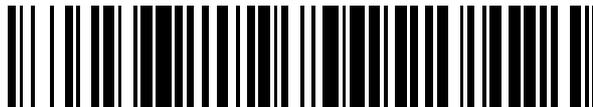


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 820**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2011 PCT/US2011/057519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011 E 11838481 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2632492**

54 Título: **Métodos para determinar diferencias en la actividad de la alfa-4-integrina mediante la correlación de las diferencias en los niveles de sVCAM y/o sMAdCAM**

30 Prioridad:

25.10.2010 US 406365 P
25.10.2010 US 406358 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2018

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

CHACKERIAN, ALISSA, A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 654 820 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

Métodos para determinar diferencias en la actividad de la alfa-4-integrina mediante la correlación de las diferencias en los niveles de sVCAM y/o sMAdCAM

5

Campo

Se describe en el presente documento un método para el seguimiento de un cambio en la actividad de alfa-4-integrina en un individuo mediante la correlación de las actividad con el nivel de una molécula soluble, en la que la molécula soluble es una molécula de adhesión a células vasculares (sVCAM) y/o una molécula de adhesión a células de adreína de la mucosa (sMAdCAM).

10

Antecedentes

La respuesta inflamatoria de los tejidos vascularizados a la infección o lesión está alterada por la adhesión de leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y su infiltración en los tejidos circundantes. En una respuesta inflamatoria normal, los leucocitos infiltrantes liberan mediadores tóxicos, fagocitan residuos y células muertas, y tienen un papel en la reparación de tejidos y en la respuesta inmunitaria. No obstante, en la inflamación patológica, los leucocitos infiltrantes responden en exceso y pueden ocasionar daños graves o fatales. Las integrinas pertenecen a una familia de glicoproteínas de la superficie celular implicadas en la adhesión celular, migración de células inmunitarias, y activación. La alfa-4 integrina se expresa por los leucocitos en circulación, y forman receptores heterodiméricos junto con cualquiera de las subunidades beta-1 o beta-7 de la integrina. Ambos dímeros alfa-4 beta-1 ($\alpha 4\beta 1$, o antígeno muy tardío-4 (VLA-4)) y alfa-4 beta-7 ($\alpha 4\beta 7$) tienen un papel en la migración de los leucocitos a través del endotelio vascular y contribuyen a la activación celular y a la supervivencia dentro del parénquima.

15

20

25

El dímero alfa-4 beta-1 se une a la molécula de adhesión a células vasculares-1 (VCAM-1), que se expresa en el endotelio vascular en muchos sitios de inflamación crónica. El dímero alfa-4 beta-7 interactúa con la molécula de adhesión a células de adreína de la mucosa (MAdCAM-1), y media en el direccionamiento de linfocitos hacia el intestino.

30

Las moléculas de adhesión, tales como alfa-4-integrinas, son dianas potenciales para tratar la inflamación patológica y crónica. Los inhibidores de alfa-4 se han sometido a ensayo para determinar su potencial antiinflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. Los experimentos *in vitro* demuestran que los inhibidores de alfa-4-integrina bloquean la unión de linfocitos a las células endoteliales activadas. Los experimentos que analizan el efecto de los inhibidores de alfa-4-integrina en modelos animales que tienen una patología artificialmente inducida que simula esclerosis múltiple (EM), encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), han demostrado que los antiinhibidores de alfa-4-integrina evitan la inflamación del cerebro y la posterior parálisis en los animales. De manera análoga, se ha demostrado que los inhibidores de alfa-4-integrina protegen contra la inflamación intestinal en modelos animales de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). En su conjunto, estos experimentos identifican a los inhibidores de alfa-4-integrina como agentes potencialmente útiles para enfermedades asociadas con la inflamación patológica y crónica, tales como EM e IBD.

35

40

No obstante, no existe un método eficaz y fiable para estudiar la farmacocinética y farmacodinámica de los agentes que inhiben la alfa-4-integrina. Los métodos actualmente disponible implican, de forma típica (1) la medición de la saturación del receptor y la modulación del receptor por defecto en muestras de sangre reciente mediante citometría de flujo, o (2) el recuento de linfocito en muestras de sangre recientemente recogida. Ambos métodos se basan en el análisis de muestras recientes realizado el mismo día, lo que puede ser incómodo cuando se analizan muestras clínicas. Adicionalmente, estos métodos no se consideran medidas muy sensibles de la inhibición funcional de alfa-4-integrinas. Recientemente, Millonig et al., J. Neuroimmunol. 227: 190-194 (2010) observaron una disminución estadísticamente significativa de la VCAM-1 soluble (sVCAM) en pacientes de EM 4 semanas después de la administración de Natalizumab. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la cadena α de las alfa-4-integrinas. De manera análoga, Oppermann et al., J. Neurology 257: 1-246, (2010), El resumen n.º P667 observó una disminución en los niveles séricos de sVCAM en pacientes de EM después de tres y doce meses de tratamiento con Natalizumab. Millonig et al. sugirieron que el nivel de sVCAM alcanzó un nivel de inhibición estacionario cuatro semanas después de la primera aplicación de Natalizumab. Aunque Millonig et al. especularon que sVCAM podría ser una herramienta para controlar la eficacia del tratamiento, Millonig et al. admitieron que tanto la utilidad clínica de la correlación observada como su significancia clínica tenían que ser elucidadas aún.

45

50

55

60

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad en el campo de desarrollar métodos más eficaces y precisos, *por ejemplo*, para identificar y utilizar un biomarcador fiable, para evaluar la farmacocinética y farmacodinámica de los inhibidores de $\alpha 4$ integrina, que se puedan aplicar para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

65

Sumario

La inhibición de la actividad de alfa-4-integrina, tanto mediante anticuerpos como por moléculas pequeñas, se correlaciona con una disminución en el nivel de sVCAM y/o sMAdCAM en los fluidos corporales. La disminución en los niveles de sVCAM y/o sMAdCAM es dependiente de la dosis, y se puede observar en unos pocos días o incluso en horas. Por otro lado, la correlación entre la inhibición de la alfa-4-integrina y la disminución en los niveles de sVCAM y/o sMAdCAM se observa en individuos sanos, así como en individuos enfermos, por tanto, es independiente de la patología. Por consiguiente, sVCAM y/o sMAdCAM se pueden usar como biomarcadores farmacodinámicos para estudiar la actividad biológica de un agente tal como un anticuerpo o un fármaco que modula la actividad alfa-4-integrina. Los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos de los moduladores de alfa-4-integrina se pueden determinar, por tanto, con respecto a la actividad biológica *in vivo* del modulador, sin potenciales interferencias derivadas de metabolitos moduladores inactivos, por ejemplo. Una mejor caracterización de estos parámetros permitirá regímenes de dosificación más precisos de moduladores de alfa-4-integrina, por ejemplo, lo que puede minimizar los efectos adversos potencialmente perniciosos. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para determinar *in vitro* una diferencia en la actividad alfa-4-integrina en un individuo con una enfermedad o trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria del intestino, tal como se define en las reivindicaciones.

El método comprende:

- a) medir una molécula soluble en una primera muestra biológica obtenida de un fluido corporal del individuo seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, y plasma, inmediatamente antes de la administración de un inhibidor de alfa-4-integrina;
- b) medir la molécula soluble en una segunda muestra biológica, en la que la segunda muestra biológica se ha obtenido de un fluido corporal del individuo seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, y plasma, en un plazo de treinta y un días después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina;
- c) determinar si se ha producido una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestras biológicas, en la que la disminución está correlacionada con una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo, y determinar de esta forma si existe una diferencia en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina en comparación con la que había antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina, y
- d) determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo, en el que la no disminución, o una disminución estadísticamente muy baja ($p > 0,05$) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y segunda muestras biológicas indica una respuesta ineficaz al inhibidor de alfa-4-integrina lo que requiere un ajuste en el tratamiento del individuo;

y en el que el inhibidor de alfa-4-integrina es un anticuerpo y la molécula soluble es sVCAM.

La segunda muestra biológica se puede obtener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 días después de tratar al individuo con el inhibidor de alfa-4-integrina.

El método puede comprender además detectar una disminución en los niveles de la molécula soluble en la segunda muestra biológica comparado con la primera muestra biológica, y atribuir dicha disminución a una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina comparado con antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina.

Opcionalmente, el método puede comprender además no detectar ninguna disminución, o una disminución estadísticamente significativa poco importante ($p > 0,05$), en el nivel de la molécula soluble en la segunda muestra biológica comparado con la primera muestra biológica, y concluir que se necesita un ajuste en el tratamiento del individuo. El ajuste del tratamiento puede comprender cambiar a un inhibidor de alfa-4-integrina diferente, o aumentar la dosis del inhibidor de alfa-4-integrina.

En un aspecto, actividad alfa-4-integrina: es la actividad alfa-4 beta-1 integrina. Se divulga en el presente documento un método donde la actividad alfa-4-integrina es la actividad alfa-4 beta-7 integrina, y en el que la molécula soluble es sMAdCAM.

También se divulga en el presente documento, el individuo que recibe la administración del inhibidor de alfa-4-integrina tiene una enfermedad o trastorno asociado a una inflamación patológica o crónica. La enfermedad o trastorno se puede seleccionar del grupo que consiste en esclerosis múltiple (EM), meningitis, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes aguda de inicio juvenil, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, complicaciones derivadas de la anemia de células falciformes, lupus eritematoso, y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos. El inhibidor de alfa-4-integrina es un anticuerpo o una molécula pequeña.

También se divulga en el presente documento, que la primera y/o la segunda muestra biológica se seleccionan del

grupo que consiste en un tejido, una célula y un fluido corporal. La primera y/o la segunda muestra biológica pueden estar en la forma de plasma o suero congelado. Un fluido corporal se puede seleccionarse entre el grupo que consiste en sangre, linfa, suero, plasma, orina, semen, fluido sinovial, saliva, lágrimas, lavado broncoalveolar, y líquido cefalorraquídeo. La molécula soluble de las muestras biológicas se puede medir por un método seleccionado del grupo que consiste en enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), transferencia Western, y ensayo de detector de proteínas basado en microperlas.

También se proporciona un uso *in vitro* de sVCAM como biomarcador farmacodinámico para determinar la actividad de (i) alfa-4-integrina o (ii) un inhibidor de alfa-4-integrina, tal como se define en las reivindicaciones.

10 También se divulga en el presente documento un uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como biomarcador farmacodinámico para determinar la actividad de (i) alfa-4-integrina o (ii) un modulador de la actividad alfa-4-integrina. La actividad alfa-4-integrina puede ser una actividad alfa-4 beta-1 integrina, y el marcador farmacodinámico puede ser sVCAM. La actividad alfa-4-integrina puede ser una actividad alfa-4 beta-7 integrina, y el biomarcador farmacodinámico puede ser sMAdCAM. El modulador de la actividad alfa-4-integrina puede ser un inhibidor de alfa-4-integrina, por ejemplo, un anticuerpo o molécula pequeña. El uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como biomarcador farmacodinámico de la actividad puede ser de utilidad en un individuo que está en tratamiento con un modulador de la actividad alfa-4-integrina. El individuo puede tener una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica. La enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica se puede seleccionar del grupo que consiste en esclerosis múltiple (EM), meningitis, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes aguda de inicio juvenil, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, complicaciones derivadas de la anemia de células falciformes, lupus eritematoso, y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.

25 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos se han incorporado a la memoria descriptiva y proporcionan una ilustración no limitante de diversas realizaciones. En los dibujos:

30 La Fig. 1 representa gráficamente inhibidores de alfa-4-integrina ilustrativos (Compuestos A-D) utilizados en los Ejemplos.

La Fig. 2 representa gráficamente los niveles de sVCAM en diferentes modelos de enfermedades en ratas tratadas con inhibidores de alfa-4-integrina de molécula pequeña. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

La Fig. 3 representa gráficamente los niveles de sVCAM en ratas normales tratadas con inhibidores de alfa-4-integrina de molécula pequeña. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

40 La Fig. 4 representa gráficamente la disminución en los niveles de sVCAM en ratones normales tratados con inhibidores de alfa-4-integrina de molécula pequeña. El tratamiento de los ratones normales con los inhibidores de alfa-4-integrina no parece alterar el nivel de la molécula de adhesión intracelular soluble (sICAM). Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 3.

45 La Fig. 5 representa gráficamente que el efecto de los inhibidores de alfa-4-integrina sobre la regulación por defecto de sVCAM es dependiente de la dosis y está correlacionado con otros marcadores de la inhibición de alfa-4-integrina. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 4.

La Fig. 6 representa gráficamente la disminución en los niveles de sVCAM en ratones tratados con un anticuerpo inhibidor de alfa-4-integrina. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 5.

La Fig. 7 representa gráficamente la disminución de los niveles de sVCAM en ratones tratados con un inhibidor de alfa-4-integrina de molécula pequeña no pegilada. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 6.

55 La Fig. 8 representa gráficamente que los efectos de la inhibición de alfa-4-integrina sobre los niveles de sVCAM son dependientes de la dosis, y desaparecen a medida que los niveles del inhibidor de alfa-4-integrina en plasma disminuyen. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 7.

60 La Fig. 9 representa gráficamente que la inhibición de alfa-4-integrina da como resultado la regulación por defecto de sMAdCAM en varios modelos de colitis en ratón. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 8.

65 La Fig. 10 representa gráficamente que la inhibición de alfa-4-integrina mediante un inhibidor de molécula pequeña da como resultado la regulación por defecto de sMAdCAM en ratones normales. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 9.

La Fig. 11 representa gráficamente que la inhibición de alfa-4-integrina mediante un anticuerpo inhibidor da como resultado la regulación por defecto de sMAdCAM en ratones normales. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 10.

5 La Fig. 12 representa gráficamente que la regulación por defecto de sMAdCAM con inhibidores de alfa-4-integrina es dependiente de la dosis, reversible, y está correlacionada con la selectividad in vitro del inhibidor de alfa-4-integrina por el heterodímero de alfa-4 beta-7 integrina. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 11.

10 La Fig. 13 representa gráficamente la regulación por defecto selectiva de sVCAM con un inhibidor de alfa-4-integrina que se une selectivamente al heterodímero alfa-4 beta-1 integrina. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 11.

15 La Fig. 14 representa gráficamente la correlación entre los niveles de sVCAM/sMAdCAM y los niveles de la alfa-4-integrina en ratones. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 12.

Descripción detallada

1. Definiciones

20 Tal como se usa en el presente documento, un "individuo" puede ser cualquiera de los animales mamíferos (por ejemplo, animales domesticados), incluyendo seres humanos, perro, gato, ganado vacuno, caballo, cabras, cerdo, suínido, oveja, mono, rata, y ratón. En una realización, el individuo puede ser un ser humano.

25 La expresión "inflamación patológica y crónica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una inflamación inadecuada asociada con trastornos entre los que se incluyen, aunque no de forma limitativa, asma, aterosclerosis, demencia por SIDA, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra hospedador, esclerosis múltiple (especialmente en la EM que implica desmielinización adicional), por ejemplo, esclerosis múltiple primaria progresiva (PPMS), esclerosis múltiple secundaria progresiva (SPMS), esclerosis múltiple con recaída-remisión (RRMS), y esclerosis múltiple con recaída progresiva (PRMS), metástasis tumoral, nefritis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, complicaciones derivadas de la anemia de células falciformes, lupus eritematoso, y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos. Dicha inflamación está caracterizada por una respuesta inflamatoria aumentada de las células inflamatorias, incluidos los leucocitos infiltrantes. Con el tiempo, dicha inflamación patológica frecuentemente da como resultado daños tisulares en la región de la inflamación adecuada.

30 La expresión "actividad alfa-4-integrina" tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad accesible de alfa-4-integrinas, incluidos ambos dímeros alfa-4 beta-1 y alfa-4 beta-7, presentadas sobre la superficie de células leucocitarias. La actividad alfa-4-integrina se puede determinarse utilizando cualquier técnica conocida en la materia. Por ejemplo, la actividad alfa-4-integrina se puede evaluar directamente mediante citometría usando un anticuerpo marcado de forma fluorescente específico de las alfa-4-integrinas. Véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 7.807.167. Como alternativa, la actividad alfa-4-integrina se puede evaluar indirectamente midiendo la infiltración de leucocitos en muestras de tejidos. Véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 7.435.802; véase también Krumbholz et al., Neurology 71: 1350-1354 (2008).

45 El término "muestra biológica" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material biológico procedente de un individuo. Una muestra biológica puede ser, a modo de ejemplo no limitantes, un tejido, célula, sangre completa, suero, fluidos corporales, fluido plasmático, muestra de tejido de autopsia (por ejemplo, cerebro, piel, ganglios linfáticos, médula espinal), células cultivadas o sobrenadantes de células cultivadas. La muestra biológica utilizada variará dependiendo del formato del ensayo, el método de detección, y la naturaleza de la muestra a analizar. Los métodos para preparar muestras biológicas son bien conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para obtener una muestra biológica que sea compatible con el método utilizado.

50 El término "fluido corporal" usado en el presente documento incluye fluidos que se encuentran en individuos. Incluyen fluidos que se excretan o secretan por el cuerpo, así como fluidos que normalmente no se excretan o secretan. Estos fluidos incluyen, a modo de ejemplo no limitantes, humor acuoso, sangre, suero, fluido intersticial, linfa, moco, fluido pleural, saliva, plasma, orina, semen, lágrimas, fluido sinovial, fluido de heridas, y/o líquido cefalorraquídeo. Normalmente, la sangre incluyendo suero sanguíneo y plasma sanguíneo se utilizan en las presentes realizaciones.

60 Las expresiones "se une específicamente" o "específicamente se une" tal como se usa en el presente documento significan que un elemento de una pareja de ligandos específicos no mostrará ninguna unión estadísticamente significativa a moléculas que no sean su ligando específico correspondiente. Un ligando específico puede mostrar al menos 1000 veces la afinidad de unión (medida como una constante de asociación aparente) por su ligando específico correspondiente que por un ligando no específico. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a una alfa-4-integrina con una afinidad de unión de 10^7 moles/l o más, de forma típica 10^8 moles/l o más, se dice que se unen

específicamente a una alfa-4-integrina.

La expresión "kit diagnóstico" tal como se usa en el presente documento incluye de forma típica un sistema de detección con diferentes envases y/o reactivos que son necesarios para la evaluación cuantitativa y/o cualitativa de un biomarcador. Los kits incluyen, por lo general, instrucciones para utilizar los reactivos y/o los anticuerpos de diagnóstico. Los anticuerpos, así como cualquiera de los reactivos, se pueden proporcionar en forma de un líquido, polvo, comprimido, o suspensión. Los anticuerpos y/o los reactivos se pueden proporcionar en envases separados adecuados para su aplicación independiente.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia. Se debe indicar que, tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia al término "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y la referencia al término "la dosificación" incluye la referencia a una o más dosificaciones o y equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

2. Inhibidores de alfa-4-integrina

Varios tipos de inhibidores de alfa-4-integrina que tienen la capacidad de unirse e inhibir la actividad alfa-4-integrina se pueden usar en las presentes realizaciones. Muchos de estos inhibidores se han identificado y caracterizado, y se describen a continuación ejemplos representativos. Dadas las enseñanzas divulgadas en el presente documento, está bien comprendido en las capacidades del experto en la materia identificar otros inhibidores de alfa-4-integrina que serán capaces de inhibir los dímeros de integrina que comprenden alfa-4 de una forma que imite biológicamente o que sea similar a los inhibidores específicamente descritos. Las presentes realizaciones también incluyen la administración crónica de dichos inhibidores y combinaciones de los mismos.

2.1. Anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos

En una realización, los inhibidores de alfa-4-integrina son anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos que se unen selectivamente a una alfa-4-integrina o a un dímero que comprende alfa-4, tales como alfa-4 beta-1 o alfa-4 beta-7. Los anticuerpos contra alfa-4-integrina representativos son conocidos en la técnica, incluidos, por ejemplo, (1) Natalizumab, divulgado en las patentes de Estados Unidos números 5.168.062, 5.385.839, 5.730.978, 5.840.299, 6.033.665 y 6.602.503, (2) los anticuerpos CD49d fabricados por Biolegend (San Diego, CA); y (3) PS/2 que es un anticuerpo de rata dirigido contra alfa-4-integrina de ratón (el hibridoma PS/2 está disponible de la ATCC (Rockville, MD)). Ejemplos no limitativos de anticuerpos dirigidos contra alfa-4-integrina incluyen los divulgados en las patentes de Estados Unidos números 5.565.332, 5.733.743, 5.837.242, 5.858.657, 5.871.734, 5.871.907, 5.872.215, 5.885.793, 5.888.507, 5.932.214, 5.969.108, 6.140.471, 6.172.197, 6.180.336, 6.225.447 y 7.176.184.

En una realización, el inhibidor de alfa-4-integrina puede ser un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo puede estar químicamente modificado, por ejemplo, mediante pegilación. Adicionalmente, se pueden identificar otros anticuerpos usando técnicas disponibles en la materia. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos capaces de unirse específicamente a alfa-4-integrina usando tecnología de expresión en fagos. Los fragmentos de anticuerpo que se une selectivamente a una alfa-4-integrina o a un dímero que comprende una alfa-4-integrina se pueden aislar a continuación. Los métodos ilustrativos para producir dichos anticuerpos mediante la expresión en fago se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 6.225.447, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir usando los procedimientos de hibridoma convencionales. Estos métodos se han aplicado ampliamente para producir líneas celulares híbridas que secretan elevados niveles de anticuerpos monoclonales dirigidos contra muchos antígenos específicos, y también se pueden usar para producir anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a alfa-4-integrinas. Por ejemplo, ratones (por ejemplo, ratones Balb/c) se pueden inmunizar con un epítipo de alfa-4-integrina antigénico mediante inyección intraperitoneal. Una vez ha pasado tiempo suficiente para permitir la respuesta inmunitaria, los ratones se sacrifican, y las células del bazo se obtienen y se fusionan con células de mieloma, usando técnicas bien conocidas en la materia. Las células fusionadas resultantes, hibridomas, se hacen crecer a continuación en medio selectivo, y las células que sobreviven crecen en dicho medio usando condiciones de dilución limitante. Tras clonación y reclonación, los hibridomas se pueden aislar según los anticuerpos que secretan (por ejemplo, de la clase IgG o IgM o de la subclase IgG 1) que se unan selectivamente a la diana, alfa-4-integrina o un dímero que comprende una alfa-4-integrina. Para producir agentes específicos para uso en seres humanos, el anticuerpo monoclonal aislado se puede utilizar a continuación para producir anticuerpos quiméricos y humanizados.

Los anticuerpos que se puede utilizar como inhibidores de alfa-integrina incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión en Fab, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo por ejemplo, anticuerpos anti-Id

dirigidos contra anticuerpos de las presentes realizaciones), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Normalmente, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo que se unen a un antígeno humano, que incluyen, aunque no de forma limitativa, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs con enlaces disulfuro (sdFv), y fragmentos que comprenden un dominio tanto VL como VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o combinadas con la totalidad o una parte de lo siguiente: la región bisagra, los dominios CH1, CH2, y CH3. También se incluyen los fragmentos de unión a antígeno que pueden comprender cualquier combinación de la región o regiones variables con una región bisagra, los dominios CH1, CH2, y CH3. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal, incluidas aves y mamíferos. Normalmente, los anticuerpos son anticuerpos de ser humano, murino (por ejemplo, rata y ratón), burro, oveja, mono, conejo, cabras, cobaya, cerdo, camello, caballo o gallina (u otra ave). Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe, por ejemplo en, la patente de Estados Unidos n.º 5.939.598.

Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden producir a partir de anticuerpos no humanos, y pueden tener una afinidad de unión igual o similar a la del anticuerpo a partir del cual se producen. Las técnicas para producir anticuerpos quiméricos (Morrison et al., 1984 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 6851; Neuberger et al., 1984 Nature 312: 604; Takeda et al., 1985 Nature 314: 452) incluyen el corte y empalme de genes de, *por ejemplo*, una molécula de anticuerpo de ratón con la especificidad antigénica adecuada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano con la actividad biológica adecuada. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una región variable (V) de un anticuerpo monoclonal de ratón se puede unir a un ácido nucleico que codifica una región constante (C) humana, *por ejemplo*, IgG1 o IgG4. El anticuerpo resultante es, por tanto, un híbrido de las especies, por lo general, con el dominio de unión al antígeno derivado del anticuerpo no humano y el dominio C o efector derivado de un anticuerpo humano o de primate.

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos con regiones variables principalmente derivadas de un anticuerpo humano (es decir, el anticuerpo aceptor), pero que tienen regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente derivadas de un anticuerpo no humano (el anticuerpo donante). Véanse, *por ejemplo*, Queen y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989); documento WO 90/07861, las patentes de Estados Unidos números 7.435.802, 6.054.297; 5.693.761; 5.585.089; 5.530.101; y 5.224.539. La región o regiones constantes de estos anticuerpos también proceden, por lo general, de un anticuerpo humano. Los dominios variables humanos se suelen seleccionar, de forma típica, de anticuerpos humanos que tienen secuencias que presentan una homología elevada con los dominios de unión a la región variable no humana deseada. Los restos variables de las cadenas pesada y ligera se pueden derivar del mismo anticuerpo, o de un anticuerpo humano diferente. De forma adicional, las secuencias se pueden seleccionar como el consenso de varios anticuerpos humanos, tal como se describe en el documento WO 92/22653.

Un "anticuerpo Primatized™" es un anticuerpo recombinante que contiene secuencias variables o porciones de unión a antígeno de primate, y secuencias del dominio constante humano. Véanse, *por ejemplo*, Newman, Bio/Technology, 1992, 10: 1455-60. La primatización de anticuerpos da como resultado la generación de anticuerpos que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Véanse, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 6.113.898. Esta técnica modifica los anticuerpos de forma que no se rechacen cuando se administran a seres humanos, puesto que son antigénicos. Esta técnica se basa en la inmunización de macacos con antígenos o receptores humanos. Esta técnica se desarrolló para crear anticuerpos monoclonales de elevada afinidad dirigidos a los antígenos de la superficial celular humana.

Los aminoácidos específicos dentro de la región variable humana se seleccionan para sustitución basándose en la conformación prevista y en las propiedades de unión al antígeno. Esto se puede determinarse usando técnicas tales como la modelización informática, predicción del comportamiento y de las propiedades de los aminoácidos en determinadas ubicaciones dentro de la región variable, y observación de los efectos de la sustitución. Por ejemplo, cuando una región de aminoácidos difiere entre una región variable no humana y una región variable humana región, la región variable humana se puede alterar para reflejar la composición de aminoácidos de la región variable no humana. En una realización específica, los anticuerpos utilizados en el régimen de dosificación crónico son anticuerpos humanizados tal como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 5.840.299. En otra realización, ratones transgénicos que contienen genes de anticuerpos humanos se pueden inmunizar con una estructura antigénica de alfa-4-integrina y se puede utilizar tecnología de hibridomas para generar anticuerpos humanos que se unen selectivamente a la alfa-4-integrina.

Se pueden producir anticuerpos quiméricos, humanos, primatizados y/o humanizados mediante el uso de la expresión recombinante, *por ejemplo*, expresión en hibridomas humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)), en células de mieloma, o en células de ovario de hámster chino (CHO). Como alternativa, las secuencias codificantes de anticuerpos se pueden incorporar a transgenes para su introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico. Véanse, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 6.197.946. Los transgenes adecuados incluyen transgenes

que tienen un promotor y/o un potenciador derivado de un gen específico de la glándula mamaria, por ejemplo, caseína o β -lactoglobulina.

2.2. Moléculas pequeñas

5 Las moléculas pequeñas moléculas para usar en las presentes realizaciones pueden abarcar compuestos que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 4.000 Daltons. Como alternativa, estos compuestos pueden tener cadenas de polietilenglicol unidas covalentemente (es decir, pegilación) para mejorar algunas propiedades de los compuestos, por ejemplo, semivida prolongada, penetración en los tejidos mejorada, y solubilidad mejorada. De esta forma, los conjugados pegilados pueden tener un peso molecular de al menos aproximadamente 40 kilodalton (kDa). Los inhibidores de alfa-4-integrina comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, especialmente enlaces de hidrógeno, y puede incluir un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, de forma típica, al menos dos grupos químicos funcionales. Los inhibidores de alfa-4-integrina comprenden frecuentemente estructuras cíclicas o heterocíclicas de carbono y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriormente descritos. Los inhibidores de alfa-4-integrina pueden incluir, aunque no de forma limitativa: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de alfa-4-integrina se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números, 5.998.447 (heterociclos), 6.034.238 (compuestos heterocíclicos), 6.331.552 (imidazolidina sustituida), 6.399.643 (derivados es espiroimidazolidina), 6.423.712 (derivados de imidazolidina 2,4-sustituida), 6.514.952 (derivados de hidantoína), 6.521.654 (derivados de imidazolidina sustituida), 6.667.331 (compuestos no de peptidilo), 6.667.334 (derivados de imidazolidina), 6.668.527 (compuestos no de peptidilo), 6.680.333 (derivados de imidazolidina), 6.756.378, 6.759.424 (derivados de imidazolidina), 6.838.439 (heterocitos), 6.903.128 (compuestos no de peptidilo), 6.962.937 (derivados de imidazolidina), 7.179.819 y 7.196.112. Algunos inhibidores de alfa-4-integrina de molécula pequeña representativos se muestran en la Fig. 1.

2.3. Péptidos anti-alfa-4-integrina

30 Las presentes realizaciones también incluyen cualquier péptido que sea capaz de unirse a una alfa-4-integrina o un dímero que comprende una subunidad alfa-4. Se han incluido péptidos que son prácticamente homólogos de una región de la matriz extracelular o un ligando natural de una región de la matriz extracelular o un ligando natural del receptor o receptores de la alfa-4-integrina específicos que son la diana. Por ejemplo, para la inhibición crónica del receptor alfa-4 beta-1, se pueden usar péptidos que comprenden al menos una parte de la región de fibronectina III CS (por ejemplo, péptidos que comprenden al menos una parte de la secuencia peptídica de CS-1 o una secuencia prácticamente homóloga de la secuencia de CS-1) para unirse a un receptor e inhibir la actividad de la integrina que comprende la alfa-4. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.238.668.

3. Uso de inhibidores de alfa-4-integrina para tratar enfermedades asociadas con la inflamación patológica o crónica

40 Los inhibidores de alfa-4-integrina se pueden usar para tratar diversas enfermedades asociadas con la inflamación patológica o crónica bloqueando las interacciones dependientes de alfa-4. La interacción dependiente de alfa-4 con el ligando VCAM-1 en las células endoteliales es un evento temprano en muchas respuestas inflamatorias, incluidas las del sistema nervioso central. Las enfermedades y dolencias indeseadas resultado de la inflamación y que tienen agravamientos clínicos agudos y/o crónicos incluyen la esclerosis múltiple (Yednock et al., 1992 Nature 356: 63; Baron et al., 1993 J. Exp. Med. 177: 57), meningitis, encefalitis, ictus, otros traumatismos cerebrales, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluida colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (EC) (Hamann et al., 1994 J. Immunol. 152: 3238; Podolsky et al., 1993 J. Clin. Invest. 92: 372), artritis reumatoide (van Dinther-Janssen et al., 1991 J. Immunol. 147: 4207; van Dinther-Janssen et al., 1993 Annals Rheumatic Diseases 52: 672; Elices et al., 1994 J. Clin. Invest. 93: 405; Postigo et al., 1992 J. Clin. Invest. 89: 1445), asma (Mulligan et al., 1993 J. Immunol. 150: 2407) y diabetes aguda de inicio juvenil (Tipo 1) (Yang et al., 1993 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 10494; Burkly et al., 1994 Diabetes 43: 529; Baron et al., 1994 J. Clin. Invest. 93: 1700), demencia inducida por SIDA (Sasseville et al., 1994 Am. J. Path. 144: 27); aterosclerosis (Cybulsky et al., 1991 Science 251: 788-91, Li et al., 1993 Arterioscler. Thromb. 13: 197), nefritis (Rabb et al., 1995 Springer Semin. Immunopathol. 16: 417-25), retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, complicaciones derivadas de la anemia de células falciformes, lupus eritematoso, y lesión grave de pulmón mediada por leucocitos, tal como la que se produce en el síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

60 La enfermedad inflamatoria del intestino es un término colectivo para dos enfermedades similares denominadas enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa. La EC es una enfermedad inflamatoria ulceroconstrictiva idiopática crónica caracterizada por una implicación fuertemente delimitada y normalmente transmural de todas las capas de la pared intestinal por una reacción inflamatoria granulomatosa. Cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, puede estar implicada, aunque la enfermedad suele afectar al íleon terminal y/o al colon. La colitis ulcerosa es una respuesta inflamatoria limitada en gran medida a la mucosa y submucosa colónica. Los linfocitos y macrófagos son numerosos en las lesiones de la enfermedad inflamatoria del intestino, y pueden contribuir a la lesión inflamatoria.

El asma es una enfermedad caracterizada por una respuesta aumentada del árbol traqueobronquial a diversos estímulos que potencian la constricción paroxística de las vías respiratorias bronquiales. Los estímulos ocasionan la liberación de los diferentes mediadores de la inflamación desde los mastocitos revestidos con IgE incluidos la histamina, factores quimiotácticos eosinófilos y neutrófilos, leucotrienos, prostaglandina y factor de la activación plaquetaria. La liberación de estos factores recluta basófilos, eosinófilos y neutrófilos, que ocasionan lesiones inflamatorias.

Aterosclerosis es una enfermedad de las arterias (por ejemplo, coronaria, carótida, aorta e ilíaca). La lesión básica, el ateroma, consiste en una placa focal generada dentro de la íntima, que tiene un núcleo de lípido y una cubierta de tapón fibroso. Los ateromas alteran negativamente el flujo sanguíneo arterial, y debilitan las arterias afectadas. Los infartos de miocardio y cerebrales son una consecuencia importante de esta enfermedad. Los macrófagos y los leucocitos se reclutan hacia los ateromas y contribuyen a la lesión inflamatoria.

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica recurrente que principalmente ocasiona alteraciones y destrucción de las articulaciones. Normalmente, la artritis reumatoide afecta en primer lugar a las pequeñas articulaciones de las manos y los pies, pero posteriormente puede afectar a las muñecas, codos, tobillos y rodillas. La artritis es el resultado de la interacción de las células sinoviales con los leucocitos que se infiltran desde la circulación al revestimiento sinovial de las articulaciones. Véanse, por ejemplo, Paul, Immunology 3ª ed., Raven Press, 1993.

Los inhibidores de alfa-4-integrina se pueden usar en el tratamiento del rechazo del órgano o del injerto. En los últimos años, se ha producido un notable aumento en la eficacia de las técnicas quirúrgicas para trasplantar tejidos y órganos tales como la piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás, el principal problema más notable es la falta de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor del aloinjerto o del órgano trasplantado. Cuando células u órganos alogénicas se trasplantan a un hospedador (es decir, el donante y el aceptor son individuos diferentes de la misma especie), es probable que el sistema inmunitario del hospedador desencadene una respuesta inmunitaria a los antígenos extraños el trasplante (enfermedad del hospedador contra el injerto) que conduce a la destrucción del tejidos trasplantado. Los linfocitos CD8+, los linfocitos CD4+, y los monocitos están implicados en el rechazo de los tejidos trasplantados. Los anticuerpos dirigidos contra alfa-4-integrina son útiles, *entre otras*, para bloquear las respuestas inmunitarias inducidas por aloantígenos en el aceptor evitando de esta forma que dichas células participen en la destrucción del tejido u órgano trasplantado. Véanse, por ejemplo, Paul et al., 1996 Transplant International 9: 420-425; Georczynski et al., 1996 Immunol. 87: 573-580; Georczynski et al., 1995 Transplant. Immunol. 3: 55-61; Yang et al., 1995 Transplantation 60: 71-76; y Anderson et al., 1994 APMIS 102: 23-27. Un uso relacionado de los inhibidores de alfa-4-integrina es modular la respuesta inmunitaria implicada en la enfermedad de "injerto contra hospedador" (GVHD). Véanse, por ejemplo, Schlegel et al., J. Immunol. 155: 3856-3865 (1995). La GVHD es una enfermedad potencialmente mortal que se produce cuando células inmunocompetentes se transfieren a un receptor alogénico. En esta situación, Las células inmunocompetentes del donante pueden atacar los tejidos del receptor. Los tejidos de la piel, epitelio intestinal y hepático son dianas frecuentes, y pueden quedar destruidas durante la GVHD. La enfermedad supone un problema especialmente grave cuando se va a trasplantar tejido inmunitario, tal como en el trasplante de médula ósea; pero también se ha documentado una GVHD menos grave también en otros casos, incluidos los trasplantes de corazón e hígado. Los inhibidores de alfa-4-integrina se utilizan, *entre otras*, para bloquear la activación de los linfocitos T del donante, interfiriendo de esta forma con su capacidad para lisar células diana en el hospedador.

Los inhibidores de alfa-4-integrina pueden ser útiles para inhibir la metástasis tumoral. Se han documentado diferentes células tumorales que expresan alfa-4 integrina, y se han documentado anticuerpos contra alfa-4-integrina que bloquean la adhesión de estas células a células endoteliales. Véanse, por ejemplo, Steinback et al., 1995 Urol. Res. 23: 175-83; Orosz et al., 1995 Int. J. Cancer 60: 867-71; Freedman et al., 1994 Leuk Lymphoma 13: 47-52; y Okahara et al., 1994 Cancer Res. 54: 3233-6.

Los inhibidores de alfa-4-integrina pueden ser útiles en el tratamiento de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmunitaria neurológica progresiva que afecta de aproximadamente 250.000 a 350.000 personas en Estados Unidos. Se cree que la esclerosis múltiple es el resultado de una reacción autoinmunitaria específica en la que determinados leucocitos atacan e inician la destrucción de la mielina, la vaina de cobertura aislante de las fibras nerviosas. En un modelo animal de la esclerosis múltiple, los anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra la alfa-4 beta-1 integrina han demostrado bloquear la adhesión de leucocitos al endotelio, y prevenir de esta forma la inflamación del sistema nervioso central y la posterior parálisis de los animales. El inicio de la EM puede ser dramático o tan leve como para que el paciente no busque atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad en una o más extremidades, visión borrosa debida a la neuritis óptica, alteraciones sensoriales, diplopía, y ataxia. La evolución de la enfermedad puede clasificarse en tres categorías generales: (1) EM con recaídas, (2) EM crónica progresiva, y (3) EM inactiva. La EM con recaídas se caracteriza por crisis recurrentes de disfunción neurológica. Las crisis de EM evolucionan generalmente de días a semanas y pueden ir seguidas de una recuperación completa o parcial, o ninguna recuperación. La recuperación de los ataques se produce generalmente entre varias semanas y varios meses desde el máximo de los síntomas, aunque la recuperación rara vez continúa durante 2 años o más. La EM crónica progresiva da como resultado un empeoramiento gradual progresivo sin períodos de estabilización o remisión. Esta forma se desarrolla en pacientes

con antecedentes de EM con recaídas, aunque en el 20 % de los pacientes, no se recuerdan recaídas. Las recaídas agudas también se pueden producir durante la evolución progresiva. Una tercera forma es la EM inactiva. La EM inactiva se caracteriza por deficiencias neurológicas fijas de magnitud variable. La mayoría de los pacientes con EM inactiva tienen antecedentes de EM con recaídas. La evolución de la EM también depende de la edad del paciente.

5 Por ejemplo, factores de pronóstico favorables incluyen inicio temprano (excluida la infancia), una evolución con recaídas y poca discapacidad residual 5 años después del inicio. En contraste un mal pronóstico está asociado con una edad tardía del inicio (es decir, edad de 40 años o mayor) y una evolución progresiva. Estas variables son interdependientes, ya que la EM crónica progresiva tiende a comenzar a una edad más tardía que la EM con recaídas. La discapacidad derivada de la EM crónica progresiva se debe normalmente a la paraplejía o tetraplejía

10 progresiva de un paciente individual.

Los inhibidores de alfa-4-integrina se pueden usar con cantidades efectivas de otros agentes terapéuticos contra la inflamación aguda o crónica. Dichos agentes incluyen otros antagonistas de las moléculas de adhesión (por ejemplo, otras integrinas, selectinas, y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig)). Véanse, por ejemplo,

15 Springer, 1990 Nature 346: 425-433; Osborn, 1990 Cell 62: 3; Hynes, 1992 Cell 9: 11. Otros agentes antiinflamatorios que se pueden usar junto con los inhibidores de alfa-4-integrina incluyen anticuerpos y otros antagonistas de citoquinas, tales como las interleuquinas de IL-1 a IL-13, factores α y β de necrosis tumoral, interferones α , β , y γ , factor beta de crecimiento tumoral (TGF- β), factor estimulador de las colonias (CSF) y factor estimulador de las colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF). Otros agentes antiinflamatorios también pueden

20 incluir anticuerpos y otros antagonistas de quimioquinas tales como MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, exotaxina, e IL-8. Otros agentes inflamatorios adicionales pueden incluir además AINE, esteroides, y otros inhibidores de molécula pequeña de la inflamación.

4. Uso de inhibidores de alfa-4-integrina para tratar enfermedades autoinmunitarias

25 Los inhibidores de alfa-4-integrina también se pueden usar para tratar diversas enfermedades autoinmunitarias. En el presente documento, una enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad o trastorno que procede y se dirige contra los propios tejidos de un individuo o un segregado simultáneo o manifestación del mismo o dolencia resultante del anterior. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, aunque no de forma limitativa artritis (artritis reumatoide, tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, gota o artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inmunitaria aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral, y artritis reumatoide de inicio juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, y espondilitis anquilosante), enfermedades cutáneas inflamatorias

30 hiperproliferativas, psoriasis tales como psoriasis en placas, psoriasis en gota, psoriasis pustular, y psoriasis de las uñas, atopía, incluidas las enfermedades atópicas tales como la fiebre del heno y el síndrome de Job, dermatitis incluida la dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria, y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM vinculado a X, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria tal como la urticaria alérgica crónica y la urticaria idiopática crónica, incluida la urticaria crónica autoinmunitaria, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrosis epidérmica crónica, escleroderma (incluido es escleroderma sistémico), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como la EM espinodorsal, EM primaria progresiva (PPMS), y EM en remisión con recaída (RRMS), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica,

35 neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (por ejemplo, enfermedades gastrointestinales mediadas de forma autoinmunitaria, colitis tal como colitis ulcerosa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrosante, y colitis transmural colitis, enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria), inflamación del intestino, pioderma gangrenoso, eritema nudoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de dificultad respiratoria, incluido el síndrome de estrés respiratorio en el adulto o agudo (ARDS), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, lesión de los nervios craneales, como en la meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito del escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmunitaria, pérdida súbita de la audición debida a una dolencia autoinmunitaria, enfermedades mediadas por IgE tales como la anafilaxia y la rinitis atópica, encefalitis tal como la encefalitis de

40 Rasmussen y la encefalitis líbica o del pedúnculo cerebral, uveítis, tal como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis faoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN inmunomediada, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN proliferativa membranoproliferativa o proliferativa membranosa (MPGN), incluidos el

45 Tipo I y el Tipo II, y la GN rápidamente progresiva, nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmunitaria, balanitis incluida balanitis plasmacelular circunscrita, balanopostitis, eritema anular centrífugo, eritema discrómico persistente, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nítido, liquen esclerósico y atrófico, neurodermatitis localizada, liquen espinoso, liquen plano, ictiosis laminar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenoso, dolencias y respuestas alérgicas, reacción alérgica, eczema incluido el eczema alérgico o atópico, eczema esteatótico, eczema dishidrótico, y eczema vesicular palmoplantar, asma tal como asma bronquial, asma bronquial, y asma autoinmunitario, dolencias que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas

50
55
60
65

inflamatorias crónicas, reacciones inmunitarias contra antígenos extraños tales como los grupos sanguíneos fetales A-B-O durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus, incluida la nefritis lúpica, lupus cerebral, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra-renal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus con alopecia, lupus sistémico eritematoso (LSE) tal como

5 LSE cutáneo o LSE cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (SLN), y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluida diabetes mellitus insulino dependiente pediátrica (IDDM), diabetes mellitus de inicio en el adulto (diabetes de tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, trastorno diabético de las arterias grandes, respuestas inmunitarias asociadas con una

10 hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluida la granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculítides, incluidas vasculitis, vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de los vasos intermedios (incluida la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrosante tal como vasculitis necrosante sistémica, y la vasculitis

15 relacionada con ANCA, tal como la vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS) y vasculitis de vasos pequeños relacionada con ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria que incluye la anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia o aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia en factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión multiorgánica tal como la secundaria a septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por el

20 complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide, tal como penfigoide ampolloso y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluidos pénfigo vulgar, pénfigo filiar, pénfigo mucoso-penfigoide de la membrana, y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica, preeclampsia, un trastorno del complejo inmunitario tal como nefritis del complejo inmunitario, nefritis mediada por anticuerpos, polineuropatías, neuropatía crónica tales como neuropatías de IgM o neuropatía

25 mediada por IgM, trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluidas púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura posterior a la transfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina, y trombocitopenia autoinmunitaria o inmunomediada, tal como la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) incluida la ITP crónica o aguda, escleritis tal como la ceratoescleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario incluidas la orquitis autoinmunitaria y la ooforitis, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluida la tiroiditis tal como la tiroiditis

30 autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad del tiroides autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), síndromes paraneoplásicos, incluidos los síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como el síndrome miasténico de Lambert-Eaton el síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o de la persona rígida, encefalomiелitis

35 tales como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave, tal como miastenia grave asociada con tioma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclonos o síndrome opsoclonos mioclonos (OMS), y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfocítica (LIP), bronquiolitis obliterante (sin trasplante)

40 frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis por IgA lineal, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatitis acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y pneumocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, enfermedad celiaca o coeliaca, celiaquía (enteropatía por gluten), esprúe resistente al tratamiento, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las arterias

45 coronarias, enfermedad auditiva autoinmunitaria, tal como la enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), pérdida de la audición autoinmunitaria, policondritis tal como policondritis resistente al tratamiento, con recaídas o recidiva, proteinosis pulmonar alveolar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosacea autoinmunitaria, dolor asociado con zóster, amiloidosis, linfocitosis no cancerosa, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammopatía monoclonal benigna y gammopatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), neuropatía periférica,

50 síndrome paraneoplásico, canelopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal o segmental o glomeruloesclerosis focal segmental (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, corioretinitis, trastorno hepatológico autoinmunitario, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinantes tales como las enfermedades

55 desmielinantes autoinmunitarias y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, por ejemplo, debida a anticuerpos contra espermatozoides, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del grangero, eritema multiforme, síndrome posterior a cardiectomía, síndrome de Cushing, pulmón de Bird-Fancier, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal

65

como alveolitis alérgico y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a la transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias tal como la leishmaniasis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergillosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis del endomiocardio, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis

5 cística, endoftalmitis, eritema elevado y diutino, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica), o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por ecovirus, septicemia, endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubeola, síndromes posteriores a la vacunación,

10 infección por rubeola congénita, infección por el virus Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis posterior a estreptococos, tromboangitis obliterans, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis por hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión isquémica familiar benigna y por reperusión, reperusión de órgano trasplantado, autoinmunidad retinal,

15 inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad pulmonar/de las vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioescleróticos, aspermiogénesis, hemolisis autoinmunitaria, enfermedad de Boek, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia faeoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nudoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida de la audición sensorial, hemoglobinuria paroxísmica, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia del simpático, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, vitíligo, síndrome de choque tóxico, envenenamiento por alimentos, dolencias que implican la infiltración de linfocitos T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas con una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por las citoquinas y linfocitos T, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión multiorgánica, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, oftalmia del simpático, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixto, síndrome nefrítico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto

30 (AOIH), cardiomiopatía tal como la cardiomiopatía dilatada, epidermolisis ampollosa adquirida (EAA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrítico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoide, frontal, maxilar, o esenoide, y trastorno relacionado con eosinófilos tal como eosinofilia, infiltración pulmonar de eosinófilos, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löffler, neumonía eosinófila crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma, o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativa, enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, colangitis esclerosante, esclerótica, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectasis, trastornos autoinmunitarios relacionados con enfermedades del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, linfadenitis, reducción en la respuesta de la tensión arterial, disfunción vascular, lesión tisular,

40 isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral, y enfermedades que acompañan la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritidas, lesión por reperusión, trastorno isquémico por reperusión, lesión del miocardio o de otros tejidos por reperusión, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia multiorgánica, enfermedades ampollasas, necrosis de la corteza renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados a transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citoquinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis, y endometriosis.

5. Uso de inhibidores de alfa-4-integrina para tratar cáncer

50 Los inhibidores de alfa-4-integrina también se pueden usar para tratar el cáncer. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos N.º. 20090312353. El término cáncer abarca una colección de neoplasias donde cada cáncer de cada órgano consiste en numerosos subconjuntos. Normalmente, en el momento del diagnóstico del cáncer, "el cáncer" consiste, de hecho, en múltiples subpoblaciones de células con diferentes características genéticas, bioquímicas, inmunológico, y biológicas.

Los tipos de cánceres a tratar mediante un inhibidor de alfa-4-integrina pueden ser los que muestran alfa-4-integrinas o sus ligandos (por ejemplo, los ligandos de alfa-4-integrinas incluyen VCAM-1 y/o MAdCAM-1). Los cánceres representativos incluyen, aunque no de forma limitativa, neoplasias hematológicas, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), y mieloma múltiple (MM). Las leucemias pueden ser linfoblásticas o mielógenas. La leucemia linfoblástica (o linfocítica) afecta a los linfocitos. La leucemia mielógena afecta a los mielocitos.

65 Las enfermedades neoplásicas linfocíticas se pueden caracterizar por una expansión masiva de un único clon de linfocitos B, detectable por la medida de una producción en exceso de anticuerpos, medido en un el ensayo de electroforesis de proteínas, o citometría de flujo de sangre periférica. Dicha expansión se denomina "monoclonal", y

- los anticuerpos monoclonales producidos mediante este tipo de linfocitos B puede causar enfermedades tales como la amiloidosis y el lupus, o puede ser indicativo de una neoplasia maligna subyacente. El concepto de clonalidad está estrechamente asociado con una neoplasia maligna, por ejemplo, para diagnosticar lesiones cutáneas linfomatoideas. Los médicos suelen interpretar la expansión de un clon concreto de linfocitos B como una evidencia del crecimiento celular sin restricciones, la piedra miliar del cáncer. La leucemia linfoide (o leucemia linfocítica) es un tipo de leucemia que afecta al tejido linfoide. Estas leucemias se suelen dividir según la etapa de maduración en la que la población linfoide clonal (neoplásica) ha detenido la maduración (es decir, la leucemia linfoblástica aguda o crónica).
- 5 La leucemia linfoblástica aguda (LLA), también conocida como leucemia linfocítica aguda, es una forma de leucemia de los glóbulos blancos. Los glóbulos blancos inmaduros malignos se multiplican continuamente y se producen en exceso en la médula ósea. Como resultado, las células normales salen masivamente de la médula ósea, y metastatizan a otros órganos. "Aguda" se refiere al estado inmaduro no diferenciado de los linfocitos en circulación, y a la rápida evolución de la enfermedad, que puede ser fatal en un plazo de semanas a meses si no se trata.
- 10 La leucemia linfoblástica crónica (LLC; también denominada como leucemia linfoide aguda), afecta a los linfocitos B. Los linfocitos B se suelen originar en la médula ósea y se desarrollan en los ganglios linfáticos. En la LLC, el ADN de los linfocitos B está dañado, de forma que las células ya no luchan contra las infecciones. No obstante, los linfocitos B siguen creciendo y acumulándose entre las células sanguíneas sanas. Por tanto, la LLC se caracteriza por una proliferación neoplásica anómala de linfocitos B.
- 15 La mayoría de las personas reciben el diagnóstico sin síntomas como resultado de un análisis de sangre rutinario que devuelve un recuento leucocitario elevado. No obstante, a medida que avanza, la LLC causa la inflamación de los ganglios linfáticos, bazo e hígado y en su caso, anemia e infecciones. La LLC inicial no se trata, y la LLC tardía se trata con quimioterapia y anticuerpos monoclonales. La supervivencia varía de 5 años a más de 25 años.
- 20 La leucemia mielógena aguda (LMA), también conocida como leucemia mielóide aguda, es un cáncer de la línea mielóide de los glóbulos blancos, caracterizada por la rápida proliferación de células anómalas que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. Los síntomas de la LMA están causados por una sustitución de la médula ósea normal por una médula ósea con células leucémicas, dando como resultado una disminución del glóbulos rojos, plaquetas, y glóbulos blancos normales. Estos síntomas incluyen fatiga, dificultades respiratorias, aparición fácil de hematomas y hemorragias, y mayor riesgo de infección. Puesto que se trata de una leucemia aguda, la LMA progresa rápidamente y de forma típica es fatal en un plazo de semanas o meses si no se trata.
- 25 La leucemia mielógena aguda (LMA) es una enfermedad potencialmente curable; pero por lo general solo una minoría de los pacientes se curan con la terapia actual. La LMA se puede tratar inicialmente con quimioterapia destinada a inducir la remisión. Algunos pacientes reciben adicionalmente un trasplante de citoblastos hematopoyéticos.
- 30 La leucemia mielógena crónica (LMC) es una forma de leucemia caracterizada por el aumento y el crecimiento no regulado de células predominantemente mieloides en la médula ósea y la acumulación de estas células en la sangre. La LMC es un trastorno clonal de los citoblastos de la médula ósea que causa la proliferación de los granulocitos maduros (neutrófilos, eosinófilos, y basófilos) y sus precursores. Históricamente, se ha tratado con quimioterapia, interferón y trasplante de médula ósea.
- 35 El mieloma múltiple (MM) es una proliferación neoplásica maligna de células plasmáticas que, de forma típica, tienen su origen en la médula ósea e implica al esqueleto. El MM presenta rasgos clínicos que se pueden atribuir a los sitios particulares implicados, así como anomalías en la formación de proteínas plasmáticas. La dolencia suele estar caracterizada por numerosos focos difusos o acumulaciones nodulares de células plasmáticas anómalas o malignas en la médula de diversos huesos (especialmente el cráneo), ocasionando una hinchazón palpable de los huesos y, ocasionalmente, en sitios que no son el esqueleto. Tras la exploración radiológica, las lesiones óseas puede tener un aspecto "punzado" característico.
- 40 Las células implicadas en el mieloma suelen producir proteínas anómalas y/o niveles de proteínas anómalos en suero y orina. La MM se suele desarrollar a partir de una gammopatía monoclonal de significación indeterminada (GMI) en mieloma múltiple latente (MML) y en mieloma múltiple (MM). Los síntomas de estas dolencias pueden incluir hipercalcemia, insuficiencia renal, fatiga, anemia, dolor de huesos, fracturas espontáneas, mayor frecuencia o duración de la infección, o color u olor de la orina anómalos. Una "espiga M" se refiere a un pico monoclonal que se suele visualizar como una banda estrecha en una electroforesis en gel, o como un arco anómalo en la inmunoelectroforesis. Representa la proliferación de inmunoglobulina homogénea producida por las células clonales procedentes de una sola célula común, *por ejemplo*, una inmunoglobulina monoclonal caracterizada por una cadena pesada de una sola clase y subclase, y una cadena ligera de un solo tipo (también denominada como proteína M, una proteína monoclonal, y más ampliamente, como una paraproteína).
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

6. Enfermedades mediadas por VCAM y enfermedades que tienen niveles elevados de sVCAM

Las enfermedades mediadas por VCAM incluyen todas las enfermedades mediadas por VCAM. Véase, por ejemplo, el documento WO 2010/053316. Entre los ejemplos no limitativos de enfermedades mediadas por VCAM se incluyen cánceres, respuestas alérgicas, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedad por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana, SIDA), artritis, neumonía, hipercolesterolemia, septicemia, dermatitis, psoriasis, enfermedad de Crohn, fibrosis cística, rechazo del órgano posterior al trasplante temprano y tardío, rechazo al trasplante de células o islotes, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Grave, enfermedad trombotica, enfermedades inflamatorias del intestino, diabetes autoinmunitaria, retinopatía diabética, rinitis, lesión de isquemia por reperfusión, restenosis posterior a angioplastia, osteomielitis, frío, enfermedad por el virus de la gripe, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), glomerulonefritis, enfermedad de Grave, alergias gastrointestinales, anemia de células falciformes, y conjuntivitis.

Adicionalmente, los niveles de sVCAM son elevados en varias enfermedades y trastornos. Véase, por ejemplo, el documento WO 2009/141786. Los ejemplos no limitativos de estas enfermedades y trastornos que tienen niveles elevados de sVCAM incluye la enfermedad de células falciformes (SCD), mieloma múltiple, enfermedad cardiovascular (aterosclerosis), infarto de miocardio, cáncer colorrectal, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad aterosclerótica aórtica o enfermedad torácica, cáncer de mama, infección por el virus del dengue, fiebre hemorrágica, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, función renal en pacientes con enfermedad de células falciformes (albuminuria), preeclampsia, eclampsia, dermatitis alérgica de contacto, mieloma, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, vitroretinopatía proliferativa, retinopatía diabética, endometriosis, lupus sistémico eritematoso (LSE), leucemia mieloide aguda, hipertrigliceridemia, trasplante cardiaco, sarcoidosis pulmonar, ictus, enfermedad de las arterias coronarias, aterosclerosis, diabetes tipo II, derivación cardiopulmonar, septicemia, insuficiencia renal crónica, aloinjerto renal, enfermedad de Grave, trombosis venosa profunda y rinoconjuntivitis alérgica (rinitis alérgica).

7. MAdCAM como diana para tratar enfermedades inflamatorias

La molécula de adhesión a células de adhesina de la mucosa (MAdCAM) es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas de receptores de adhesión celular. Aunque MAdCAM tiene un papel fisiológico en la vigilancia inmunológica del intestino, parece facilitar una extravasación excesiva de linfocitos durante la enfermedad inflamatoria del intestino en condiciones de inflamación crónica del tracto gastrointestinal. Los anticuerpos que inhiben la unión de linfocitos positivos para $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM han demostrado reducir el reclutamiento de linfocitos, la extravasación del tejido, la inflamación, y la gravedad de la enfermedad en modelos animales. Se ha sugerido que los anticuerpos dirigidos contra MAdCAM o las composiciones que los contienen pueden ser útiles para tratar diversas enfermedades inflamatorias. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos N.º. 2009/0238820. Las enfermedades inflamatorias que se pueden tratar con un anticuerpo dirigido contra MAdCAM, sin limitación, incluyen la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad diverticular, gastritis, enfermedad hepática, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, peritonitis, apendicitis, enfermedad del tracto biliar, mielitis transversal aguda, dermatitis alérgica (por ejemplo, piel alérgica, eczema alérgico, atopia cutánea, eczema atópico, dermatitis atópica, inflamación cutánea, eczema inflamatoria, dermatitis inflamatoria, piel con picaduras, dermatitis militar, eczema militar, piel de ácaros del polvo doméstico), espondilitis anquilosante (síndrome de Reiters), asma, inflamación de las vías respiratorias, aterosclerosis, arteriosclerosis, atresia biliar, inflamación de la vejiga, cáncer de mama, inflamación cardiovascular (por ejemplo, vasculitis, infartos reumatoides de uña plegada, úlceras en las piernas, polimiositis, inflamación vascular crónica, pericarditis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), pancreatitis crónica, inflamación perineural, colitis (incluyendo colitis por amebas, colitis infectiva, colitis bacteriana, colitis de Crohn, colitis isquémica, colitis ulcerosa, proctocolitis idiopática, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis pseudomembranosa), trastornos vasculares del colágeno (artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerosis sistémica progresiva, enfermedad del tejido conectivo mixto, diabetes mellitus), enfermedad de Crohn (enteritis regional, ileítis granulomatosa, ileocolitis, inflamación del sistema digestivo), enfermedad desmielinante (incluyendo mielitis, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, encefalomielitis diseminada aguda, desmielinación perivanosa, deficiencia de vitamina B12, síndrome de Guillain-Barre, retrovirus asociados con EM), dermatomiositis, diverticulitis, diarreas exudativas, gastritis, hepatitis granulomatosa, inflamación granulomatosa, colecistitis, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedades inflamatorias hepáticas (cirrosis con fibrosis primaria biliar, hepatitis, colangitis esclerosante), inflamación pulmonar (fibrosis pulmonar idiopática, granuloma eosinófilo del pulmón, histiocitosis pulmonar X, inflamación peribronquiolar, bronquitis aguda), linfogranuloma venéreo, melanoma maligno, patologías de la boca/dientes (incluyendo gingivitis, enfermedad periodontal), mucositis, inflamación del sistema musculoesquelético (miositis), esteatohepatitis no alcohólica (enfermedad del hígado graso no alcohólica), inflamación ocular y orbital (incluyendo uveítis, neuritis óptica, ulceración reumatoide periférica, inflamación periférica de la córnea), osteoartritis, osteomielitis, inflamación de la faringe, poliartitis, proctitis, psoriasis, lesión por radiación, sarcoidosis, neuropatía de células falciformes, tromboflebitis superficial, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, tiroiditis, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de injerto contra hospedador, lesión aguda por quemadura, síndrome de Behcet, y síndrome de Sjögren.

8. Detección de sVCAM y/o sMAdCAM

sVCAM y/o sMAdCAM se pueden detectar en muestras biológicas. Véase, *por ejemplo*, Leung et al., Immunol. Cell Biol. 82: 400-409 (2004). La muestra biológica puede ser, de forma típica, fluido corporal de un individuo, por ejemplo, sangre, suero, semen, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva. En algunas realizaciones, el fluido puede ser una muestra exenta de células; sin embargo, la inclusión de células en una muestra de fluido corporal no impide la detección y/o cuantificación de sVCAM y/o sMAdCAM. En ejemplos concretos, el fluido puede ser suero o plasma. sVCAM y/o sMAdCAM se pueden detectar usando un kit diagnóstico, por ejemplo.

Se conocen muchas técnicas que utilizan técnicas inmunológicas para la detección y cuantificación de una proteína o fragmentos de proteína. Los ejemplos de métodos para la detección de antígenos proteicos en muestras biológicas, incluidos los métodos que utilizan tiras reactivas u otros dispositivos de ensayo inmovilizados, se divulgan, por ejemplo, en las siguientes patentes: patentes de Estados Unidos números 5.965.356 (seroensayo para el tipo de virus del herpes simple); 6.114.179 (Método y kit de ensayo para la detección de antígenos y/o anticuerpos); y 6.057.097 (Marcador de patologías que comprenden una reacción autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria). Estos métodos se podrían adaptar fácilmente para la detección de sVCAM y/o sMAdCAM.

A modo de ejemplo, se puede utilizar el análisis mediante transferencia Western para cuantificar sVCAM y/o sMAdCAM en una muestra de fluido corporal. En una transferencia Western típica, las proteínas se separan electroforéticamente sobre un gel de acrilamida, a continuación se transfieren a una membrana y se detectan con uno o más anticuerpos. La detección de los anticuerpos puede ser directa o indirecta. Para la visualización directa del anticuerpo contra la proteína sVCAM y sMAdCAM, la membrana con la mancha se incuba con un agente de unión específico de sVCAM y sMAdCAM marcado, por ejemplo, un anticuerpo de sVCAM y sMAdCAM conjugado con una fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Para la visualización indirecta del anticuerpo contra la proteína sVCAM y sMAdCAM, la membrana con la mancha se incuba en primer lugar con un anticuerpo específico de sVCAM o específico de sMAdCAM no conjugado (anticuerpo primario), a continuación, con un anticuerpo marcado (anticuerpo secundario) que reconoce el anticuerpo primario. Por ejemplo, los anticuerpos secundarios para la detección indirecta de los anticuerpos primarios frecuentemente se conjugan con un resto detectable, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o etiquetas radioactivas o fluorescentes.

Como alternativa, se puede utilizar un ensayo ELISA en sándwich para detectar y cuantificar sVCAM y/o sMAdCAM. Un formato ELISA en sándwich típico implica un anticuerpo de captura inmovilizado específico, una muestra, un anticuerpo de detección marcado, cromógenos, y una solución de detención. El antígeno se unirá al anticuerpo de captura inmovilizado y de esta forma se puede detectar con uno o varios anticuerpos. La técnica de detección del anticuerpo usada con un ELISA puede ser directa o indirecta. Para la visualización directa del anticuerpo contra la proteína sVCAM y sMAdCAM, el anticuerpo anti-sVCAM o anti-sMAdCAM está unido a un sustrato, el sustrato se incuba con una muestra de fluido corporal, y el sustrato se incuba a continuación con otro anticuerpo anti-sVCAM o anti-sMAdCAM que se puede conjugar con enzimas, por ejemplo, un anticuerpo anti-sVCAM o un anticuerpo anti-sMAdCAM conjugado con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Para la visualización indirecta del anticuerpo contra la proteína sVCAM y sMAdCAM, el anticuerpo anti-sVCAM o el anticuerpo anti-sMAdCAM está unido al sustrato, y el sustrato se incuba con una muestra de fluido corporal. El sustrato se incuba a continuación con un anticuerpo específico de sVCAM o específico de sMAdCAM no conjugado (anticuerpo primario), a continuación, con un anticuerpo conjugado con enzima (anticuerpo secundario) que reconoce el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios para la detección indirecta de los anticuerpos primarios frecuentemente se conjugan con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. A continuación se añade una solución de sustrato, actúa sobre la enzima, y realiza un cambio de color. La intensidad del cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra original. Los anticuerpos primarios y secundarios también se pueden acoplar con etiquetas radioactivas o fluorescentes. La intensidad de la marca radioactiva o fluorescente es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra original.

Opcionalmente, un ensayo de detección de proteína basada en microperlas (denominado ensayo con microesferas o un ensayo de perlas basado en flujo) para detectar sVCAM y/o sMAdCAM en muestras biológicas, tal como una muestra de suero procedente de un individuo. Esta tecnología, tal como se representa mediante sistemas desarrollados por Luminex Corporation (Austin, TX) y otros sistemas desarrollados por Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ), permite procesar una cantidad de muestra muy pequeña, de forma típica 20 µl, para detectar una proteína, tal como sVCAM y/o sMAdCAM. Un aspecto de este ensayo se basa en el acoplamiento de un anticuerpo de captura con microesferas que contienen cantidades específicas de, por ejemplo, un colorante rojo y un colorante del infrarrojo. Tras la incubación de las microesferas con la muestra, un anticuerpo de detección secundario acoplado con biotina estreptavidina acoplada con ficoeritrina, las microesferas se analizan con un citómetro de flujo o cualquier otro sistema de detección de fluorescencia basada en flujo. Un láser detecta las perlas y un segundo haz detecta la intensidad de la ficoeritrina unida a estas perlas (las notas técnicas están disponibles de Luminex Corp., por ejemplo, en su sitio web, o en el catálogo).

Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos para demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones y

aspectos representativos de la presente divulgación, y no deben considerarse como limitantes de su alcance.

Materiales y métodos

5 **Inhibidores de alfa-4-integrina**

Los inhibidores de alfa-4-integrina (Compuestos A-D) se muestran en la Fig. 1.

Cuantificación de la concentración plasmática del Compuesto A

10 El compuesto A se midió usando un método CL/EM/EM. Tras la adición de un patrón interno, las muestras de plasma (anticoagulante: heparina lio) se extrajeron usando precipitación con proteína (acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %). Tras la evaporación del sobrenadante filtrado a sequedad, y reconstitución, los extractos se analizaron mediante CL-API/EM/EM. Las transiciones MRM (monitorización de reacción múltiple) para el Compuesto A y el IS fueron m/z 257/114 y 270/91, respectivamente. El límite inferior de cuantificación fue de 20 ng/ml.

Recuento de linfocitos en sangre

20 Los linfocitos se cuantificaron a partir de muestras de sangre completa recogida en tubos que contenían el anticoagulante EDTA mediante un analizador hematológico Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics).

Detección/cuantificación de la expresión de alfa-4 integrina

25 La sangre completa se recogió en tubos que contenían el anticoagulante heparina de litio. Las muestras se tiñeron con anticuerpo dirigido contra CD49d (alfa-4-integrina) de ratón marcado con AlexaFluor647 (Biolegend, San Diego, CA) durante 30 minutos. Los eritrocitos se lisaron (solución de lisado FACS, BD Biosciences, San Jose, CA) y las muestras se lavaron dos veces en PBS que contenía suero de feto bovino al 5 %. Las células teñidas se analizaron para determinar los desplazamientos en la media geométrica de la intensidad de fluorescencia usando un citómetro de flujo BD FACScan.

Ejemplo 1 - sVCAM está regulada por defecto durante la inhibición de alfa-4-integrina en diferentes modelos de enfermedad en rata (con inhibidores de molécula pequeña)

35 La inhibición de alfa-4 integrina da como resultado la regulación por defecto de sVCAM en tres modelos de enfermedad inflamatoria en rata. Los compuestos A y C son inhibidores de alfa-4-integrina de molécula pequeña pegilados. El compuesto B es un inhibidor de alfa-4-integrina de molécula pequeña no pegilado. Todas las muestras de suero se analizaron por Rules Based Medicine, Inc (Austin, TX) con el ensayo RodentMAP, un inmunoensayo multiplexado basado en perlas en un instrumento Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX) para determinar las cantidades de sVCAM en suero de rata. Se realizó estadística con ANOVA monolateral.

40 Los resultados se presentan en la Figura 2. Tal como se muestra en la Fig. 2A, ratas Lewis recibieron una inyección intradérmica con un homogenado de sustancia blanca de médula espinal y cerebro de cobaya en adyuvante completo de Freund y se trataron por vía subcutánea con ciclosporina A (2 mg/kg en días alternos) durante 20 días para inducir una encefalomiелitis autoinmunitaria crónica experimental. En el día 30 después de la inducción, las ratas se trataron con vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) o 10 mg/kg de Compuesto C cada 3 días. En el día 40 después de la inducción, se recogieron las muestras de suero, que se analizaron para determinar el contenido de sVCAM.

50 Tal como se muestra en la Figura 2B, ratas Sprague Dawley se instilaron por vía intrarrectal con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) para inducir colitis o etanol solo como control. En los días 1 y 4 después de la instilación de TNBS, las ratas recibieron una dosis subcutánea de 10 mg/kg de Compuesto C. En día 5, se recogieron las muestras de suero, que se analizaron para determinar el contenido de sVCAM.

55 Como se muestra en las Figs. 2C y 2D, las ratas que portaban un transgén HLA.B27 humano desarrollaron espontáneamente síntomas de enfermedad inflamatoria del intestino, a medida que envejecen. Las ratas transgénicas HLA.B27 se trataron por vía subcutánea con Compuesto C (10 mg/kg cada 3 días), Compuesto A (10 mg/kg cada 5 días), Compuesto B (100 mg/kg dos veces al día) o vehículo (PBS) a 16-20 semanas de edad. Se recogieron muestras de suero después de 20 (Fig. 2C) o 5 (Fig. 2D) días de tratamiento, y se evaluaron los niveles de sVCAM. La inhibición de alfa-4 integrina en todos los modelos de enfermedad inflamatoria analizados dio como resultado una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de sVCAM (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Ejemplo 2 - La inhibición de alfa-4 integrina da como resultado una reducción de sVCAM en ratas normales (con inhibidores de molécula pequeña)

65 Para estudiar si la inhibición de alfa-4-integrina regula los niveles de sVCAM en ausencia de enfermedad, ratas

normales (es decir, no enfermas) recibieron una inyección de inhibidores de alfa-4, y se midieron los niveles de sVCAM. Ratas Sprague Dawley recibieron una inyección subcutánea de una sola dosis de 10 mg/kg de Compuesto A (Fig. 3A), una sola dosis de 10 mg/kg de Compuesto C (Fig. 3B), o una dosis de 100 mg/kg de Compuesto B dos veces al día durante cuatro días (Fig. 3C). Tal como se muestra en las Fig. 3A y 3B, las muestras de suero se recogieron en los días 2 y 11 después de la inyección. Tal como se muestra en la Fig. 3C, las muestras de suero se recogieron a las 2 horas, 12 horas, y 11 días después de la última inyección. Todas las muestras de suero se analizaron mediante un ensayo multiplexado basado en perlas RodentMAP en un instrumento Luminex para determinar las cantidades de sVCAM en suero de rata. Se realizó estadística con ANOVA monolateral. Los tres inhibidores de alfa-4-integrina regularon por defecto sVCAM en ratas normales (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Ejemplo 3 - La inhibición de alfa-4 integrina reduce específicamente sVCAM en ratones normales (con inhibidores de molécula pequeña)

Para determinar si la inhibición de alfa-4-integrina da como resultado la regulación por defecto específica de la forma soluble de su ligando (es decir, sVCAM), y no la forma soluble de una molécula de adhesión que no sea un ligando de alfa-4-integrina (es decir, ICAM-1), ratones normales se sometieron a ensayo para estudiar la modulación de ambas moléculas de adhesión después del tratamiento con un inhibidor de alfa-4-integrina. Ratones Balb/c recibieron una inyección subcutánea única de Compuesto A (1 mg/kg o 10 mg/kg) o vehículo (PBS). Se tomaron muestras de plasma a 8 horas, 2 días, 4 días y 8 días después de la dosis. Las muestras de plasma se analizaron usando ELISA para determinar la VCAM-1 soluble y la ICAM-1 soluble usando kits comercialmente disponibles (R&D Systems, Mineápolis, MN) (n= 4 ratones/grupo/punto temporal). Como se muestra en la Fig. 4, el efecto de la inhibición de alfa-4-integrina parece ser específica de la forma soluble de su ligando (sVCAM) y no la forma soluble de una molécula de adhesión que no es un ligando de alfa-4-integrina (sICAM).

Ejemplo 4 - el efecto de los inhibidores de alfa-4-integrina sobre la regulación por defecto de sVCAM es dependiente de la dosis y está correlacionado con otros marcadores de la inhibición de alfa-4-integrina

La inhibición de alfa-4 integrina da como resultado tanto un aumento en el número de linfocitos circulantes como una regulación por defecto de la alfa-4-integrina sobre la superficie de los leucocitos en circulación. Se estudió la correlación de los niveles de sVCAM con la expresión de alfa-4-integrina y el recuento de linfocitos en sangre tras el inhibidor de alfa-4-integrina, así como la dependencia de la dosis de cada parámetro. Tal como se muestra en la Fig. 5A-C, Ratones Balb/c recibieron dosis subcutáneas de 0,1, 1, o 10 mg/kg de Compuesto A o vehículo (PBS). Dos días después de la dosis, los animales se sometieron a eutanasia, y se extrajo la sangre para analizar los niveles de sVCAM, la expresión de alfa-4-integrina en la superficie de los leucocitos, y el número de linfocitos en la sangre. Las muestras de plasma se analizaron para determinar el contenido en sVCAM utilizando ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN) (Fig. 5A). De los mismos animales, una alícuota de sangre completa se tiñó con anticuerpo dirigido contra CD49 (alfa-4-integrina) de ratón marcado con AlexaFluor647 (Biolegend, San Diego, CA), los eritrocitos se lisaron (solución de lisado FACS, BD Biosciences, San Jose, CA), y se analizaron para determinar los desplazamientos en la media geométrica de la intensidad de fluorescencia usando un citómetro de flujo BD FACScan (Fig. 5B). De los mismos animales, se analizaron muestras de sangre completa para determinar el número de linfocitos usando un analizador hematológico Cell-Dyn (Abbott Diagnostics, Illinois) (Fig. 5C). Se usó ANOVA monolateral para determinar la significación estadística. Tal como se muestra en la Fig. 5D-F, ratones C57BL/6 recibieron dosis subcutáneas de 0,5, 1, o 3 mg/kg de Compuesto C o vehículo. Se extrajo muestra a las 4 h y 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, and 21 días después de la dosis. Los niveles de VCAM soluble en plasma (Fig. 5D) y la expresión de alfa-4-integrina en los leucocitos de la sangre (Fig. 5E) se analizaron como se ha descrito anteriormente. Los niveles respectivos en los animales tratados con vehículo (PBS) de los que se tomó una muestra el día 2 después de la dosis se indican mediante líneas discontinuas. La Fig. 5F muestra la correlación entre sVCAM y la expresión de alfa-4-integrina en animales equivalentes para los puntos temporales de días 1-21 (n=4 ratones/grupo/punto temporal). La regulación por defecto de sVCAM por los inhibidores de alfa-4-integrina demostró ser dependiente de la dosis y estuvo bien correlacionada tanto con la expresión de alfa-4-integrina sobre la superficie de los leucocitos como con el recuento de linfocitos en sangre (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Ejemplo 5 - la VCAM soluble también se reduce usando un anticuerpo inhibidor de alfa-4-integrina

Para demostrar que el efecto de la inhibición de alfa-4-integrina sobre los niveles de sVCAM no se debe únicamente a los inhibidores de alfa-4-integrina de molécula pequeña, se analizó un anticuerpo inhibidor de alfa-4-integrina para determinar su capacidad para modular los niveles de sVCAM. Tal como se muestra en la Fig. 6A, Ratones Balb/c recibieron una sola dosis intraperitoneal de 10 mg/kg de un anticuerpo de rata dirigido contra alfa-4-integrina de ratón (clon PS/2) o un anticuerpo control de isotipo de IgG2b de rata. Se tomó una muestra de sangre antes de la dosificación (ratones no expuestos a tratamiento) y en los días 2, 4, y 7 después de la dosis, y se analizó para determinar la VCAM soluble mediante ELISA. Una dosis de 10 mg/kg de PS/2, pero no el control de isotipo, provocaron una regulación por defecto de sVCAM sostenida en plasma. Tal como se muestra en la Figura 6B, se llevó a cabo un estudio de seguimiento para evaluar la dosis y la dependencia temporal de la regulación por defecto de sVCAM mediante un anticuerpo inhibidor de alfa-4-integrina. Ratones C57BL/6 se trataron por vía intraperitoneal con una dosis de 0,5, 1, 3, o 10 mg/kg de PS/2 o una dosis de 10 mg/kg de un anticuerpo control de isotipo de IgG2b de rata. Se recogieron muestras de plasma a 4 horas y 1, 2, 4, 7, 10, 14, y 21 días después de la dosis, y se

analizaron para determinar los niveles de sVCAM. Los datos que se muestran en la Fig. 6 indican que la regulación por defecto de sVCAM es dependiente de la dosis de PS/2, y que los niveles de sVCAM se recuperan con el tiempo. Las líneas discontinuas indican los niveles individuales de sVCAM el día 2 en ratones tratados con el anticuerpo control de isotipo (n=4 ratones/grupo/punto temporal).

5 **Ejemplo 6 - los niveles de sVCAM están regulados por defecto mediante un inhibidor de alfa-4-integrina de molécula pequeña no pegilado. Los niveles de sVCAM no se ven afectados por el PEG en solitario**

10 Para demostrar que el efecto de la inhibición de alfa-4-integrina sobre los niveles de sVCAM no está limitado a los inhibidores de molécula pequeña pegilados, ni se desencadena por el propio PEG, ratones normales recibieron una dosis de compuesto D (un inhibidor de alfa-4-integrina no pegilado) y la cadena principal PEG sobre la que se construyó el Compuesto A. Ratones Balb/c recibieron una dosis subcutánea única de vehículo (PBS), una dosis subcutánea única de Compuesto A (10 mg/kg), una dosis subcutánea única de la cadena principal PEG sobre la que se construyó el Compuesto A (10 mg/kg), o 5 dosis subcutáneas de Compuesto D (50 mg/kg) cada 12 horas. Dos días después de la inyección de Compuesto A y PEG, y 4 horas después de la última inyección de Compuesto D, se tomaron muestras de sangre. sVCAM se determinó mediante ELISA (R&D Systems) (Fig. 7A) y los linfocitos de la sangre se cuantificaron usando un analizador hematológico Cell-Dyn (Abbott Diagnostics) (Fig. 7B). Se realizó la estadística usando ANOVA monolateral, y se denotan las diferencias estadísticamente significativas comparadas con los animales tratados con vehículo. Tanto el Compuesto A como el Compuesto D, pero no PEG, fueron capaces de conseguir un aumento de los linfocitos de la sangre, así como una regulación por defecto de sVCAM en el plasma (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

25 **Ejemplo 7 - Los efectos de la inhibición de alfa-4-integrina sobre los niveles de VCAM soluble son dependientes de la dosis y desaparecen a medida que los niveles del inhibidor alfa-4-integrina disminuyen.**

30 Para determinar si la regulación de sVCAM mediante los inhibidores de alfa-4-integrina está relacionada con el nivel de fármaco en circulación, y si el efecto sobre sVCAM es reversible, estos parámetros se midieron durante un período de tres semanas después de que ratones normales recibieran una dosis. Ratones C57BL/6 recibieron una sola dosis subcutánea de 0,5, 1, o 3 mg/kg de Compuesto A o vehículo (PBS). Se extrajo sangre a las cuatro horas y 1, 2, 3, 4, 10, 14, y 21 días después de la dosis, y se analizaron para determinar los niveles de sVCAM en plasma mediante ELISA (las líneas discontinuas indican los niveles de control con vehículo en el día 2) (Fig. 8A) y los niveles de Compuesto A en plasma usando un método CL/EM/EM (Fig. 8B). El límite de detección del Compuesto A usando este método es de 10 ng/ml. Los niveles de sVCAM y de Compuesto A en los días 1-21 se representaron gráficamente comparando ratones semejantes para demostrar correlación (Fig. 8C). En las muestras donde el Compuesto A era indetectable, se asignó un valor de 10 ng/ml (n=4 ratones/grupo/punto temporal). Los niveles de sVCAM se correlacionaron bien con los niveles de fármaco en circulación, y volvieron a los niveles iniciales a medida que los niveles de fármaco se volvieron indetectables en plasma (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

40 **Ejemplo 8 - sMAdCAM está regulado por defecto cuando la alfa-4-integrina se inhibe en modelos de colitis en ratón**

45 El Compuesto C es un inhibidor de molécula pequeña pegilado tanto de la alfa-4 beta-1 integrina como la alfa-4 beta-7 integrina. PS/2 es un anticuerpo bloqueante de rata dirigido contra alfa-4-integrina de ratón. Ambos de estos inhibidores de alfa-4-integrina se administraron a ratones, lo que indujo formas de colitis. Las muestras de suero se analizaron para determinar los niveles de sMAdCAM mediante ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN). En el primer modelo de colitis en ratón, Linfocitos CD45RBhi CD4+ se aislaron de bazo de Balb/c mediante clasificación de células activada con perlas magnéticas para linfocitos CD4+ (kit de aislamiento de linfocitos CD4+ sin tocar, Miltenyi Biotec) seguido por clasificación celular activada por fluorescencia de células CD45RBhi. Los linfocitos CD45RBhi CD4+ se inyectaron por vía intraperitoneal a ratones SCID. Los síntomas de colitis comenzaron a aparecer una semana después de la transferencia celular. Ocho semanas después de la transferencia, los animales se trataron bien con vehículo (PBS) o Compuesto C (10 mg/kg) una vez cada 3 días durante un periodo de 15 días. En ese momento, los animales se sacrificaron, y las muestras de suero se analizaron para determinar sMAdCAM. Los resultados se presentan en la Fig. 9A. Las estadísticas mostradas son en comparación con el grupo de transferencia CD45RBhi + vehículo. La transferencia de células aumentó significativamente la cantidad de sMAdCAM en circulación. Los datos mostrados en la Fig. 9A indican que el tratamiento con el Compuesto C redujo de una forma estadísticamente significativa los niveles de sMAdCAM.

60 En un segundo modelo de ratón, se indujo colitis crónica en ratones Balb/c mediante la administración de sulfato de sodio al 4 % en dextrano (DSS) en su agua de bebida durante 7 días seguido por 7 días de agua del grifo. Este ciclo se repitió cuatro veces. Los ratones mostraron síntomas de colitis durante cada ciclo con DSS. El día 56, los ratones entraron en una patología crónica y se inició el tratamiento bien con vehículo (PBS) o Compuesto C (10 mg/kg) cada 3 días durante un periodo de 15 días. En ese momento, los animales se sacrificaron, y las muestras de suero se analizaron para determinar sMAdCAM. Los resultados se presentan en la Fig. 9B. Las estadístico que se muestran son en comparación con los niveles de sMAdCAM en ratones no tratados. Los datos mostrados en la Fig. 9B indican que (1) DSS indujo un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de sMAdCAM en suero, y (2) el tratamiento con Compuesto C redujo de una forma estadísticamente significativa los niveles de sMAdCAM.

En un tercer modelo de ratón, ratones Balb/c recibieron DSS al 3 % en su agua de bebida durante 5 días para inducir colitis aguda. El día 6, el agua se cambió a agua del grifo, y los animales recibieron una dosis de Compuesto C (10 mg/kg cada 3 días) o PS/2 (10 mg/kg cada 5 días). Se recogió suero el día 14, y las muestras se analizaron para determinar sMAdCAM. Los resultados se presentan en la Fig. 9C. En ambos grupos de tratamiento, el nivel de sMAdCAM estuvo por debajo del límite de cuantificación (BQL) del ensayo (Fig. 9C). Estos experimentos demuestran que la inhibición de alfa-4-integrina en modelos de colitis en ratón da como resultado la regulación por defecto de los niveles de sMAdCAM de una forma estadísticamente significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

10 **Ejemplo 9 - sMAdCAM está regulado por defecto cuando la alfa-4-integrina se inhibe en ratones normales mediante un inhibidor de molécula pequeña**

El Compuesto D es un inhibidor de alfa-4-integrina de molécula pequeña, y se analizó para determinar su capacidad para regular por defecto sMAdCAM en el plasma de ratones normales. Ratones Balb/c recibieron una dosis subcutánea de 50 mg/kg de Compuesto D o vehículo (PBS) cada 12 horas. Cuatro horas después de la quinta dosis, se tomaron muestras de plasma, que se analizó por ELISA para determinar sMAdCAM. Los resultados que se muestran en la Fig. 10 indican que el tratamiento con el Compuesto D da como resultado una regulación por defecto estadísticamente significativa de sMAdCAM en plasma (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

20 **Ejemplo 10 - Un anticuerpo inhibidor de alfa-4-integrinas también da como resultado la modulación por defecto de sMAdCAM en ratones normales**

Para probar si un anticuerpo inhibidor de alfa-4-integrina puede modular los niveles de sMAdCAM, analizar la dependencia de la dosis, y para medir la capacidad de los niveles de sMAdCAM para recuperarse después de la inhibición de alfa-4-integrina, se administró PS/2 por vía intraperitoneal a ratones C57BL/6 a 0,5, 1, 3, y 10 mg/kg y se tomaron muestras de plasma a las cuatro horas y 1, 2, 4, 7, 10, 14, and 21 días después de la dosis. Como control, un anticuerpo control de isotipo de IgG2b de rata se administró a 10 mg/kg por vía intraperitoneal y se tomaron muestras de plasma el día 2. Los niveles de sMAdCAM en las muestras de plasma se midieron por ELISA (Fig. 11). Las líneas discontinuas indican los niveles de sMAdCAM presentes en los 4 ratones tratados con el control de isotipo en el día dos (n=4 ratones/grupo/punto temporal; LLOQ = límite inferior de cuantificación del ensayo ELISA). Los datos mostrados en la Fig. 4 demuestran que un anticuerpo inhibidor de la alfa-4 integrina modula de una forma dependiente de la dosis los niveles de sMAdCAM.

35 **Ejemplo 11- La regulación por defecto de sMAdCAM con inhibidores de alfa-4-integrina es dependiente de la dosis, reversible, y está correlacionada con la selectividad in vitro del inhibidor de alfa-4-integrina por el heterodímero de $\alpha 4\beta 7$ integrina**

La alfa-4 forma heterodímeros con beta-1 o beta-7 integrinas. MAdCAM es un ligando de alfa-4 beta-7 ($\alpha 4\beta 7$) mientras que VCAM es un ligando de alfa-4 beta-1 ($\alpha 4\beta 1$). Los inhibidores de alfa-4-integrina pueden mostrar selectividad diferente para $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha 4\beta 1$. Para estudiar si la selectividad in vitro de los inhibidores de alfa-4 para $\alpha 4\beta 7$ se correlaciona con la regulación por defecto in vivo de sMAdCAM, se llevaron a cabo experimentos usando dos inhibidores de alfa-4-integrina que muestran diferentes selectividad para $\alpha 4\beta 7$. El Compuesto C y el Compuesto A son ambos inhibidores de molécula pequeña pegilados de la alfa-4-integrina.

La Fig. 12A representa gráficamente la selectividad de estos compuestos para $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$. La inducción de epítomos específicos de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ por los compuestos se midió utilizando el siguiente ensayo. Linfocitos aislados de sangre humana mediante gradiente de Ficoll se incubaron con una valoración volumétrica de un Compuesto A o Compuesto C en PBS con FBS al 5 % y uno de 10 mg/ml 2G3 (ligando inducido por anticuerpo dirigido contra beta-7) o 15/7 (ligando inducido por anticuerpo dirigido contra beta-1). Tras una incubación con un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón conjugado con PE, la inducción de epítomo se midió por citometría de flujo. Los datos se expresan como % de unión. Los datos que se muestran en la Fig. 12A indican que (1) el Compuesto C se une a ambas integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ con igual potencia; y (2) el Compuesto A es 100 veces más selectivo para su unión a $\alpha 4\beta 1$ respecto a $\alpha 4\beta 7$.

Para investigar si la selectividad in vitro se traslada a una regulación por defecto diferencial de sMAdCAM in vivo, el Compuesto A y el Compuesto C se administraron por vía subcutánea a C57BL/6 a 0,1, 0,3, 0,5, 1, y 3 mg/kg. A 48 horas después de la dosis, se recogió el plasma y se cuantificó sMAdCAM. Los resultados se presentan en la Fig. 12B. El Compuesto C parece más potente que el Compuesto A para regular por defecto sMAdCAM, lo que la selectividad para $\alpha 4\beta 7$ media el efecto sobre la forma soluble de su ligando. La significación se calculó mediante ANOVA monolateral, y se comparó con el control de vehículo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n=4 ratones/grupo, ND=no realizado).

Para medir la relación dosis/tiempo de la regulación por defecto de sMAdCAM mediante la inhibición de $\alpha 4\beta 7$, tanto el Compuesto A (Fig. 12C) como el Compuesto C (Fig. 12D) se dosificaron por vía subcutánea a ratones C57BL/6 a 0,5, 1, y 3 mg/kg, y el plasma se recogió plasma a las 4 horas y 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, and 21 días después de la dosis. Las líneas discontinuas indican los niveles de sMAdCAM en los animales tratados con vehículo en el día 2 (n=4

ratones/grupo/punto temporal). Tal como se muestra en la Fig. 12D, el Compuesto C, el paninhibidor de alfa-4-integrina, regula por defecto sMAdCAM en mayor medida que el Compuesto A, que un inhibidor selectivo de $\alpha 4\beta 1$. Esto sugiere que la inhibición de $\alpha 4\beta 7$ es necesaria para evocar la regulación por defecto de sMAdCAM. Adicionalmente, los niveles de sMAdCAM se recuperan a los niveles iniciales con el tiempo.

5 Tal como se muestra en las Figs. 12E y 12F, sVCAM se midió en muestras tomadas de los mismos animales que anteriormente mediante ELISA (R&D Systems). Las líneas discontinuas indican los niveles de sVCAM en los animales tratados con vehículo en el día 2 (n=4 ratones/grupo/punto temporal). Tanto el Compuesto A como el Compuesto tuvieron potencias similares para regular por defecto sVCAM en las muestras de plasma, evocando una selectividad similar de estos compuestos para $\alpha 4\beta 1$, el ligando de VCAM. En su conjunto, estos datos indican que la selectividad *in vitro* para $\alpha 4\beta 7$ o $\alpha 4\beta 1$ se imita mediante la regulación por defecto de sMAdCAM o sVCAM *in vivo*, respectivamente.

15 La selectividad del Compuesto A como se ha descrito anteriormente se comprobó adicionalmente en sujetos humanos. Para ello, cuarenta y un individuos recibieron una dosis oral de Compuesto A a 0,5 mg/kg. Se recogió sangre completa en diferentes puntos temporales después de la dosis (hasta 28 días después de la dosis). Los niveles de sVCAM y sMAdCAM se cuantificaron mediante ELISA como se ha descrito anteriormente. Se sabe que el Compuesto A bloquea la unión de 9F10 a alfa-4-integrinas. Los niveles de expresión de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ se determinaron midiendo la intensidad promedio del fluorocromo (MFI) de glóbulos blancos incubados con un 9F10 marcado de forma fluorescente (un anticuerpo de ratón dirigido contra alfa-4 integrina humana). También se sabe que el Compuesto A, tras su unión a los receptores la integrina, induce la expresión de epítomos del sitio de unión inducidos por ligando sobre las subunidades $\beta 1$ y $\beta 7$, que se reconocen mediante los anticuerpos monoclonales de ratón 15/7 y 2G3 (como se ha descrito anteriormente). Los niveles de saturación de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ se determinaron usando anticuerpos 15/7 y 2G3 marcados de forma fluorescente, y se calcularon de la siguiente forma:

25

$$\% \text{ saturación} = \frac{\text{MFI de la muestra de ensayo} - \text{MFI del fondo}}{\text{MFI del control saturado} - \text{MFI del fondo}}$$

Los datos se presentan en la Fig. 13. La Fig. 13A indica que la administración del Compuesto A en sujetos humanos da como resultado una notable disminución en los niveles de expresión de $\alpha 4\beta 1$ incluso tan pronto como 1 día después de la dosis hasta al menos 14 días después de la dosis. Los niveles de $\alpha 4\beta 1$ vuelven al valor inicial aproximadamente 7 días después de la dosis. La Fig. 13B muestra que $\alpha 4\beta 1$ queda saturado aproximadamente dos días después de administrar el Compuesto A, y que la saturación dura al menos otros 13 días (15 días después de la dosis). Los niveles de saturación de $\alpha 4\beta 7$, sin embargo, disminuyen significativamente 8 días después de la administración. Tal como se muestra en la Fig. 13C, los niveles de sVCAM disminuyen significativamente 1 día después de la administración, y comienzan a volver a los niveles iniciales (antes de la administración) 14 días después de la administración. Los niveles de sMAdCAM, sin embargo, permanecen cercanos al nivel inicial incluso 28 días después de la administración. Estos datos son coherentes con la observación *in vitro* de que el Compuesto A es más selectivo en su unión a $\alpha 4\beta 1$ sobre $\alpha 4\beta 7$.

40 **Ejemplo 12 - Correlación entre los niveles de inhibidor de alfa-4-integrina y los niveles de sVCAM / sMAdCAM en ratones**

Treinta y ocho (38) ratones (C57BL/6) recibieron por vía intraperitoneal diferentes cantidades de PS/2 (un anticuerpo dirigido contra alfa-4-integrina). Las muestras de plasma se recogieron en diferentes puntos temporales después de la dosis. Los niveles de sVCAM, los niveles de sMAdCAM, y los niveles de PS/2 en las muestras de plasma se analizaron por métodos ELISA, como se describe en los ejemplos anteriores. Los niveles de sVCAM y sMAdCAM (% vehículo promedio) se representaron gráficamente contra las concentraciones de PS/2, tal como se muestra en la Fig. 14. Los resultados indican correlaciones lineales fuertemente negativas tanto para sVCAM ($r = -0,61$; $p < 0,0001$) como sMAdCAM ($r = -0,42$; $p < 0,0041$), concretamente, la mayor concentración del anticuerpo dirigido contra alfa-4-integrina (correspondiente a un mayor nivel de inhibición de las alfa-4-integrinas), el menor nivel de sVCAM o sMAdCAM.

Varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia. Aunque la divulgación se ha descrito con respecto a realizaciones específicas representativas, se deberá entender que la materia sujeto tal como se reivindica no deberá quedar indebidamente limitada a dichas realizaciones específicas.

Las realizaciones de la presente divulgación proporcionan un método para controlar el cambio en las actividades de la alfa-4-integrina en un individuo por correlación con los niveles de molécula de adhesión a células vasculares soluble (sVCAM) y/o de molécula de adhesión a células de adhesina de la mucosa soluble (sMAdCAM).

Por ejemplo, las realizaciones de la presente divulgación

- (1) proporcionan un método *in vitro* para determinar una diferencia en la actividad alfa-4-integrina de un individuo, que comprende: a) medir una molécula soluble en una primera muestra biológica obtenida del individuo inmediatamente antes de la administración de un inhibidor de alfa-4-integrina; b) medir la molécula soluble en una segunda muestra biológica, en el que la segunda muestra biológica se ha obtenido del individuo en un plazo de treinta y un días después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina; y c) determinar si se ha producido una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestras biológicas, en la que la disminución está correlacionada con una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo, y determinar de esta forma si existe una diferencia en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina en comparación con la que había antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina, y en el que la molécula soluble es sVCAM y/o sMAdCAM.
- (2) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método del (1) anterior que comprende además detectar una disminución en los niveles de la molécula soluble en la segunda muestra biológica comparado con la primera muestra biológica, y atribuir dicha disminución a una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina comparado con antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina.
- (3) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método del (1) o (2) anteriores en el que la actividad alfa-4-integrina es la actividad alfa-4 beta-1 integrina, y en el que la molécula soluble es sVCAM.
- (4) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método del (1) o (2) anteriores en el que la actividad alfa-4-integrina es la actividad alfa-4 beta-7 integrina, y en el que la molécula soluble es sMAdCAM.
- (5) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (1)-(4) en el que el individuo tiene una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica.
- (6) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método del (5) anterior en el que la enfermedad o trastorno se selecciona entre el grupo que consiste esclerosis múltiple (EM), meningitis, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes aguda de inicio juvenil, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, complicaciones derivadas de la anemia de células falciformes, lupus eritematoso, y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.
- (7) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (1)-(6) en el que el inhibidor de alfa-4-integrina es un anticuerpo.
- (8) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (1)-(7) anteriores, en el que la primera y/o la segunda muestra biológica se seleccionan del grupo que consiste en un tejido, una célula y un fluido corporal.
- (9) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de la (8) anterior, en el que la primera y/o la segunda muestra biológica es un fluido corporal seleccionado del grupo que consiste en sangre, linfa, suero, plasma, orina, semen, fluido sinovial, saliva, lágrimas, lavado broncoalveolar, y líquido cefalorraquídeo.
- (10) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método del (8) anterior, en el que la primera y/o la segunda muestra biológica están en la forma de plasma o suero congelado.
- (11) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (1)-(10) anteriores, en el que la segunda muestra biológica se obtiene del individuo un día después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina.
- (12) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (1)-(11) anteriores, en el que la molécula soluble se mide por un método seleccionado entre el grupo que consiste de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), transferencia Western, y ensayo de detector de proteínas basado en microperlas.
- (13) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (1)-(12) anteriores, que comprende además determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo, en el que la no disminución, o una disminución estadísticamente muy baja ($p > 0,05$) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y segunda muestras biológicas indica una respuesta ineficaz al inhibidor de alfa-4-integrina lo que requiere un ajuste en el tratamiento del individuo.
- (14) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de la (13) anterior que comprende además no detectar ninguna disminución, o una disminución estadísticamente significativa poco importante ($p > 0,05$), en el nivel de la molécula soluble en la segunda muestra biológica comparado con la primera muestra biológica, y concluir que se necesita un ajuste en el tratamiento del individuo.
- (15) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un método de cualquiera de las (13) o (14) anteriores, en el que el ajuste del tratamiento comprende cambiar a un inhibidor de alfa-4-integrina diferente o aumentar la dosis del inhibidor de alfa-4-integrina.
- (16) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como biomarcador farmacodinámico para determinar la actividad de (i) alfa-4-integrina o (ii) un modulador de la actividad alfa-4-integrina.
- (17) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un uso de la (16) anterior que comprende el uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como un biomarcador farmacodinámico de dicha actividad en un individuo que reciben tratamiento con un modulador de la actividad alfa-4-integrina.
- (18) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un uso de la (17) anterior, en el que el modulador es un inhibidor de alfa-4-integrina.

(19) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un uso de la (17) anterior en el que el individuo tiene una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica, opcionalmente seleccionada entre el grupo que consiste de esclerosis múltiple (EM), meningitis, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes aguda de inicio juvenil, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, complicaciones derivadas de la anemia de células falciformes, lupus eritematoso, y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.

5

(20) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un uso de cualquiera de la (16)-(19) anterior, en el que la actividad alfa-4 integrina es una actividad alfa-4 beta-1 integrina, y en el que el biomarcador farmacodinámico es sVCAM.

10

(21) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un uso de cualquiera de la (16)-(19) anterior, en el que la actividad alfa-4 integrina es una actividad alfa-4 beta-7 integrina, y en el que el biomarcador farmacodinámico es sMAdCAM.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar *in vitro* una diferencia en la actividad alfa-4-integrina en un individuo con una enfermedad o un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende:
- medir una molécula soluble en una primera muestra biológica obtenida de un fluido corporal del individuo, seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero y plasma, inmediatamente antes de la administración de un inhibidor de alfa-4-integrina;
 - medir la molécula soluble en una segunda muestra biológica, en donde la segunda muestra biológica se ha obtenido de un fluido corporal del individuo seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero y plasma, en un plazo de treinta y un días después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina;
 - determinar si se ha producido una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestras biológicas, en donde la disminución está correlacionada con una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo, y determinar de esta forma si existe una diferencia en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina en comparación con la que había antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina, y
 - determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo, en donde la no disminución, o una disminución estadísticamente muy baja ($p > 0,05$) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y segunda muestras biológicas indica una respuesta ineficaz al inhibidor de alfa-4-integrina lo que requiere un ajuste en el tratamiento del individuo;
- y en donde el inhibidor de alfa-4-integrina es un anticuerpo y la molécula soluble es sVCAM.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar una disminución en los niveles de la molécula soluble en la segunda muestra biológica comparado con la primera muestra biológica, y atribuir dicha disminución a una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina comparado con antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina.
3. El método de reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la actividad alfa-4-integrina es la actividad alfa-4 beta-1 integrina.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la enfermedad o el trastorno son esclerosis múltiple (MS).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la enfermedad o el trastorno son la enfermedad inflamatoria del intestino.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la primera y/o la segunda muestra biológica están en la forma de plasma o suero congelados.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la segunda muestra biológica se obtiene del individuo un día después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la molécula soluble se mide con un método seleccionado del grupo que consiste en ensayo de inmunoadsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), transferencia Western y ensayo de detector de proteínas basado en microperlas.
9. El método de la reivindicación 1, que comprende además no detectar ninguna disminución, o una disminución estadísticamente significativa poco importante ($p > 0,05$), en el nivel de la molécula soluble en la segunda muestra biológica comparado con la primera muestra biológica, y concluir que se necesita un ajuste en el tratamiento del individuo.
10. El método de las reivindicaciones 1 o 9, en el que el ajuste del tratamiento comprende cambiar a un inhibidor de alfa-4-integrina diferente o aumentar la dosis del inhibidor de alfa-4-integrina.
11. Uso *in vitro* de sVCAM como biomarcador farmacodinámico de la actividad de (i) alfa-4-integrina o (ii) un inhibidor de alfa-4-integrina en un individuo con una enfermedad o un trastorno seleccionados entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria del intestino, en donde el inhibidor de alfa-4-integrina es un anticuerpo, que comprende
- medir una sVCAM en una primera muestra biológica obtenida de un fluido corporal del individuo, seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero y plasma, inmediatamente antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina;
 - medir sVCAM en una segunda muestra biológica, en donde la segunda muestra biológica se ha obtenido de un fluido corporal del individuo seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero y plasma, en un plazo de

treinta y un días después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina;

5 c) determinar si se ha producido una disminución en los niveles de sVCAM entre la primera y la segunda muestras biológicas, en donde la disminución está correlacionada con una disminución en la actividad alfa-4-integrina en el individuo, y determinar de esta forma si existe una diferencia en la actividad alfa-4-integrina en el individuo después de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina en comparación con la que había antes de la administración del inhibidor de alfa-4-integrina, y

10 d) determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo, en donde la no disminución, o una disminución estadísticamente insignificativa ($p > 0,05$) en los niveles de sVCAM entre la primera y segunda muestras biológicas indica una respuesta ineficaz al inhibidor de alfa-4-integrina lo que requiere un ajuste en el tratamiento del individuo.

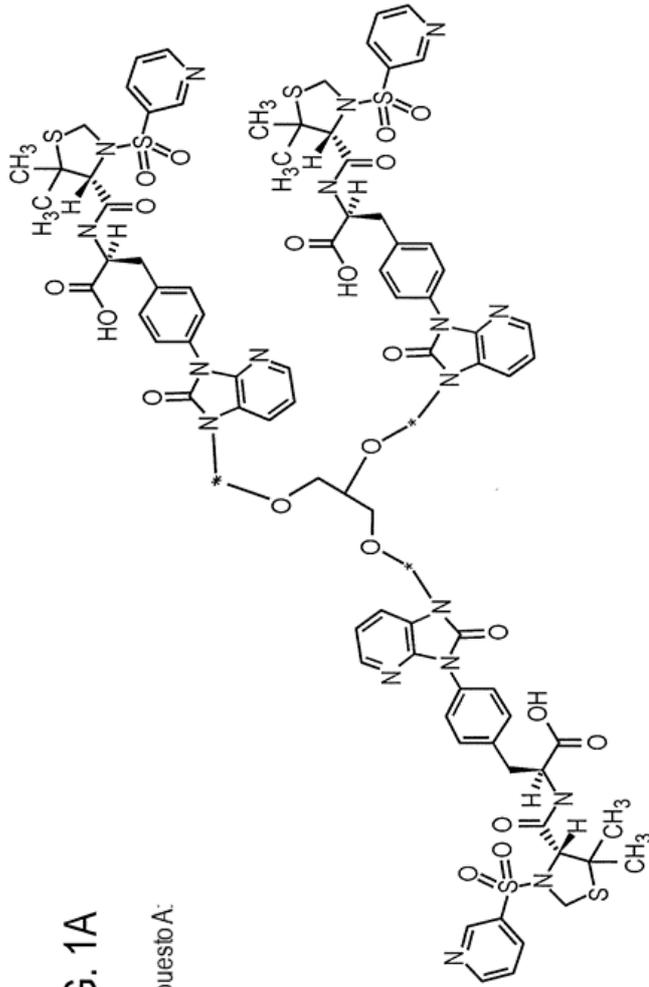
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la enfermedad o el trastorno son esclerosis múltiple(MS).

15 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la enfermedad o el trastorno son la enfermedad inflamatoria del intestino.

14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que la actividad alfa-4-integrina es la actividad alfa-4 beta-1 integrina.

FIG. 1A

Compuesto A:



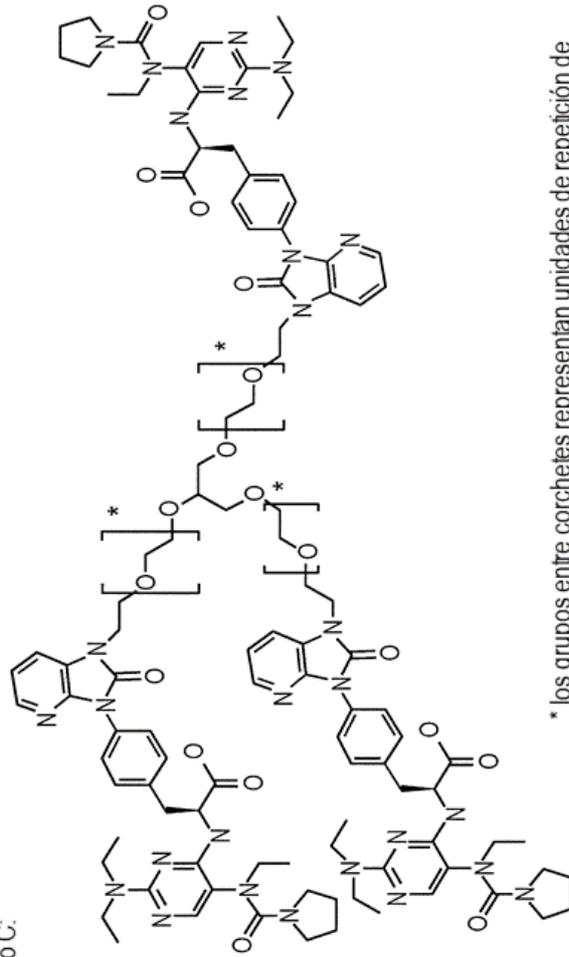
*¹ representa unidades de repetición de etilenglicol que proporciona un peso molecular total de aproximadamente 40 kDa distribuidos entre los tres brazos de PEG

Compuesto B:

Ácido (S)-2-(2-dietilamino)-2-(N-isopropilmethylsulfonamido)pirimidin-4-ilamino)-3-(4-pirrolidina-1-carboniloxi)fenil)propanoico

FIG. 1B

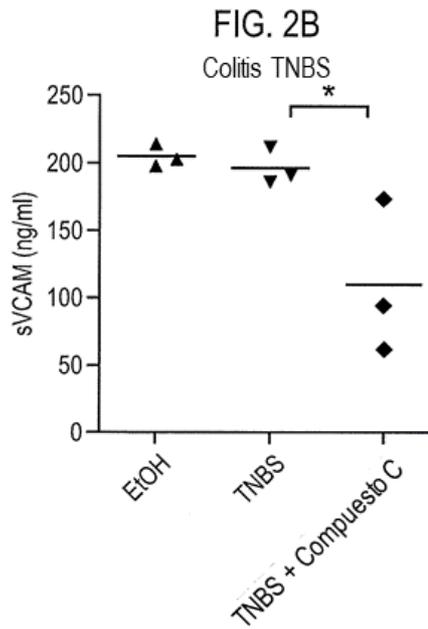
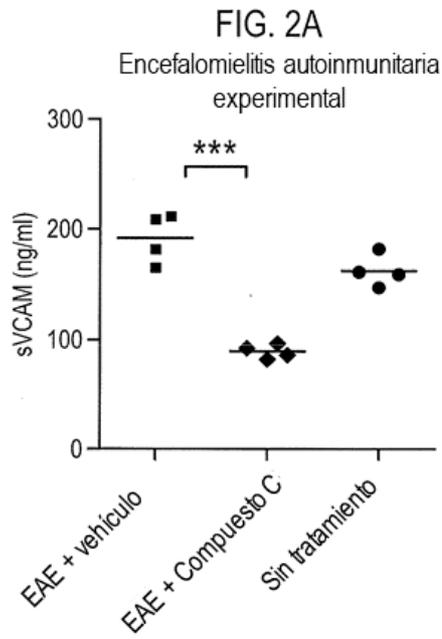
Compuesto C:

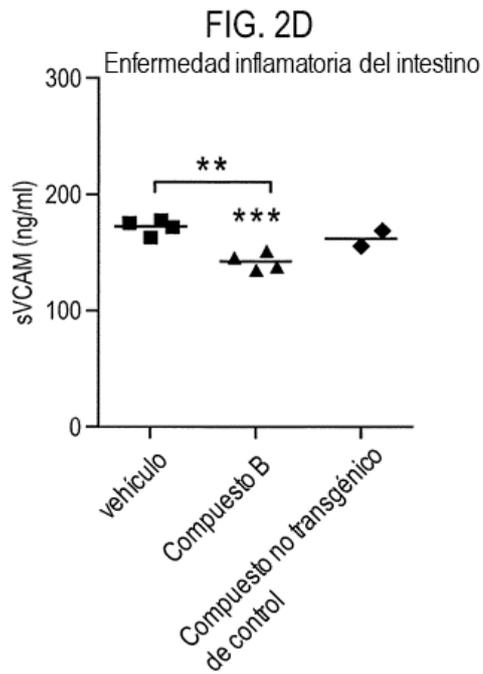
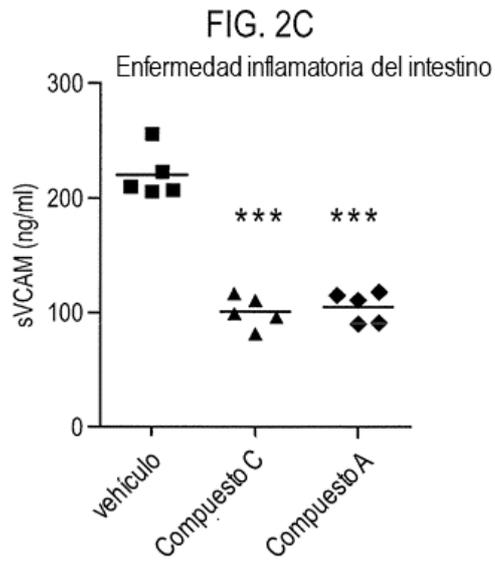


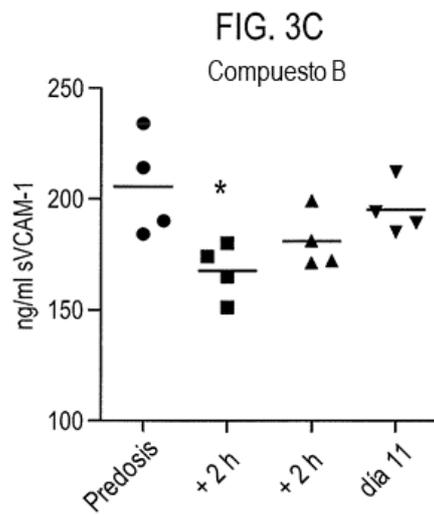
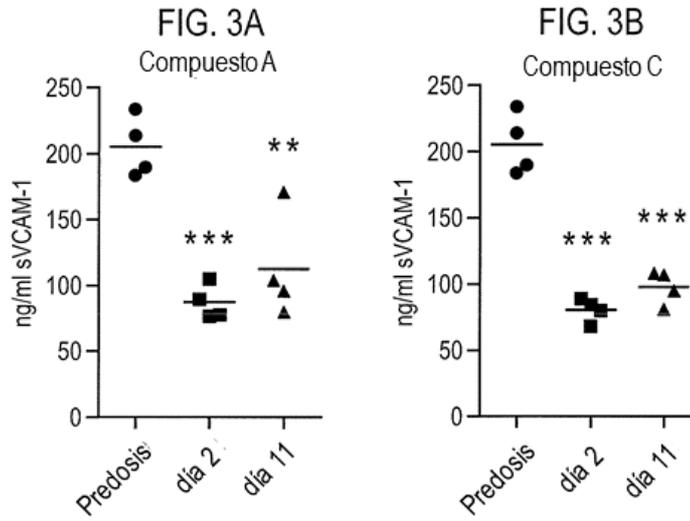
* los grupos entre corchetes representan unidades de repetición de etilenglicol que proporcionan un peso molecular total de aproximadamente 40 kDa distribuidos entre los tres brazos de PEG

Compuesto D:

N-((5,5-dimetil-3-(piridin-3-ilsulfonil)-1,3-tiazolidin-4-il)carbonil)-O-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-L-tirosinato de isopropilo







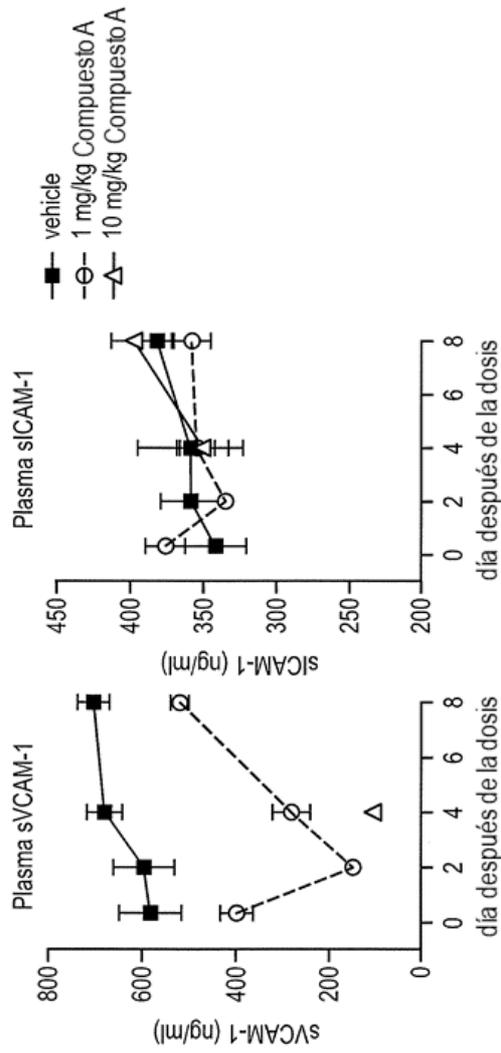
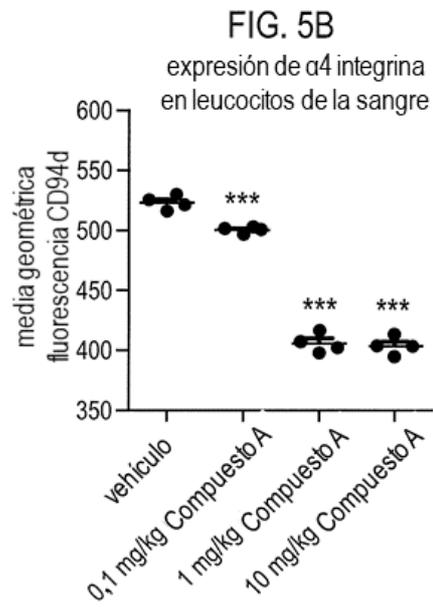
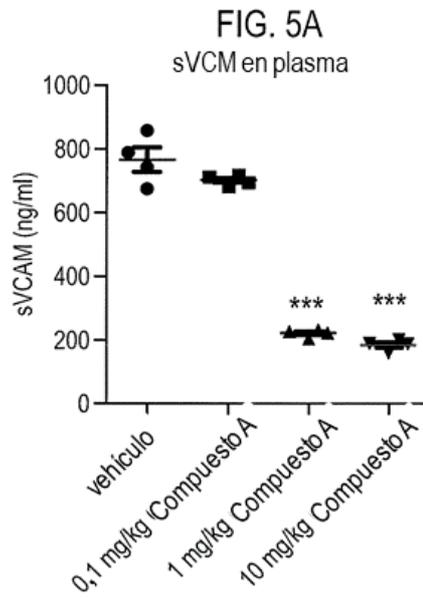


FIG. 4



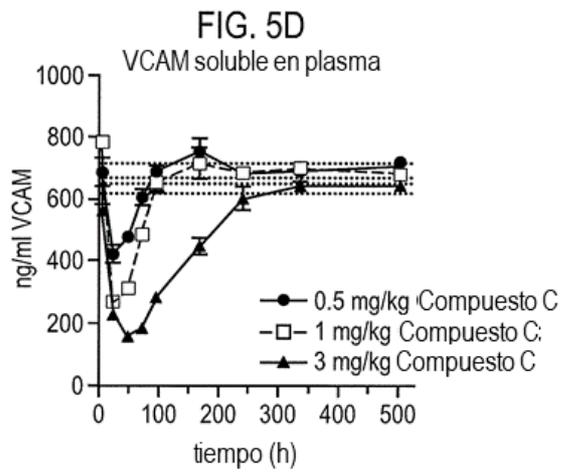
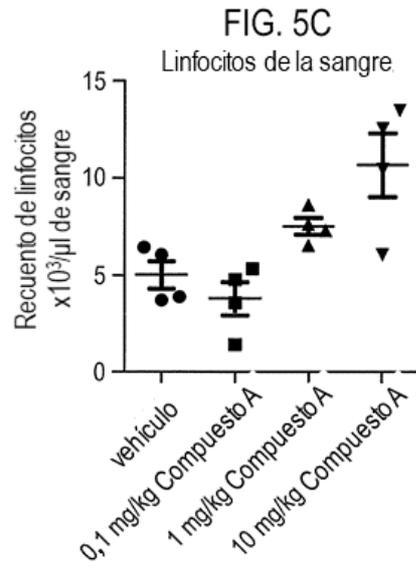


FIG. 5E

expresión de $\alpha 4$ en leucocitos de la sangre

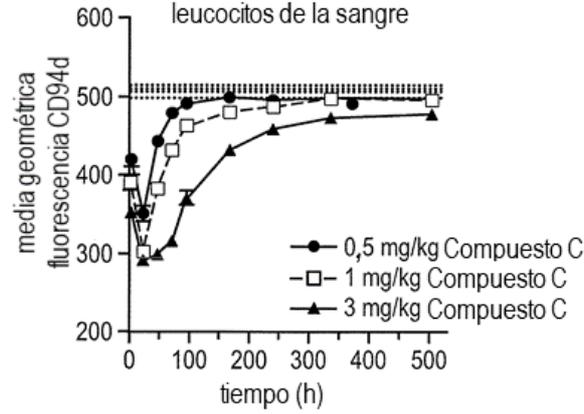
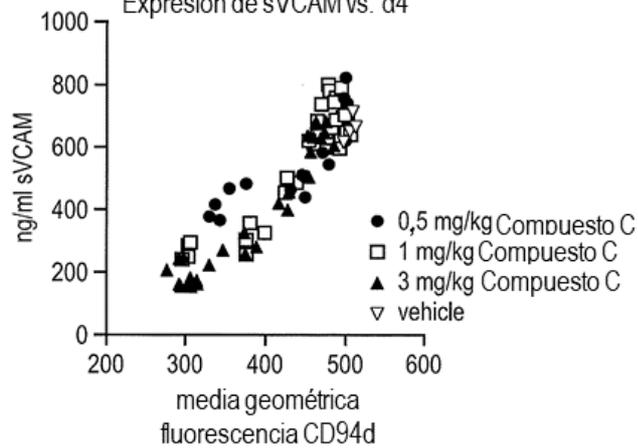
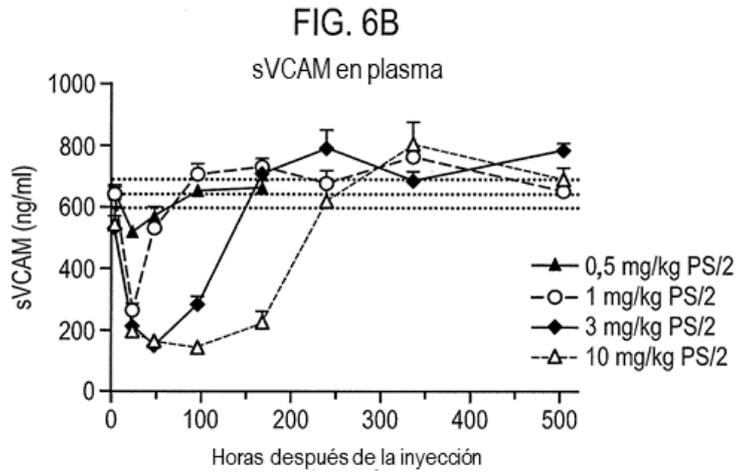
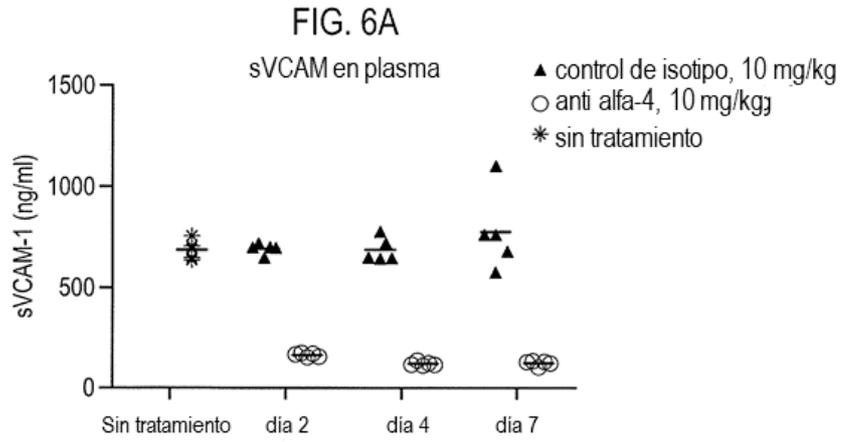


FIG. 5F

Expresión de sVCAM vs. $\alpha 4$





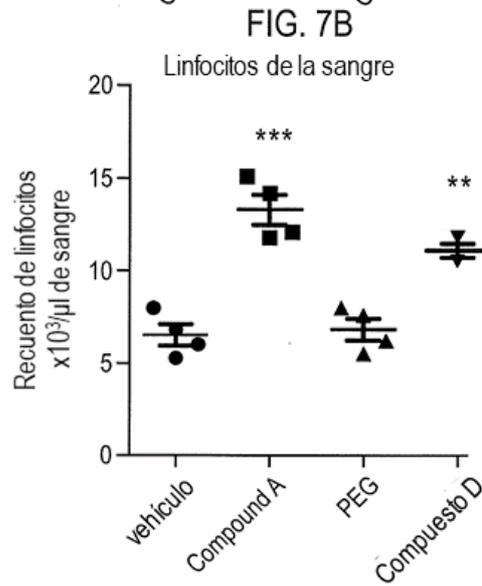
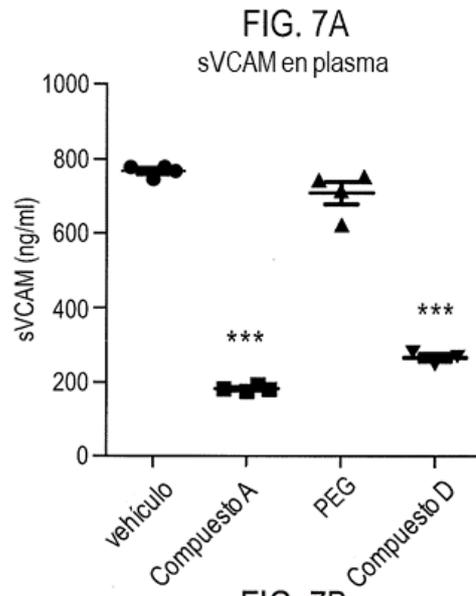


FIG. 8A

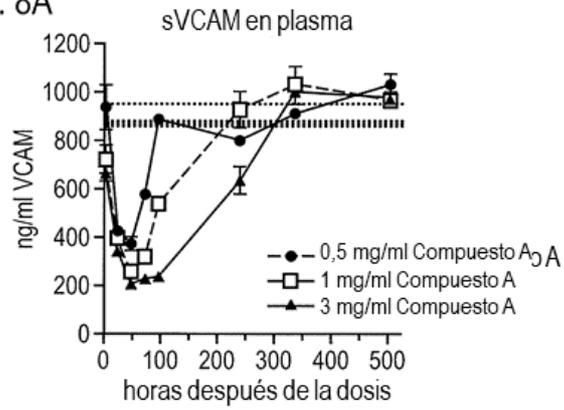


FIG. 8B

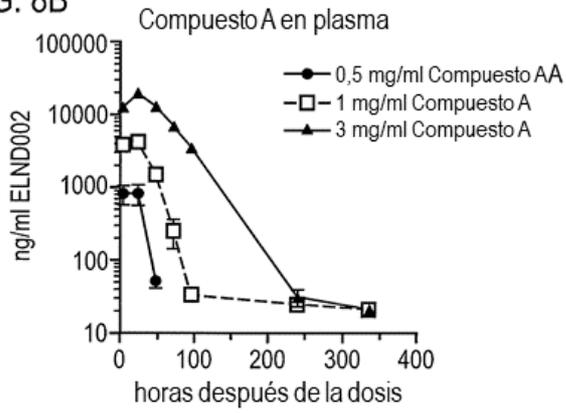
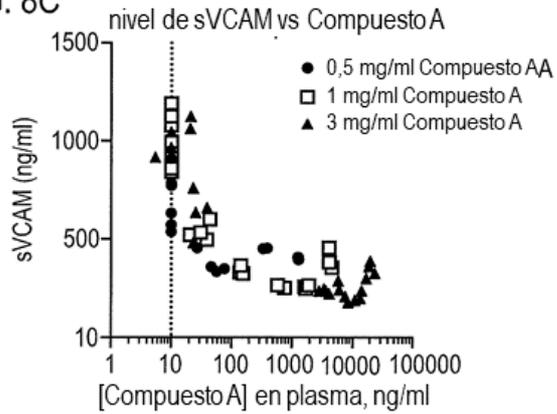
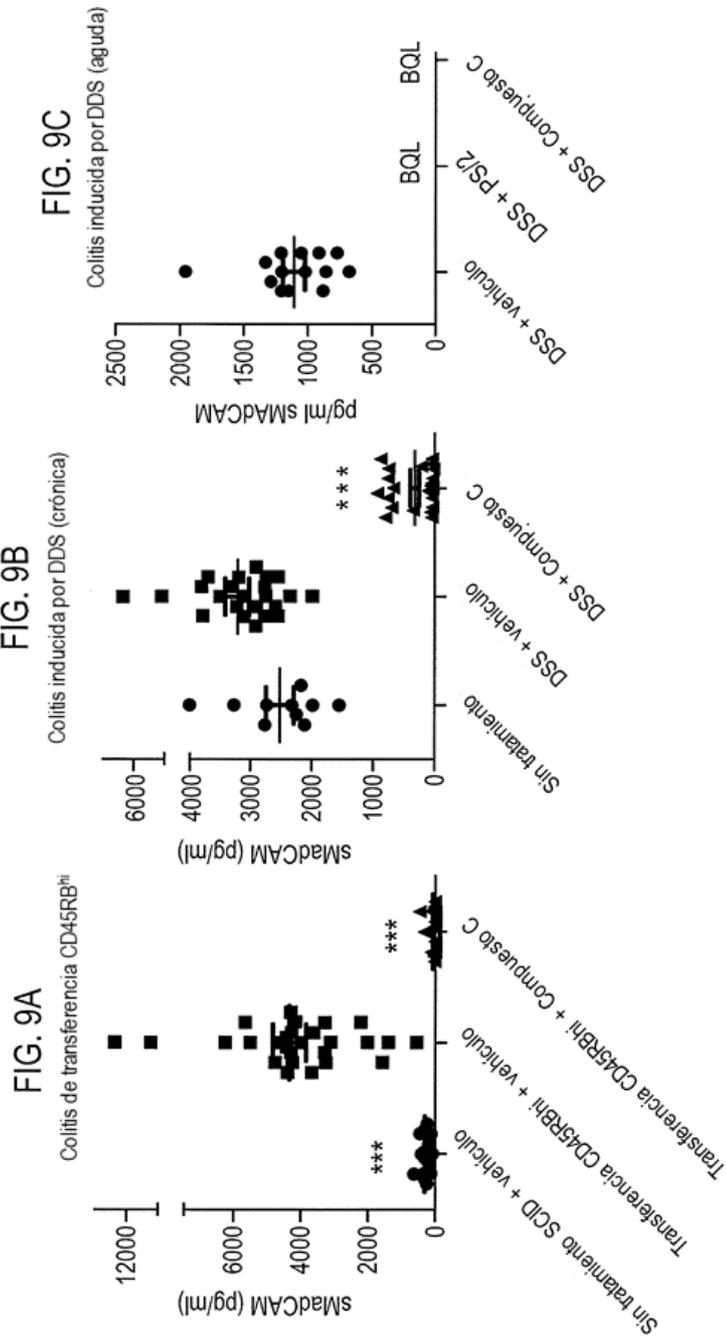
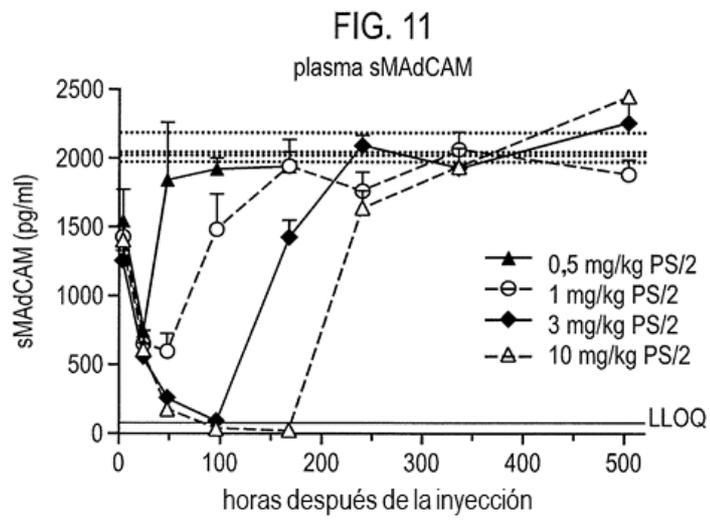
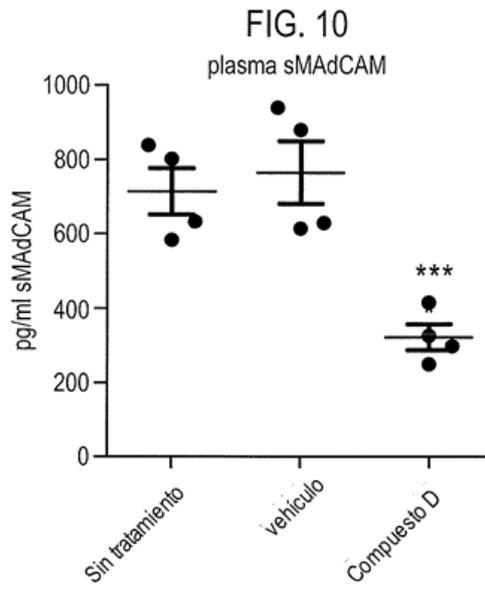
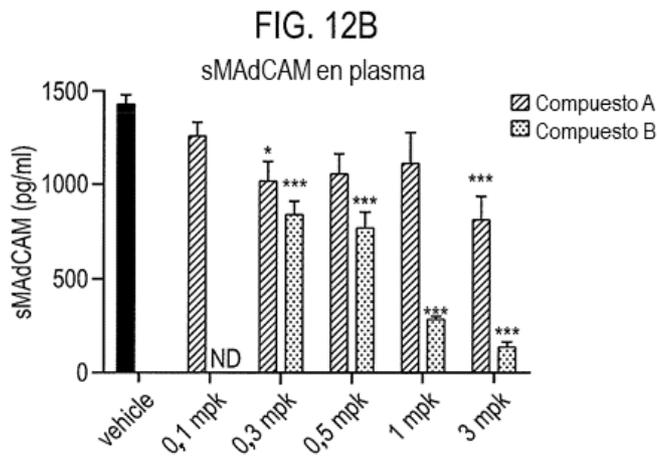
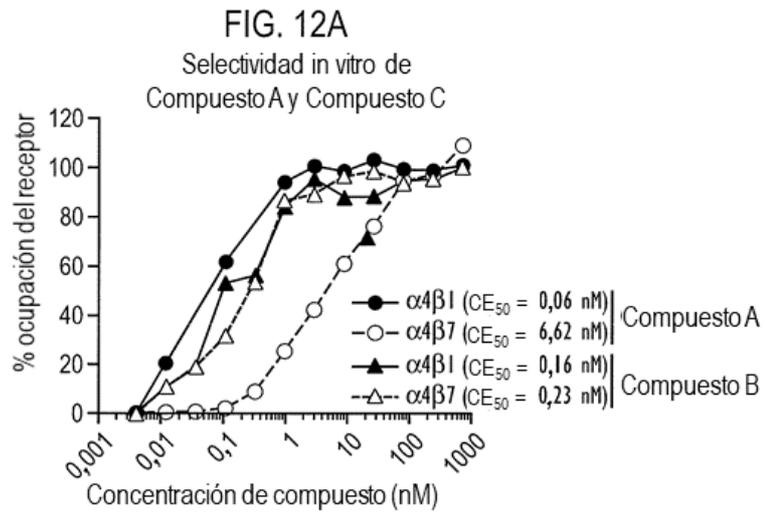


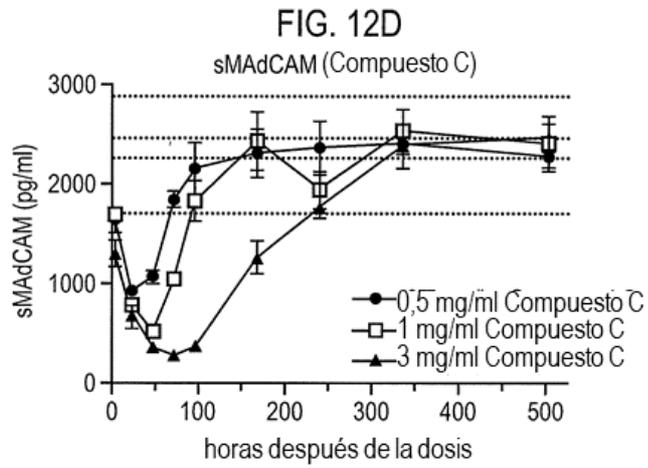
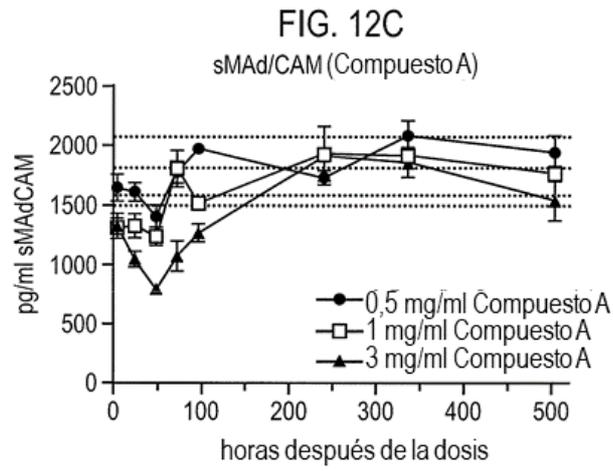
FIG. 8C











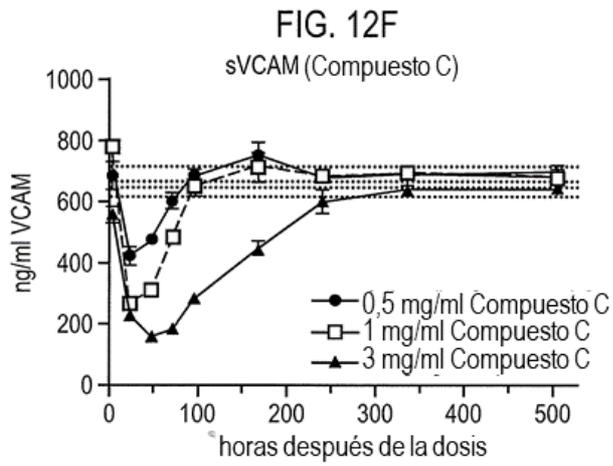
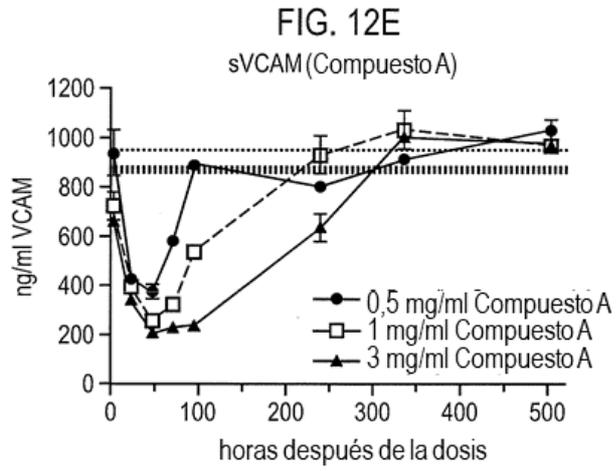


FIG. 13A

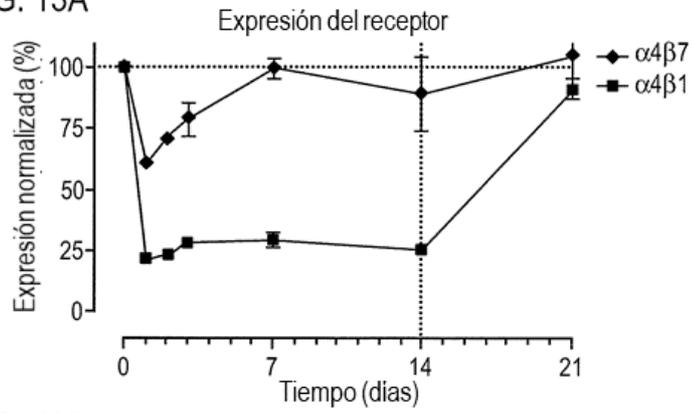


FIG. 13B

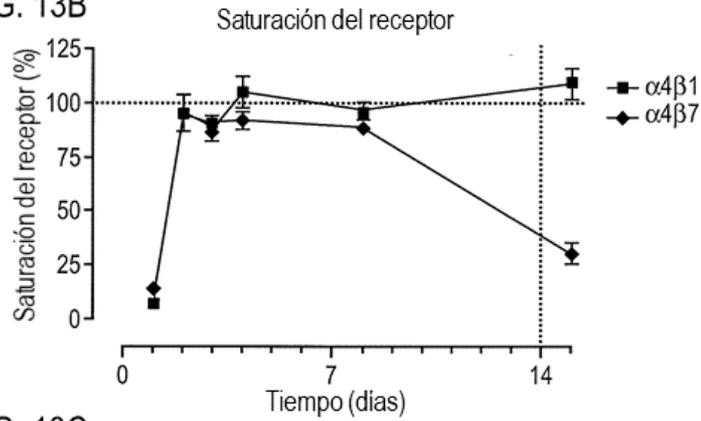
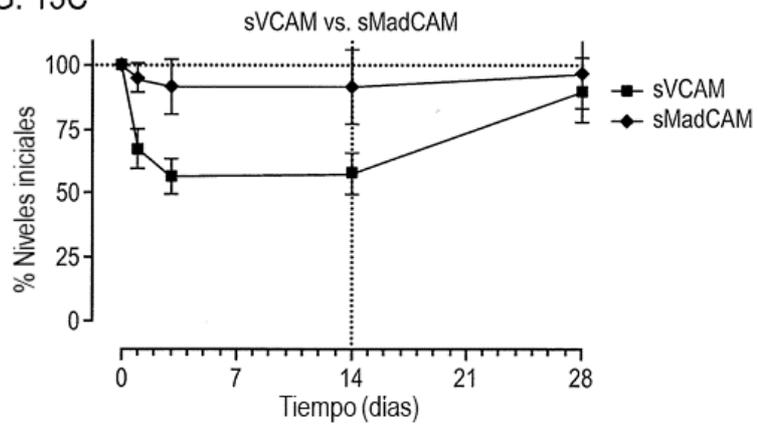


FIG. 13C



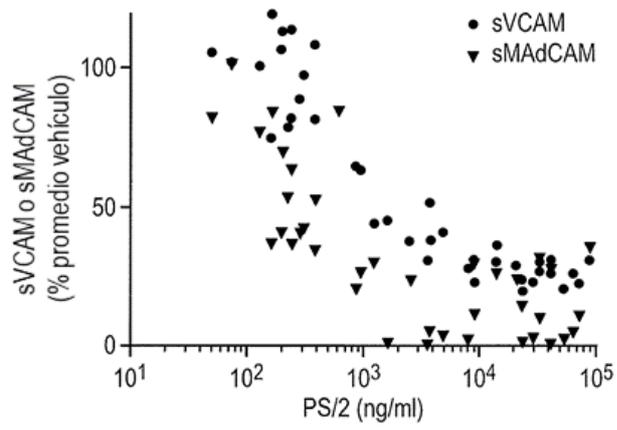


FIG. 14