 %	0,40 %	<b>1,0 %</b>	16,00 %	0,13 %	<b>5,05 %</b>	31,00 %	0,40 %
CCR9+IL-17A+	<b>2,8 %</b>	9,8 %	0,02 %	<b>0,44 %</b>	8,00 %	0,05 %	<b>1,00 %</b>	280,00 %	0,00 %
CCR9+FoxP3+	<b>0,20 %</b>	1,20 %	0,01 %	<b>0,50 %</b>	1,90 %	0,02 %	<b>0,40 %</b>	4,00 %	0,10 %
IFN-g+	<b>10,60 %</b>	26,00 %	3,60 %	<b>7,2 %</b>	34,00 %	1,70 %	<b>13,00 %</b>	34,00 %	3,40 %
IL-17A+	<b>1,4 %</b>	5,80 %	0,20 %	<b>1,10 %</b>	5,30 %	0,00 %	<b>1,06 %</b>	5,60 %	0,22 %
FoxP3+	<b>1,70 %</b>	3,30 %	0,19 %	<b>1,23 %</b>	4,60 %	0,21 %	<b>1,25 %</b>	4,40 %	0,20 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,20 %</b>	4,60 %	0,03 %	<b>0,34 %</b>	1,80 %	0,07 %	<b>0,34 %</b>	1,40 %	0,07 %
integrina $\alpha 4\beta 7$	<b>2,70 %</b>	6,30 %	0,92 %	<b>2,00 %</b>	7,00 %	0,51 %	<b>2,60 %</b>	5,2 %	0,073 %

Tabla IVa

Pob. celular	Día 0			Día 8			Día 28			Día 84		
	Med.	Máx.	Mín.									
CCR9+ FoxP3+	<b>0,20 %</b>	1,20 %	0,01 %	<b>0,50 %</b>	1,90 %	0,02 %	<b>0,40 %</b>	4,00 %	0,10 %	<b>0,46 %</b>	5,00 %	0,01 %
FoxP3+	<b>1,70 %</b>	3,30 %	0,19 %	<b>1,23 %</b>	4,60 %	0,21 %	<b>1,25 %</b>	4,40 %	0,20 %	<b>1,06 %</b>	8,49 %	0,50 %
FoxP3+ CD103+	<b>0,20 %</b>	4,60 %	0,03 %	<b>0,34 %</b>	1,80 %	0,07 %	<b>0,34 %</b>	1,40 %	0,07 %	<b>0,20 %</b>	1,40 %	0,02 %

5 Como se muestra en cada una de las tablas anteriores, se observó una disminución significativa en las poblaciones de linfocitos T que expresan CCR9+ IFN- $\gamma$ + en el día 8 (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 2,8 % el día 0 y una expresión del 1,0 % el día 8; véase la Fig. 8B).

10 También se observó una disminución en las poblaciones de linfocitos T CCR9+ IL 17A+ (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 2,8 % el día 0 y una expresión del 0,44 % el día 8; véase la Fig. 8D). También se observó una disminución significativa desde el día 0 al día 28 para las poblaciones de linfocitos T CCR9+ IL17A+ (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 1,00 % el día 28; véase la Fig. 8D). La disminución seguía estando presente el día 84 (median expresión 1 %; intervalo 0,08 %-4,8 %).

Se observó un aumento en las poblaciones de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ entre el día 8 y el día 84 (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 0,2 % el día 0 y una expresión del 0,5 % el día 8; véase la Fig. 8F).

15 Se observó una disminución significativa en las poblaciones de linfocitos T IFN- $\gamma$ + en el día 8 (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 10,6 % el día 0 y una expresión del 7,2 % el día 8; véase la Fig. 8A).

También se observó una disminución en las poblaciones de linfocitos T IL17A+ (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 1,4 % el día 0 y una expresión del 1,1 % el día 8; véase la Fig. 8C).

También se observó una disminución en las poblaciones de linfocitos T FoxP3+ en el día 8 (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 1,7 % el día 0 y una expresión del 1,23 % el día 8; véase la Fig. 8E).

20 No se observaron cambios en las poblaciones de linfocitos T FoxP3+ CD103+ (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 0,2 % el día 0 y una expresión del 0,34 % el día 8) y en las poblaciones de linfocitos T integrina  $\alpha 4\beta 7$  (por ejemplo, la Tabla IV muestra una expresión del 2,7 % el día 0 y una expresión del 2 % el día 8).

25 Los resultados mostrados en las Tablas I-IV demuestran que la inhibición de SMAD7 con GED-0301 en pacientes de EC modula la expresión de las poblaciones de linfocitos T específicos. En particular, los inventores observaron una regulación por defecto en las poblaciones de linfocitos T CCR9+ IFN- $\gamma$ +, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN- $\gamma$ +, e IL17A+ después del tratamiento con GED-0301 en el día 8 y una regulación en exceso

5 en las poblaciones de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ después del tratamiento con GED-0301 en el día 8. Las poblaciones de linfocitos T CCR9+ IL17A+ también se regularon por defecto después del tratamiento con GED-301 el día 28 (por ejemplo, cuando se compara con el día 0). Los resultados mostrados en las Tablas I-IV sugieren que la inhibición de SMAD7 con GED-0301 en pacientes de EC reduce la síntesis de citoquinas Th1 y restaura la susceptibilidad de los linfocitos T efectoras hacia la inmunosupresión mediada por linfocitos T reguladores (Tregs). Esto es coherente con la demostración de que TGF-beta1 es un potente inhibidor de las respuestas de linfocitos Th1, y un mediador clave en la diferenciación periférica y actividad de los linfocitos Treg.

10 También se midieron las puntuaciones CDAI de los pacientes incluidos en cada una de las tres cohortes analizadas anteriormente. Las puntuaciones CDAI iniciales se midieron en el día 0, y se volvieron a medir de nuevo los días 1, 4, 8, 28, y 84 del tratamiento. Las Tablas V-VII proporcionan las puntuaciones CDAI de pacientes representativos para cada una de las cohortes 1-3, respectivamente. X. Como se muestra en la Tabla V siguiente, los pacientes de la Cohorte 1, que recibieron 40 mg de GED-0301 durante 7 días, mostraron una disminución en la puntuación CDAI en el día 4 de tratamiento, que se mantuvo durante el período de seguimiento (día 84).

**Tabla V**

Pacientes (Cohorte 1)	Valor inicial	Día 1	Día 4	Día 8	Día 28	Día 84
Paciente 1-01	289	278	154	42	119	89
Paciente 1-02	253	257	181	86	93	154,4
Paciente 1-03	221	204	138	89	45	35
Paciente 1-04	302	294	203	41	18	81
Paciente 1-05	306	331	275	163	144	167

15 Como se muestra en la Tabla VI siguiente, los pacientes de la Cohorte 2, que recibieron 80 mg de GED-0301 durante 7 días, mostraron una disminución en la puntuación CDAI en el día 4 de tratamiento, que se mantuvo durante el período de seguimiento (día 84).

**Tabla VI**

Pacientes (Cohorte 2)	Valor inicial	Día 1	Día 4	Día 8	Día 28	Día 84
Paciente 2-08	299	293	224	70	119,4	73
Paciente 2-09	400	401	322,2	215	301	339
Paciente 2-10	268	330	213	126	213,5	225
Paciente 2-11	287	299,8	207	95,6	52	46
Paciente 2-12	252	226	194	154	133	185

20 Como se muestra en la Tabla VII siguiente, los pacientes de la Cohorte 3, que recibieron 160 mg de GED-0301 durante 7 días, mostraron una disminución en la puntuación CDAI en el día 4 de tratamiento, que se mantuvo durante el período de seguimiento (día 84).

**Tabla VII**

Pacientes (Cohorte 3)	Valor inicial	Día 1	Día 4	Día 8	Día 28	Día 84
Paciente 3-15	230	210	168,6	44	31	145
Paciente 3-16	260	217	133	53	71	94
Paciente 3-17	292	279	219	113	88	184
Paciente 3-18	290	280	242	95	71	118
Paciente 3-19	257	240	155	37	49	134

25 Los resultados de las Tablas V-VII demuestran que el tratamiento con GED-0301 reduce las puntuaciones CDAI de los pacientes que padecen la enfermedad de Crohn. En la inscripción, la mediana de la puntuación en el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) para todos los pacientes fue de 287 (221-400) (Fig. 9). La mediana de la puntuación CDAI era de 289 (intervalo 221-306) para los pacientes de la cohorte 1, 287 (intervalo 252-400) para los

pacientes de la cohorte 2 y 287 (intervalo 221-400) para los pacientes de la cohorte 3. En las tres cohortes, los pacientes respondieron al tratamiento (por ejemplo, se observó para cada paciente una disminución de 70 puntos o más desde la puntuación CDAI inicial), de tal forma que, en el día 8, los 15 pacientes mostraron una disminución en la puntuación CDAI y 12/15 pacientes de las Cohortes 1-3 entraron en remisión (es decir, puntuación CDAI < 150). (Tabla V-VII). Específicamente, 4/5 pacientes de la cohorte 1, 3/5 pacientes de la cohorte 2 y 5/5 pacientes de la cohorte 3 tenían una puntuación CDAI <150 (Tablas V-VII). En el día 28, la respuesta clínica fue evidente también en los 15 pacientes (Tabla V-VII) y hubo una disminución significativa en la puntuación CDAI comparada con el valor inicial ( $P < 0,0001$ ). La remisión clínica en el día 28 se registró en 13/15 pacientes (86 %) (5/5 de la cohorte 1, 3/5 de la cohorte 2 y 5/5 de la cohorte 3) (Tabla V-VII). En el día 84, la puntuación CDAI total fue significativamente menor que la medida al principio (Tabla V-VII,  $P < 0,0001$ ) y 9/15 (60 %) pacientes seguían en remisión. En particular, esto se observó en 3 pacientes de la cohorte 1, 2 pacientes de la cohorte 2, y 4 pacientes de la cohorte 3 (Tabla V-VII). Se observó una disminución significativa en la puntuación CDAI desde el valor inicial hasta el día 8, 28 y 84 incluso cuando el análisis se realizó en cada cohorte (Fig. 9). Los resultados sugieren que existe una correlación entre la inducción de la remisión y/o la mejora en el resultado y las subpoblaciones de linfocitos T. Además, las puntuaciones CDAI observadas el día 84 muestran un aumento en comparación con los puntos temporales anteriores (por ejemplo, días 8 y 28), que era coherente con las correspondientes fluctuaciones en determinadas poblaciones de linfocitos T a día 84 (por ejemplo, las poblaciones de linfocitos T CCR9+ FoxP3+ aumentaron entre el día 0 y el día 8, pero el día 84, parece que esta población de linfocitos T disminuye).

Las realizaciones anteriores deben considerarse ilustrativas en lugar de limitantes de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la invención se indica mediante las reivindicaciones adjuntas y no según la descripción anterior, y se pretende que todos los cambios que están incluidos en el significado y gama de las reivindicaciones estén abarcados por las mismas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene enfermedad inflamatoria del intestino (EII) al tratamiento con al menos una terapia dirigida contra el homólogo 7 de *mothers against decapentaplegic* (anti-SMAD7), comprendiendo el procedimiento:
  - 5 determinar la cantidad de al menos una población celular seleccionadas entre el grupo que consiste en: linfocitos T Receptor de quimiocina 9 C-C+ (CCR9+) secuencia Forkhead P3+ (FoxP3+), linfocitos T CCR9+ Interferón-gamma+ (IFN-gamma+), linfocitos T CCR9+ interleucina-17A+ (IL17A+), linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-gamma y linfocitos T IL17A+, en al menos una muestra de sangre periférica obtenida del sujeto,
    - 10 en el que, mayores cantidades de la población celular de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, y/o menores cantidades de al menos una de las poblaciones celulares de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, linfocitos T CCR9+ IL17A+, linfocitos T FoxP3+, linfocitos T IFN-gamma+ y linfocitos T IL17A+, en la al menos una muestra de sangre periférica con respecto a un nivel de control conocido de la al menos una población celular es predictivo de la capacidad de respuesta del sujeto que padece EII a la terapia dirigida contra SMAD7.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la modulación de dos o más de lo siguiente se identifica como
  - 15 ayuda para determinar la capacidad de respuesta del sujeto:
    - un aumento en la cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
    - una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+ indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
    - 20 una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
    - una disminución en la cantidad de linfocitos T FoxP3+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
    - una disminución en la cantidad de linfocitos T IFN-gamma+ indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7;
    - 25 una disminución en la cantidad de linfocitos T IL17A+, indica que es probable que el sujeto responda, o tenga capacidad de respuesta, a la terapia dirigida contra SMAD7.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 llevado a cabo in vitro.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra procede de un sujeto que está
  - 30 recibiendo al menos una terapia dirigida contra SMAD7 en el momento en que se obtiene la al menos una muestra de sangre periférica.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) es la enfermedad de Crohn (EC) y/o la colitis ulcerosa (CU).
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos uno de: un aumento en la
  - 35 cantidad de linfocitos T CCR9+ FoxP3+, una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IFN-gamma+, una disminución en la cantidad de linfocitos T CCR9+ IL17A+, una disminución en la cantidad de linfocitos T FoxP3+, una disminución en la cantidad de linfocitos T IFN-gamma+ o una disminución en la cantidad de linfocitos T IL17A+ indica que es probable que el sujeto inicie una remisión.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cantidad de la al menos una población
  - 40 celular se determina mediante citometría de flujo, mediante inmunohistoquímica y/o mediante análisis de ARN/ADN.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la citometría de flujo y/o la inmunohistoquímica se lleva a cabo usando un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en: un anticuerpo dirigido contra CCR9, un anticuerpo dirigido contra FoxP3, un anticuerpo dirigido contra IFN-gamma y un anticuerpo dirigido contra IL17A.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nivel de control es un nivel inicial de al
  - 45 menos una población celular obtenida del paciente antes de administrar al menos una terapia dirigida contra SMAD7 u obtenida inmediatamente después de administrar la al menos una terapia dirigida contra SMAD7.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la al menos una terapia dirigida contra SMAD7 es una terapia de sentido contrario dirigida contra SMAD7.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la terapia de sentido contrario dirigida contra SMAD7 es un
  - 50 oligonucleótido de sentido contrario dirigido contra SMAD7 seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

ES 2 617 200 T3

```

1 ggcacgagcg gagagccgcg cagggcgcgg gccgcgcggg gtggggcagc cggagcgcag
61 gcccccgatc cccgcgcggc gcccccgggc cccgcgcgcg gccccggcct ccgggagact
121 ggcgcgatgcc acggagcgcc cctcgggcgg ccgcgcctcc tgccccggcc cctgctgctg
181 ctgctgtcgc ctgcgcctgc tgccccaaact cgggcgcgga ctctctcatg gtgtgcggag
241 gtcattgttc ctcccttagca ggcaaacgac tttctctctc gcctcctcgc ccgcgatgtt
301 caggacccaaa cgatctgcgc tcgtccggcg tctctggagg agccgtgcgc ccggcggcga
361 ggacgagcag gagggcgcag ggggaggtgg aggaggaggc gagctgcggg gagaaggggc
421 gacggacagc cgagcgcgat gggccgggtg cggcggcccg ggcagggtcg gatgctgcct
481 gggcaagcgc gtgcgaggtg ccaaaggtea ccaccatccc caccgccag ccgcgggcgc
541 cggcgcgcgc ggggcgcgcg aggcgcatct gaaggcgcct acgcctcgg tgctcaagaa
601 actgaagcag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg gagtcccgcg gcgggacgcg
661 caccgcctgc ctctgctgc ccggcgcct ggactgcagg ctgggcccgg ggggcgcgcg
721 cggcgcgcag cctgcgcagc cgcctcgtc ctactcgtc cccctcctgc tgtgcaaatg
781 gttcagctgg ccgatctca ggcattcctc ggaagtcaag aggtctgctt gctgtgaatc
841 ttacgggaag atcaaccccg agctggtgtg ctgcaacccc catcacctta gccgactctg
901 cgaactagag tctccccccc ctcccttact cagatacccg atggattttc tcaaaccaac
961 tgcagactgt ccagatgctg tgccttctc cgctgaaaca gggggaacga attatctggc
1021 cctggggggg ctttcagatt cccaactctc tctggagcct ggggatcggg cacactgggtg
1081 cgtgggtcga tactcggagg agaagacgag agtggggagg ctctactctg tccaggagcc
1141 ctctctcggat atctctatg atctacctca ggggaatggc tttgcctcg gacagctcaa
1201 ttccgacaac aagactcagc tgggtgcagaa cgtgcggagc aaaaatcgcct gcggcatcca
1261 gctgacgcgg gaggtgatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccactctcat
1321 caagtccgcc aactggaca acccggactc caggacgctg tggtaacaca aggtgttccc
1381 cggtttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggccccaatga
1441 ccacgacttt atgcagcagc cgtggacggg ctttaaccgtg cagatcacct ttgtgaaggg
1501 ctggggtcag tgctacaccc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctcgc tagaggtcat
1561 cttcaacagc cggtagcgc gtgcggaggg gacagagcgt gacagagcgt ggccacactt
1621 caaactactt tgotcetaat attttctcc tgagtgcctg ctttcatgc aaactctttg
1681 gtcgtttttt ttttctttt tygtygttt ttttctttc gctctgttt gtyttctgtt
1741 ttgttttgcct ctttcagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt tttggaagaa
1801 ggggcacgta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac
1861 caccaaacac agtgtatgaa ggggggcggt catcatttca ctgtcagga gtgtgtgtga
1921 gtgtgagctg gcggctgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatggg gagacaacgt
1981 gctctttgtt ttgtctctc tatggatgtc ccagcagag aggtttgcag tccaagcgg
2041 tgtctctctc gcccttggc cacgctcagt cgggcagagg cagtacctgg gcaagctggc
2101 gctggtggtc ccagcagctg ccaggagcac cgtctctgtc ccagcctggg aaagccctg
2161 cccctcctct cctcctcctc ggacacgggc ctgtccacag gctctgagc agcagcctg
2221 ctagtgcgcc aaccagaacc aattattttc atccttgtct tattccctc ctgccagccc
2281 ctgccattgt agcgtctttc tttttggcc atctgtctct ggatctccct gagatgggct
2341 tcccaagcgc tgccccggca gccccctcac agtattgctc acccagtcgc ctctccccctc
2401 agcctctccc ctgcctgccc tgggtgacatc aggtttttcc cggacttaga aaaccagctc
2461 agcactgcct gctcccatec tgtgtgttaa gctctgctat taggccagca agcggggatg
2521 tccctggcag gacatgctt agcagtcocc ttccctccaa gaaggatttg ctccgtcata
2581 acccaagcga ccactctagg ctgacacctc actctctttt cattctctc acaactcata
2641 cactcgtatg atacttcgac actgtttctta gctcaatgag catgttttaga ctttaacata
2701 agctattttt ctaactacaa aggttttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaaatlt
2761 agcattgttag tgctttgaga gagaaaggac tccctgaaaa aaacctgaga tttattaaag
2821 aaaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac tctgaaatat aaagacgttt
2881 tataagcctc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaa
2941 tgcactttgc tttaatataa atgcaataaa caaatgccaa actaaaaaag ataaacacaa
3001 gattgggtgt ttttctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagttta
3061 tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaa a

```

(SEQ ID NO:1)

Fig. 1A

MFRTRKRSALVRRRLWRSRAPGGDEEEEGAGGGGGGGELRGEGATD  
 SRAHGAGGGGPGRAGCCT.GKAVRGAKGHHHPHPPAAGAGAAGGAFAADI.KAI.THSVI.KK  
 LKERQLELLLQAVESRGGTRTACLLLPGRLLDCRLGPGAPAGAQAQPPSSYSPLLLC  
 KVERWPDLRHSSEVKRLCCESYGKINPELVCCNPHHLSRLCELESPPPPYSRYPMDF  
 LKPTADCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSDSQLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRL  
 YCVQEPSLDIFYDLPQNGFCLGQLNSDNKSQLVQKVRKIGCGIQLTREVDGVVWYN  
 RSSYPIFIKSATLDNPDSTRLLVHKVFPFGFSIKAFDYEKAYSLQRPNDHEFMQQPWTG  
 FTVQISFVKGWGCYTRQFISSPCWLEVIFNSR  
 (SEQ ID NO:2)

Fig. 1B

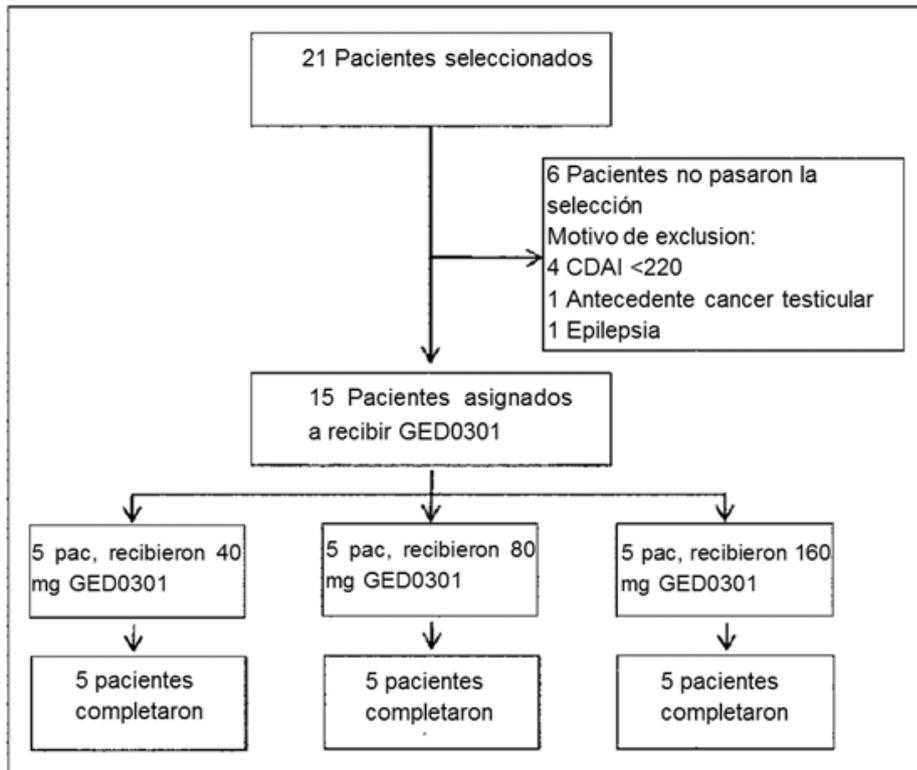


Fig. 2

	40 mg	80 mg	160 mg	Global
	N = 5	N = 5	N = 5	N= 15
	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 3	
Sexo, varón: n (%)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	11 (73)
Edad: mediana (intervalo)	38 (32-41)	84 (31-42)	39 (24-45)	37 (24-45)
Duración de EC: años mediana (intervalo)	6 (1-29)	2 (1-5)	1(1-9)	4 (1-29)
Resección I-C anterior; n (%)	4 (80)	4(80)	1 (20)	9 (60)
<i>Ubicación EC: n (%)</i>				
Íleon terminal	1 (20)	1 (20)	4 (80)	6 (40)
Preanastomótico	4 (80)	4 (80)	1(20)	9 (60)
Comportamiento EC: n (%) inflamatorio	5 (100)	5 (100)	5 (100)	15 (100)
<i>Medicación paralela n (%)</i>				
Corticoesteroides sistémicos	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (6,6)
Budesonida	4 (80)	2 (40)	3 (60)	9 (80)
Mesalamina	3 (60)	4 (80)	5(100)	12 (80)
<i>Intolerancia o insensibilidad n (%)</i>				
Fármacos inmunosupresores	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33,3)
Anti-TNF	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33,3)

*Abreviaturas:* EC, enfermedad de Crohn; TNF, Factor de necrosis tumoral,

Fig. 3

	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 1	Grado	Asociación con el fármaco del estudio
	Nº de eventos	Nº de eventos	Nº de eventos		
Recaída EC	0	1	0	Leve	UN (1)
Dolor abdominal	0	0	2	Severo	UN (2)
Vómito	0	0	2	Severo	UN (2)
Aumento en triglicéridos	0	0	3	Leve	NT (3)
y/o colesterol	2	0	0	Leve	UN (2)
	1	0	0	Leve	PR (1)
Aumento bilirrubina	3	0	0	Leve	NT (3)
Aumento recuento linfocitos	0	0	1	Leve	NT (1)
Disminución potasio sérico	1	0	0	Leve	NT (1)
Aumento recuento leucocito urinario	1	0	0	Leve	NT (1)
	0	0	0	Leve	UN (1)
Aumento recuento esterasas leucocito urinario	1	0	0	Leve	NT (1)
Infección tracto urinario	1	2	0	Leve	NT (3)
Hipertensión	0	1	0	Leve	NT (1)
Alteración ECG (inversión de ondas T)	0	1	0	Leve	UN (1)
Rinitis	1	0	0	Leve	UN (1)

Los datos indican el número de pacientes con al menos un evento adverso (número de pacientes con asociación documentada,

Abreviaturas: EC, enfermedad de Crohn; ECG, electrocardiograma; NT, no relacionado con el fármaco del estudio; PR, probablemente relacionado con el fármaco del estudio; UN, improbable que esté relacionado con el fármaco del estudio

Fig. 4

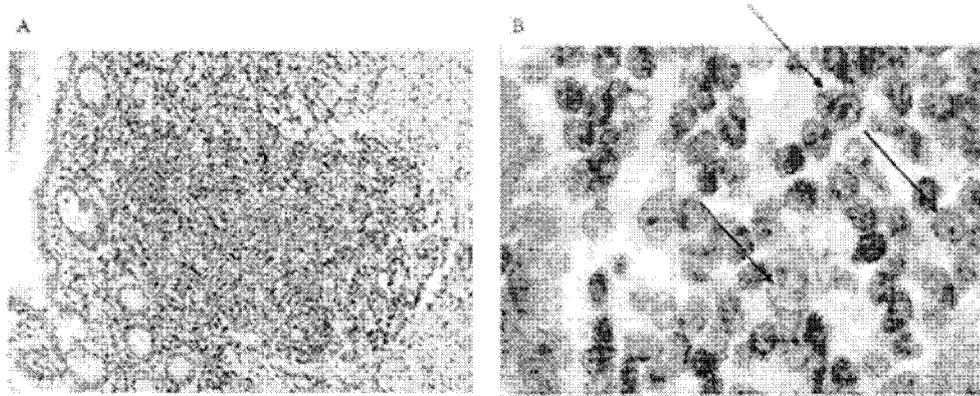


Fig. 5

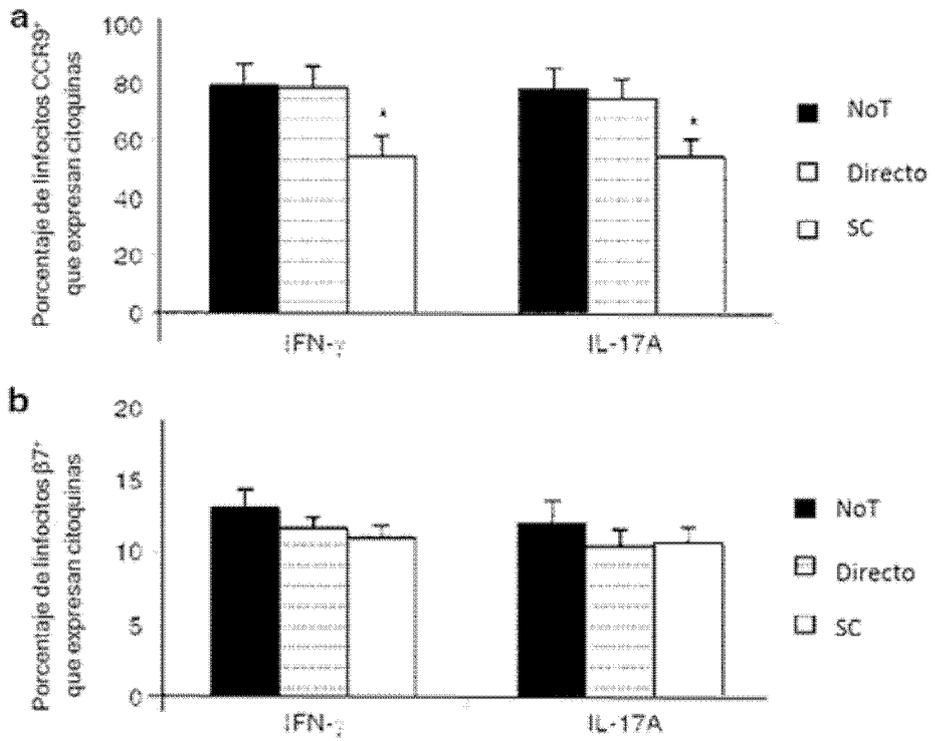


Fig. 6

	Inicial	Día 8	Día 28
<i>Linfocitos</i>			
CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	66,8% ± 12,5%	70,8% ± 12,5%	70,4% ± 10,3%
CD4 <sup>+</sup>	44,8% ± 14,2%	50,4% ± 12,8%	50,7% ± 12,6%
CD4 <sup>+</sup>	16,6% ± 6,6%	20,0% ± 6,2%	19,8% ± 5,4%
CD25 <sup>+</sup>	44,2% ± 15,5%	39,2% ± 11,6%	39,4% ± 13,8%
CD161 <sup>+</sup>	4,9% ± 2,8%	4,3% ± 2,7%	4,7% ± 4,8%
CD 62L <sup>+</sup>	50,3% ± 13,7%	54,9% ± 11,6%	54,9% ± 12,9%
CCR9 <sup>+</sup>	2,9% ± 1,6%	3,8% ± 3,1%	3,8% ± 2,8%
α4β7 <sup>+</sup>	3,0% ± 1,5%	2,7% ± 2,1%	2,4% ± 1,3%

Fig. 7

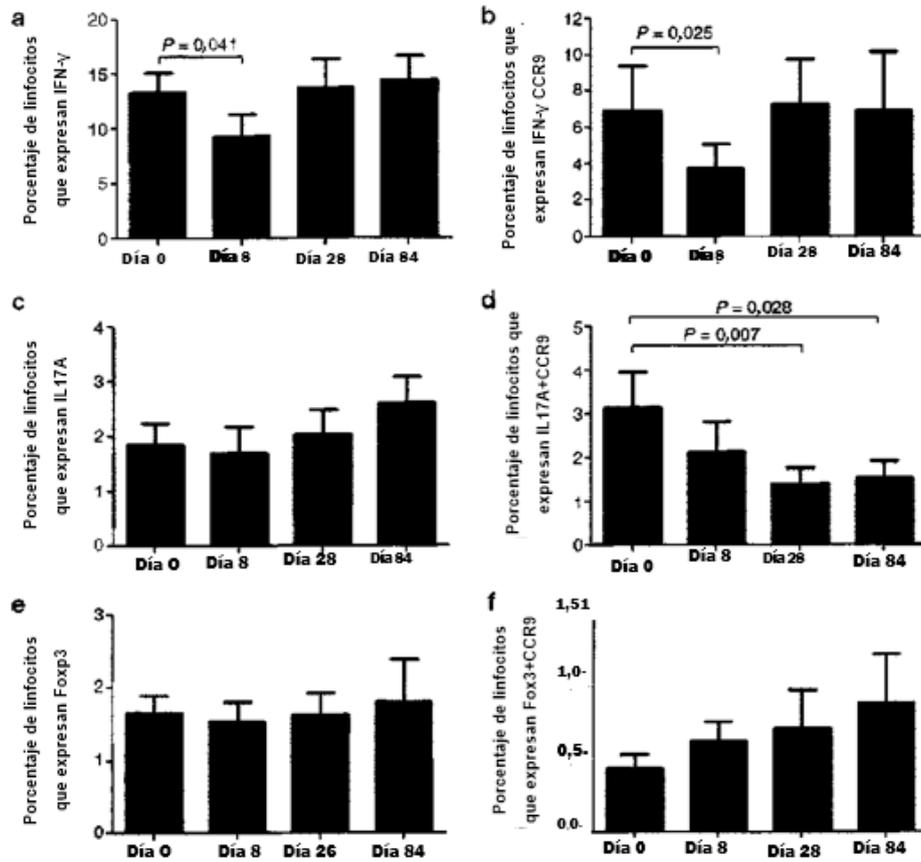


Fig. 8

	40 mg	80 mg	160 mg	Global
	N = 5	N = 5	N = 5	N = 15
	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 3	
<i>CDAI</i>				
Inicial	289 (221-306)	287 (252-400)	287 (221-400)	287(221-400)
Día 8	86 (41-163)	126 (70-215)	53 (37-113)	89 (37-215)
Día 28	93 (18-144)	133 (52-301)	71 (31-88)	88 (18-301)

Fig. 9