

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 305**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/US2013/063384**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14055824**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13844154 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2903691**

54 Título: **Procedimientos para diagnosticar y tratar enfermedades inflamatorias intestinales**

30 Prioridad:

05.10.2012 US 201261710656 P
31.07.2013 US 201361860422 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KEIR, MARY y
TEW, GAIK WEI

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 738 305 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para diagnosticar y tratar enfermedades inflamatorias intestinales

5 LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias.

CAMPO

10 Se proporcionan biomarcadores predictivos de reactividad a antagonistas de la integrina beta7, incluyendo anticuerpos antisubunidad de integrina beta7, y procedimientos de uso de dichos biomarcadores. Además, se proporcionan procedimientos de tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales tales como enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. También se proporcionan procedimientos de uso de dichos biomarcadores predictivos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

ANTECEDENTES

20 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una afección autoinmunitaria inflamatoria crónica del tubo gastrointestinal (GI), que se presenta clínicamente como colitis ulcerosa (CU) o enfermedad de Crohn (EC). La EC es una enfermedad inflamatoria transparietal crónica con el potencial de afectar a cualquier parte del tubo GI completo, y la CU es una inflamación de la mucosa del colon. Ambas afecciones se caracterizan clínicamente por frecuentes deposiciones, desnutrición y deshidratación, con alteración en las actividades de la vida diaria. La EC se complica con frecuencia por el desarrollo de hipoabsorción, estenosis y fístulas y puede requerir cirugía repetida. La CU, con menos frecuencia, se puede complicar con diarrea hemorrágica grave y megacolon tóxico, que también requieren cirugía. Ambas afecciones de EII se asocian con un riesgo incrementado de neoplasia maligna del tubo GI. La etiología de la EII es compleja, y muchos aspectos de la patogenia siguen sin estar claros.

30 El tratamiento de la EII moderada a grave plantea dificultades importantes a los médicos, ya que el tratamiento convencional con corticoesteroides y el tratamiento inmunomodulador (por ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato) se asocia con efectos secundarios e intolerancia y no ha mostrado un beneficio demostrado en el tratamiento de mantenimiento (esteroides). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), tales como infliximab (un anticuerpo quimérico) y adalimumab (un anticuerpo completamente humano), se usan actualmente en el tratamiento de la EC. El infliximab también ha demostrado su eficacia y se ha aprobado para su uso en la CU. Sin embargo, aproximadamente un 10 %-20 % de los pacientes con EC no responden principalmente al tratamiento anti-TNF, y otro ~20 %-30 % de los pacientes con EC pierden respuesta a lo largo del tiempo (Schnitzler et al., *Gut* 58:492-500 (2009)). Otros acontecimientos adversos (AA) asociados con los anti-TNF incluyen tasas elevadas de infección bacteriana, incluyendo tuberculosis y, más raramente, linfoma y desmielinización (Chang et al., *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatology* 3:220 (2006); Hoentjen et al., *World J Gastroenterol.* 15(17): 2067 (2009)). Ningún tratamiento actualmente disponible consigue una remisión mantenida en más de un 20 %-30 % de los pacientes de EII con enfermedad crónica (Hanauer et al., *Lancet* 359:1541-49 (2002); Sandbom et al., *N Engl J Med* 353:1912-25 (2005)). Además, la mayoría de los pacientes no consiguen una remisión mantenida sin esteroides y la cicatrización de la mucosa, que son resultados clínicos que se correlacionan con la verdadera modificación de la enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un tratamiento más dirigido en la EII que esté optimizado para su uso crónico: un perfil de seguridad mejorado con remisión mantenida, en particular remisión sin esteroides y prevención de complicaciones a largo plazo en una mayor proporción de pacientes, incluyendo los pacientes que nunca responden a un agente terapéutico anti-TNF o pierden respuesta a lo largo del tiempo (pacientes con respuesta inadecuada al TNF o pacientes con RI-TNF).

50 Las integrinas son receptores de glucoproteínas de superficie celular heterodiméricas alfa/beta que desempeñan una función en numerosos procesos celulares, incluyendo la adhesión, señalización, proliferación y migración leucocitarias, así como en la regulación génica (Hynes, R. O., *Cell*, 1992, 69:11-25; y Hemler, M. E., *Annu. Rev. Immunol.*, 1990, 8:365-368). Se componen de dos subunidades transmembranarias α y β heterodiméricas que interactúan de manera no covalente y se unen específicamente a distintas moléculas de adhesión celular (CAM) en endotelios, epitelios y proteínas de la matriz extracelular. De esta manera, las integrinas pueden funcionar como receptores de adhesión celular específicos de tejido que ayudan al reclutamiento de leucocitos de la sangre en casi todos los sitios del tejido de una manera altamente regulada, desempeñando una función en la migración dirigida de los leucocitos al tejido normal y a los sitios de inflamación (von Andrian et al., *N Engl J Med* 343: 1020-34 (2000)). En el sistema inmunitario, las integrinas están implicadas en el transporte, la adhesión y la infiltración de los leucocitos durante los procesos inflamatorios (Nakajima, H. et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 179:1145-1154). La expresión diferencial de las integrinas regula las propiedades adhesivas de las células y diferentes integrinas están implicadas en diferentes respuestas inflamatorias. (Butcher, E. C. et al., *Science*, 1996, 272:60-66). Las integrinas que contienen beta7 (es decir, alfa4beta7 y alfaEbeta7) se expresan principalmente en monocitos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos, pero no en neutrófilos (Elices, M. J. et al., *Cell*, 1990, 60:577-584).

La integrina $\alpha 4\beta 7$ es un receptor de la migración dirigida de leucocitos que es importante en la migración de las células a la mucosa intestinal y los tejidos linfoides asociados, tales como los parches de Peyer en el intestino delgado, los folículos linfoides en el intestino grueso y los ganglios linfáticos mesentéricos. En el intestino, el rodamiento de leucocitos y la adhesión firme al endotelio de la mucosa se inicia mediante señales de las quimiocinas y está mediado por medio de sialil Lewis X asociado a la molécula de adhesión celular adresina de la mucosa (MAdCAM)-1. La señalización de quimiocinas induce que la integrina $\alpha 4\beta 7$ experimente un cambio de afinidad de unión baja a alta a MAdCAM-1. A continuación, el leucocito se detiene y comienza el proceso de extravasación a través del endotelio vascular hasta el tejido subyacente. Se cree que este proceso de extravasación se produce tanto en el estado normal de recirculación de las células inmunitarias como en afecciones inflamatorias (von Andrian *et al.*, *supra*). El número de células $\alpha 4\beta 7^+$ en los infiltrados y la expresión del ligando MAdCAM-1 son más altos en los sitios de inflamación crónica, tal como en el tubo intestinal de pacientes con CU o EC (Briskin *et al.*, *Am J Pathol* 151:97-110 (1997); Souza *et al.*, *Gut* 45:856-63 (1999)). $\alpha 4\beta 7$ se une preferentemente a las vénulas endoteliales altas que expresan MAdCAM-1 y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1, así como al fragmento CS-1 de la molécula de la matriz extracelular fibronectina (Chan *et al.*, *J Biol Chem* 267:8366-70 (1992); Ruegg *et al.*, *J. Cell Biol* 17:179-89 (1992); Berlin *et al.*, *Cell* 74:185-95 (1993)). Conjuntamente con la MAdCAM-1 expresada de forma constitutiva en los vasos de la mucosa intestinal, la integrina $\alpha 4\beta 7$ desempeña una función selectiva en el tropismo intestinal de los leucocitos, pero no parece contribuir a la migración dirigida de los leucocitos al tejido periférico o el SNC. En cambio, el transporte linfático periférico se ha asociado con la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con VCAM-1 (Yednock *et al.*, *Nature* 356:63-6 (1992); Rice *et al.*, *Neurology* 64:1336-42 (2005)).

Otro miembro de la familia de las integrinas $\beta 7$, expresado exclusivamente en los linfocitos T y asociado a los tejidos de la mucosa, es la integrina $\alpha E\beta 7$, también conocida como CD103. La integrina $\alpha E\beta 7$ se une selectivamente a E-cadherina en las células epiteliales y se ha propuesto que desempeña una función en la retención de linfocitos T en el tejido mucoso en el compartimiento de linfocitos intraepiteliales (Cepek *et al.*, *J Immunol* 150:3459-70 (1993); Karecla *et al.* *Eur J Immunol* 25:852-6 (1995)). Se ha informado de que las células $\alpha E\beta 7^+$ en la lámina propia presentan citotoxicidad contra las células epiteliales estresadas o infectadas (Hadley *et al.*, *J Immunol* 159:3748-56 (1997); Buri *et al.*, *J Pathol* 206:178-85 (2005)). La expresión de $\alpha E\beta 7$ se incrementa en la EC (Elewaut *et al.*, *Acta Gastroenterol Belg* 61:288-94 (1998); Oshitani *et al.*, *Int J Mol Med* 12:715-9 (2003)), y se ha informado de que el tratamiento con anticuerpos anti- $\alpha E\beta 7$ atenúa la colitis experimental en ratones, lo que implica una función de los linfocitos $\alpha E\beta 7^+$ en modelos experimentales de EII (Ludviksson *et al.*, *J Immunol* 162:4975-82 (1999)).

Según se informa, la administración de anticuerpos monoclonales contra alfaEbeta7 previene y mejora la colitis inducida por inmunización en ratones IL-2^{-/-}, lo que sugiere que la aparición y el mantenimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal dependen de la localización colónica de los linfocitos CD4⁺ de la lámina propia que expresan alfaEbeta7 (Ludviksson *et al.*, *J Immunol.* 1999, 162(8):4975-82). Un anticuerpo anti- $\alpha 4$ (natalizumab), según se informa, tiene eficacia en el tratamiento de pacientes con EC (Sandbom *et al.*, *N Engl J Med* 2005; 353:1912-25) y un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (MLN-02, MLN0002, vedolizumab). según se informa, es eficaz en pacientes con CU (Feagan *et al.*, *N Engl J Med* 2005;352:2499-507). También se está desarrollando un segundo anticuerpo anti-alfa4/beta7 (AMG 181) y han comenzado recientemente los ensayos clínicos (identificador de clinicaltrials.gov, NCT01164904, septiembre de 2012). Estos estudios y hallazgos validan $\alpha 4\beta 7$ como diana terapéutica y respaldan la idea de que la interacción entre $\alpha 4\beta 7$ y MAdCAM-1 media la patogenia de la EII. Por tanto, los antagonistas de la integrina beta7 tienen un gran potencial como agente terapéutico en el tratamiento de la EII.

Se han descrito previamente anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra la subunidad de integrina $\beta 7$. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO2006/026759. Uno de dichos anticuerpos, rhuMAb Beta7 (etrolizumab) se deriva del anticuerpo monoclonal de rata contra inmunoglobulinas de ratón/humano FIB504 (Andrew *et al.* 1994). Se genomanipuló para que incluyera marcos de cadenas pesadas de IgG1 humanas y cadenas ligeras $\kappa 1$. Publicación de patente internacional n.º WO2006/026759. Se ha descrito previamente la administración de etrolizumab a pacientes humanos de acuerdo con determinadas pautas posológicas. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO/2012/135589.

RhuMAb Beta7 (etrolizumab) se une a $\alpha 4\beta 7$ (Holzmann *et al.*, *Cell* 56:37-46 (1989); Hu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8254-8 (1992)) y a $\alpha E\beta 7$ (Cepek *et al.*, *J Immunol* 150:3459-70 (1993)), que regulan el transporte y la retención de subconjuntos de linfocitos, respectivamente, en la mucosa intestinal. Los estudios clínicos han demostrado la eficacia de un anticuerpo anti- $\alpha 4$ (natalizumab) para el tratamiento de la EC (Sandbom *et al.*, *N Engl J Med* 353:1912-25 (2005)), y se han informado de resultados alentadores para el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (LDP02/MLN002/MLN0002/vedolizumab) en el tratamiento de la CU (Feagan *et al.*, *N Engl J Med* 352:2499-507 (2005), Feagan *et al.*, *N Engl J Med* 369(8):699-710 (2013)) y también la EC (Sandbom *et al.*, *N Engl J Med* 369(8):711-721 (2013)). Estos hallazgos ayudan a validar $\alpha 4\beta 7$ como una diana terapéutica potencial y respaldan la hipótesis de que la interacción entre $\alpha 4\beta 7$ y la molécula de adhesión celular adresina de la mucosa 1 (MAdCAM 1) contribuye a la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

A diferencia del natalizumab, que se une a $\alpha 4$ y, por tanto, se une tanto a $\alpha 4\beta 1$ como a $\alpha 4\beta 7$, rhuMAb Beta7 se une específicamente a la subunidad $\beta 7$ de $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha E\beta 7$ y no se une a las subunidades individuales de integrina $\alpha 4$ o $\beta 1$. Esto se demostró por la incapacidad del anticuerpo de inhibir la adhesión de células Ramos- $\alpha 4\beta 1+\alpha 4\beta 7$ a la molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM 1) a concentraciones tan altas como 100 nM. Es importante

destacar que esta característica de rhuMAb Beta7 indica selectividad: los subconjuntos de linfocitos T que expresan $\alpha 4\beta 1$, pero no $\beta 7$, no deberían verse directamente afectados por rhuMAb Beta7.

5 El respaldo a los efectos específicos en el intestino de rhuMAb Beta7 sobre la migración dirigida de leucocitos proviene de varios estudios preclínicos *in vivo*. En ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) reconstituidos con linfocitos T CD45RB^{allo}CD4⁺ (un modelo animal de colitis), el rhuMAb Beta7 bloqueaba la migración dirigida de linfocitos radiomarcados al colon inflamado, pero no bloqueaba la migración dirigida al bazo, un órgano linfático periférico. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO2006/026759. Además, el anticuerpo quimérico de rata y ratón anti- $\beta 7$ murino (anti $\beta 7$, muFIB504) no pudo reducir el grado histológico de la inflamación del sistema nervioso central (SNC) ni mejorar la supervivencia a la enfermedad en ratones transgénicos para el receptor de linfocitos T de la proteína básica de mielina (MBP-TCR) con encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple. *Id.* Además, en dos estudios de toxicidad en macacos cangrejeros, rhuMAb Beta7 indujo un incremento moderado en el número de linfocitos de sangre periférica, que se debía en gran parte a un incremento notable (en aproximadamente de tres a seis veces) en los linfocitos T de sangre periférica CD45RA- $\beta 7$ ^{allo}, un subconjunto que es fenotípicamente similar a los linfocitos T efectores/de memoria de migración dirigida al intestino en seres humanos. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO2009/140684; Stefanich et al., Br. J. Pharmacol. 162:1855-1870 (2011). Por el contrario, rhuMAb Beta7 tuvo un efecto de mínimo a nulo sobre el número de linfocitos T CD45RA+ $\beta 7$ de sangre periférica intermedios, un subconjunto que es fenotípicamente similar a linfocitos T vírgenes en los seres humanos, y ningún efecto sobre el número de linfocitos T CD45RA- $\beta 7$ ^{bajo} de sangre periférica, un subconjunto que es fenotípicamente similar a linfocitos T efectores/de memoria de migración dirigida periféricos en seres humanos, lo que confirma la especificidad de rhuMAb Beta7 por la subpoblación de linfocitos de migración dirigida al intestino. Publicación de patente internacional n.º WO2009/140684; Stefanich et al., Br. J. Pharmacol. 162:1855-1870 (2011).

25 Aunque los estudios clínicos han demostrado la eficacia de un anticuerpo anti- $\alpha 4$ (natalizumab) para el tratamiento de la EC (Sandbom et al., N Engl J Med 353:1912-25 (2005)) y se ha informado de resultados alentadores para el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (LDP02/MLN02/MLN0002/vedolizumab) en el tratamiento de la CU, sigue existiendo la necesidad de mejoras adicionales en el tratamiento de estos trastornos. Por ejemplo, el tratamiento con natalizumab se ha asociado con casos confirmados de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) en pacientes con enfermedad de Crohn (y, por separado, esclerosis múltiple) que recibieron tratamiento concomitante con natalizumab e inmunosupresores. La LMP es una afección neurológica potencialmente mortal relacionada con la reactivación de un poliovirus (virus JC) y la replicación vírica activa en el cerebro. Ninguna intervención conocida puede prevenir de manera fiable la LMP o tratar adecuadamente la LMP, si se produce. Una limitación del tratamiento con vedolizumab es que se administra por ruta intravenosa, lo que puede ser incómodo para el paciente y también se puede asociar con acontecimientos adversos o no deseados, por ejemplo, reacciones en el sitio de infusión. En consecuencia, existe la necesidad de enfoques terapéuticos mejorados para el tratamiento de trastornos inflamatorios gastrointestinales tales como la EII, por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, así como pautas posológicas más deseables.

40 A menudo, se desconoce, antes del tratamiento, si un paciente responderá a un agente terapéutico particular o una clase de agentes terapéuticos. En consecuencia, como los pacientes con EII en general, y los pacientes con CU y EC en particular, buscan tratamiento, hay una gran cantidad de ensayos y errores implicados en la búsqueda de agentes terapéuticos eficaces para un paciente en particular. Dicho sistema de ensayo y error a menudo implica un riesgo e incomodidad considerables para el paciente para encontrar el tratamiento más eficaz. Por tanto, existe la necesidad de medios más eficaces para determinar qué pacientes responderán a determinado tratamiento y para incorporar dichas determinaciones a regímenes de tratamiento más eficaces para pacientes con EII.

50 Por lo tanto, sería muy ventajoso contar con procedimientos de diagnóstico adicionales, incluyendo procedimientos de diagnóstico predictivos, que se puedan usar para identificar objetivamente a los pacientes con mayor probabilidad de responder al tratamiento con diversos agentes terapéuticos para la EII, incluyendo anticuerpos antisubunidad de integrina beta7. Por tanto, existe una necesidad continua de identificar nuevos biomarcadores asociados con la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn así como otros trastornos inflamatorios intestinales y que sean predictivos de la respuesta a los anticuerpos antisubunidad de integrina beta7. Además, la información estadística y biológicamente significativa y reproducible con respecto a dichas asociaciones se podría utilizar como un componente integrado en los esfuerzos por identificar subconjuntos específicos de pacientes con CU o EC, tales como los pacientes con RI-TNF, que cabría esperar que se beneficiaran significativamente del tratamiento con anticuerpos antisubunidad de integrina beta7, por ejemplo, cuando el agente terapéutico es, o se ha demostrado en estudios clínicos que es, de beneficio terapéutico en dicha subpoblación de pacientes con CU o EC específica.

60 La invención descrita en el presente documento cumple determinadas necesidades descritas anteriormente y proporciona otros beneficios. El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1 a 20.

SUMARIO

65 Los procedimientos de la invención se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de que los niveles de expresión de ARNm de determinados genes en biopsias intestinales y en sangre completa periférica, así como los

niveles de expresión de proteínas celulares de determinados genes en biopsias intestinales son predictivos de la reactividad de los pacientes que padecen un trastorno inflamatorio gastrointestinal al tratamiento con antagonistas de la integrina beta7.

5 En un aspecto de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se proporcionan procedimientos de predicción de la respuesta de un paciente que padece un trastorno inflamatorio gastrointestinal a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7. En determinados modos de realización, se obtiene una muestra biológica del paciente y se miden los niveles de expresión de ARNm. En un modo de realización, se mide la expresión de ARNm de integrina beta7. En un modo de realización, se mide la expresión de ARNm de integrina

10 alfaE. En un modo de realización, se mide la expresión de CD3 épsilon. En un modo de realización, se mide la expresión de una combinación de dos o tres ARNm seleccionados de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon. En un modo de realización, la muestra biológica es una muestra de biopsia tisular. En un modo de realización, la biopsia se obtiene de tejido intestinal. En un modo de realización, la muestra biológica es sangre completa periférica. En un modo de realización, la sangre completa periférica se recoge en un tubo PAXgene. En

15 determinados modos de realización, el nivel de expresión de ARNm se mide mediante un procedimiento de PCR. En un modo de realización, el procedimiento de PCR es qPCR. En determinados modos de realización, el nivel de expresión de ARNm se compara con un valor de mediana. En un modo de realización, se predice que el paciente responderá al tratamiento que comprende el antagonista de integrina beta7 si el nivel de expresión del ARNm de una o más de integrina beta7, integrina alfaE o CD3 épsilon está elevado en comparación con un valor de

20 referencia, que en determinados modos de realización es un valor de mediana. En un modo de realización, se predice que el paciente no responderá al tratamiento que comprende el antagonista de integrina beta7 si el nivel de expresión del ARNm de una o más de integrina beta7, integrina alfaE o CD3 épsilon es bajo en comparación con un valor de referencia, que en determinados modos de realización es un valor de mediana. En un modo de realización, la respuesta es remisión clínica. En un modo de realización, la respuesta es la cicatrización de la mucosa. En un

25 modo de realización, la respuesta es respuesta clínica. En determinados modos de realización, se determina que la remisión en el paciente se induce cuando la puntuación clínica absoluta de la Clínica Mayo es ≤ 2 y no hay una subpuntuación individual >1 , lo que también se conoce como remisión clínica. En determinados modos de realización, se determina que se ha producido cicatrización de la mucosa cuando se determina que el paciente tiene una subpuntuación endoscópica de 0 o 1 evaluada por sigmoidoscopia flexible. En determinadas de dichos modos

30 de realización, se determina que los pacientes que experimentan cicatrización de la mucosa tienen una subpuntuación endoscópica de 0.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para predecir la reactividad de un paciente con un trastorno inflamatorio gastrointestinal a un tratamiento con un antagonista de integrina beta7. En un modo de realización, se

35 determina el nivel de expresión del ARNm de la integrina beta7 en una muestra biológica del paciente. En un modo de realización, se determina el nivel de expresión del ARNm de la integrina alfaE en una muestra biológica del paciente. En un modo de realización, se determina el nivel de expresión del ARNm de CD3 épsilon en una muestra biológica del paciente. En un modo de realización, se determina el nivel de expresión de ARNm de dos o tres ARNm seleccionados de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon en una muestra biológica del paciente. En

40 determinados modos de realización, la expresión elevada del ARNm de la integrina beta7 en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un valor de mediana, o la expresión elevada del ARNm de la integrina alfaE en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un valor de mediana, o la expresión elevada del ARNm de CD3 épsilon en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un valor de mediana, detectada en la muestra biológica identifica al paciente como uno que probablemente responderá al tratamiento con un antagonista de

45 integrina beta7.

Aún en otro aspecto, se obtiene una muestra biológica del paciente y se mide el número de células que expresan una o una combinación de determinadas proteínas y se compara con el número total de células o se determina el

50 número de células que expresan las proteínas en un campo de gran aumento en un microscopio óptico. En un modo de realización, se mide el número de células que expresan la integrina beta7. En un modo de realización, se mide el número de células que expresan la integrina alfaE. En un modo de realización, se mide el número de células que expresan CD3 épsilon. En un modo de realización, se mide el número de células que expresan una combinación de dos o tres proteínas seleccionadas de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon. En un modo de realización, la muestra biológica es una muestra de biopsia tisular. En un modo de realización, la biopsia se obtiene de tejido

55 intestinal. En un modo de realización, la muestra biológica se coloca en formol y, opcionalmente, se incluye en bloques de parafina. En determinados modos de realización, el número de células que expresan una o una combinación de integrina beta7, integrina alfaE o CD3 épsilon se mide mediante un procedimiento inmunohistoquímico. En determinados modos de realización, el número de células que expresan una o una combinación de integrina beta7, integrina alfaE o CD3 épsilon se compara con el número total de células en una

60 zona dada. En un modo de realización, se predice que el paciente responderá al tratamiento que comprende el antagonista de integrina beta7 si el número de células que expresan una o más de integrina beta7, integrina alfaE o CD3 épsilon está elevado (o es alto) en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un valor de mediana. En un modo de realización, se predice que el paciente no responderá al tratamiento que comprende el antagonista de integrina beta7 si el número de células que expresan una o más de integrina beta7, integrina alfaE o CD3 épsilon

65 es bajo en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un valor de mediana. En un modo de realización, la respuesta es remisión clínica. En un modo de realización, la respuesta es la curación de la mucosa. En un modo de

realización, la respuesta es respuesta clínica. En determinados modos de realización, se determina que la remisión en el paciente se induce cuando la puntuación clínica absoluta de la Clínica Mayo es ≤ 2 y no hay una subpuntuación individual >1 , lo que también se conoce como remisión clínica. En determinados modos de realización, se determina que se ha producido cicatrización de la mucosa cuando se determina que el paciente tiene una subpuntuación endoscópica de 0 o 1 evaluada por sigmoidoscopia flexible. En determinadas de dichos modos de realización, se determina que los pacientes que experimentan cicatrización de la mucosa tienen una subpuntuación endoscópica de 0.

Todavía en otro aspecto, se proporcionan procedimientos de identificación de un paciente que padece un trastorno inflamatorio gastrointestinal que probablemente responda a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7. En determinados modos de realización, los procedimientos comprenden: (a) medir el nivel de expresión del ARNm de al menos un gen en una muestra biológica del paciente, en la que el al menos un gen se selecciona de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon; (b) comparar el nivel de expresión del ARNm medido en (a) con un nivel de referencia; y (c) identificar que es más probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7 cuando el nivel de expresión del ARNm medido en (a) está por encima del nivel de referencia. En un modo de realización, el paciente es un ser humano. En un modo de realización, el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF). En un modo de realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para tratar a un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal. En determinados modos de realización, los procedimientos comprenden: (a) medir el nivel de expresión del ARNm de al menos un gen en una muestra biológica del paciente, en la que el al menos un gen se selecciona de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon; (b) comparar el nivel de expresión del ARNm medido en (a) con un nivel de referencia; (c) identificar que es más probable que el paciente responda a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7 cuando el nivel de expresión del ARNm medido en (a) está por encima del nivel de referencia; y (d) administrar el tratamiento cuando el nivel de expresión del ARNm medido en (a) está por encima del nivel de referencia, tratando de este modo el trastorno inflamatorio gastrointestinal. En un modo de realización, se administran 100 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea una vez cada cuatro semanas. En un modo de realización, se administra una dosis de ataque fija de 420 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea, seguida dos semanas después de la administración de la dosis de ataque de una segunda administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida dos semanas después de la segunda administración de una tercera administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida cuatro semanas después de la tercera administración de la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 y, después de esto, la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 una vez cada cuatro semanas. En un modo de realización, el paciente es un ser humano. En un modo de realización, el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF). En un modo de realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión. En un modo de realización, la administración del antagonista de integrina beta7 da como resultado uno o más de los siguientes: (1) una disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de ≥ 1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1, (2) una subpuntuación endoscópica de 0 o 1, (3) MCS ≤ 2 sin subpuntuación individual >1 .

Aún todavía en otro aspecto, se proporcionan procedimientos para predecir la respuesta de un paciente que padece un trastorno inflamatorio gastrointestinal a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7. En determinados modos de realización, los procedimientos comprenden: obtener una muestra biológica del paciente, medir el número de células que expresan al menos una proteína seleccionada de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon, comparar el número de células con expresión en la muestra con un nivel de referencia, y predecir la respuesta del paciente al tratamiento, en los que números elevados de células con expresión en comparación con el nivel de referencia indican una respuesta al tratamiento y un número bajo de células con expresión en comparación con el nivel de referencia indica ausencia de respuesta al tratamiento. En un modo de realización, el paciente es un ser humano. En un modo de realización, el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF). En un modo de realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión. En un modo de realización, la muestra biológica es tejido intestinal. En un modo de realización, los procedimientos comprenden medir el número de células con expresión mediante un procedimiento inmunohistoquímico. En un modo de realización, la medición comprende poner en contacto la muestra con un agente que se une específicamente a la proteína integrina beta7, a la proteína integrina alfaE o a la proteína CD3 épsilon y detectar la cantidad de complejo formada y, de este modo, medir el número de células con expresión. En un modo de realización, el número de células con expresión en la muestra se divide entre el número total de células en la muestra. En un modo de realización, se determina el número de células con expresión en un

campo de gran aumento en un microscopio óptico. En un modo de realización, el nivel de referencia es un valor de mediana.

5 En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para predecir la reactividad de un paciente con un trastorno inflamatorio gastrointestinal a un tratamiento con un antagonista de integrina beta7. En determinados modos de realización, los procedimientos comprenden determinar el número de células que expresan al menos una proteína seleccionada de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon en una muestra biológica del paciente, en la que números elevados de células con expresión en comparación con un nivel de referencia identifican que el paciente es uno que es probable que responda al tratamiento con un antagonista de integrina beta7. En un modo de realización, el paciente es un ser humano. En un modo de realización, el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF). En un modo de realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión. En un modo de realización, la muestra biológica es tejido intestinal. En un modo de realización, los procedimientos comprenden medir el número de células con expresión mediante un procedimiento inmunohistoquímico. En un modo de realización, la medición comprende poner en contacto la muestra con un agente que se une específicamente a la proteína integrina beta7, a la proteína integrina alfaE o a la proteína CD3 épsilon y detectar la cantidad de complejo formada y, de este modo, medir el número de células con expresión. En un modo de realización, el número de células con expresión en la muestra se divide entre el número total de células en la muestra. En un modo de realización, se determina el número de células con expresión en un campo de gran aumento en un microscopio óptico. En un modo de realización, el nivel de referencia es un valor de mediana.

25 Aún en otro aspecto, se proporcionan procedimientos de identificación de un paciente que padece un trastorno inflamatorio gastrointestinal que probablemente responda a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7. En determinados modos de realización, los procedimientos comprenden: (a) medir el número de células que expresan al menos una proteína en una muestra biológica del paciente, en la que la al menos una proteína se selecciona de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon; (b) comparar el número de células medidas en (a) con un nivel de referencia; y (c) identificar que es más probable que el paciente responda al tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7 cuando el número de células medido en (a) está por encima del nivel de referencia. En un modo de realización, el paciente es un ser humano. En un modo de realización, el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF). En un modo de realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión. En un modo de realización, la muestra biológica es tejido intestinal. En un modo de realización, los procedimientos comprenden medir el número de células con expresión mediante un procedimiento inmunohistoquímico. En un modo de realización, la medición comprende poner en contacto la muestra con un agente que se une específicamente a la proteína integrina beta7, a la proteína integrina alfaE o a la proteína CD3 épsilon y detectar la cantidad de complejo formada y, de este modo, medir el número de células con expresión. En un modo de realización, el número de células con expresión en la muestra se divide entre el número total de células en la muestra. En un modo de realización, se determina el número de células con expresión en un campo de gran aumento en un microscopio óptico. En un modo de realización, el nivel de referencia es un valor de mediana.

45 Aún todavía un otro aspecto, se proporcionan procedimientos para tratar a un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende: (a) medir el número de células que expresan al menos una proteína en una muestra biológica del paciente, en la que la al menos una proteína se selecciona de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon; (b) comparar el número de células con expresión medidas en (a) con un nivel de referencia; (c) identificar que es más probable que el paciente responda a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7 cuando el número de células con expresión medidas en (a) está por encima del nivel de referencia; y (d) administrar el tratamiento cuando el número de células con expresión medido en (a) está por encima del nivel de referencia, tratando de este modo el trastorno inflamatorio gastrointestinal. En un modo de realización, se administran 100 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea una vez cada cuatro semanas. En un modo de realización, se administra una dosis de ataque fija de 420 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea, seguida dos semanas después de la administración de la dosis de ataque de una segunda administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida dos semanas después de la segunda administración de una tercera administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida cuatro semanas después de la tercera administración de la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 y, después de esto, la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 una vez cada cuatro semanas. En un modo de realización, el paciente es un ser humano. En un modo de realización, el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF). En un modo de realización, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En un modo de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión. En un modo de realización, la administración del antagonista de integrina beta7 da como resultado uno o más de los siguientes: (1) una

disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de ≥ 1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1, (2) una subpuntuación endoscópica de 0 o 1, (3) MCS ≤ 2 sin subpuntuación individual >1 . En un modo de realización, la muestra biológica es tejido intestinal. En un modo de realización, los procedimientos comprenden medir el número de células con expresión mediante un procedimiento inmunohistoquímico. En un modo de realización, la medición comprende poner en contacto la muestra con un agente que se une específicamente a la proteína integrina beta7, a la proteína integrina alfaE o a la proteína CD3 épsilon y detectar la cantidad de complejo formada y, de este modo, medir el número de células con expresión. En un modo de realización, el número de células con expresión en la muestra se divide entre el número total de células en la muestra. En un modo de realización, se determina el número de células con expresión en un campo de gran aumento en un microscopio óptico. En un modo de realización, el nivel de referencia es un valor de mediana.

Aún todavía en otro aspecto, se proporciona un antagonista de integrina beta7 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno inflamatorio gastrointestinal. En determinados modos de realización, el paciente se trata o se selecciona para tratamiento cuando el nivel de expresión del ARNm de al menos un gen seleccionado de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon está por encima de un nivel de referencia. En determinados modos de realización, el paciente se trata o se selecciona para tratamiento cuando el número de células que expresan al menos una proteína seleccionada de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon está elevado o es alto en comparación con un nivel de referencia. En un modo de realización, el nivel de referencia es un valor de mediana. En un modo de realización, el antagonista de integrina beta7 es para su uso en el tratamiento del paciente en el que se administran 100 mg por ruta subcutánea una vez cada cuatro semanas. En un modo de realización, el antagonista de integrina beta7 es para su uso en el tratamiento del paciente en el que se administra una dosis de carga fija de 420 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea, seguida dos semanas después de la administración de la dosis de ataque de una segunda administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida dos semanas después de la segunda administración de una tercera administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida cuatro semanas después de la tercera administración de la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 y, después de esto, administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 una vez cada cuatro semanas.

En otro aspecto, se proporciona el uso *in vitro* de al menos un agente que se une específicamente a un biomarcador seleccionado de ARNm de integrina beta7, ARNm de la integrina alfaE, ARNm de CD3 épsilon, proteína integrina beta7, proteína integrina alfaE y proteína CD3 épsilon. En determinados modos de realización, el al menos un agente se usa para identificar o seleccionar a un paciente que tenga un trastorno inflamatorio gastrointestinal que probablemente responda a un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7, en el que un nivel de expresión del ARNm de la integrina beta7, integrina alfaE y/o CD3 épsilon o un número de células que expresan integrina beta7, integrina alfaE y/o CD3 épsilon por encima de un nivel de referencia identifica o selecciona que el paciente tiene más probabilidades de responder al tratamiento. En un modo de realización, el nivel de referencia es un valor de mediana.

Todavía en otro aspecto, se proporcionan procedimientos para tratar un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un paciente. En determinados modos de realización, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de integrina beta7 a un paciente cuando se ha determinado que una muestra biológica obtenida del paciente expresa niveles de expresión elevados del ARNm de uno o más de determinados genes. En un modo de realización, se ha determinado que la muestra expresa un ARNm de la integrina beta7 elevado en comparación con el valor de mediana. En un modo de realización, se ha determinado que la muestra expresa un ARNm de la integrina alfaE elevado en comparación con el valor de mediana. En un modo de realización, se ha determinado que la muestra expresa un ARNm de CD3 épsilon elevado en comparación con el valor de mediana. En un modo de realización, se ha determinado que la muestra expresa niveles elevados del ARNm de dos o tres de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon en comparación con la mediana de los niveles de los mismos ARNm. En determinados modos de realización, el paciente se ha seleccionado para el tratamiento en base a unos niveles de expresión elevados del ARNm de determinados genes en la muestra biológica en comparación con un valor de mediana del mismo gen o genes. En un modo de realización, el paciente se ha seleccionado para el tratamiento en base a la expresión elevada del ARNm de la integrina beta7 en comparación con el valor de mediana. En un modo de realización, el paciente se ha seleccionado para el tratamiento en base a la expresión elevada del ARNm de la integrina alfaE en comparación con el valor de mediana. En un modo de realización, el paciente se ha seleccionado para el tratamiento en base a la expresión elevada del ARNm de CD3 épsilon en comparación con el valor de mediana. En un modo de realización, el paciente se ha seleccionado para el tratamiento en base a la expresión elevada del ARNm de dos o tres de integrina beta7, integrina alfaE y CD3 épsilon en comparación con los valores de mediana para los mismos ARNm. En un modo de realización, la muestra biológica es una muestra de biopsia tisular. En un modo de realización, la muestra biológica es sangre completa periférica. En un modo de realización, la sangre completa periférica se recoge en un tubo PAXgene. En determinados modos de realización, el nivel de expresión de ARNm se mide mediante un procedimiento de PCR. En un modo de realización, el procedimiento de PCR es qPCR. En determinados modos de realización, la administración del antagonista de integrina beta7 da como resultado uno o más de los siguientes: (1) una disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de >1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1, (2) una subpuntuación endoscópica de 0 o 1, (3) MCS <2 sin subpuntuación

- individual >1. En un modo de realización, se administran 100 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea una vez cada cuatro semanas. En un modo de realización, se administra una dosis de ataque fija de 420 mg de antagonista de integrina beta7 por ruta subcutánea, seguida dos semanas después de la administración de la dosis de ataque de una segunda administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida dos semanas después de la segunda administración de una tercera administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7, seguida cuatro semanas después de la tercera administración de la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 y, después de esto, la administración subcutánea de 300 mg de antagonista de integrina beta7 una vez cada cuatro semanas.
- En determinados modos de realización anteriores, el trastorno inflamatorio gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal, y en determinados de dichos modos de realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa (CU) o enfermedad de Crohn (EC), y en determinados de dichos modos de realización, el antagonista de integrina beta7 es un anticuerpo monoclonal anti-beta7. En determinados de dichos modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 se selecciona de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 es un fragmento de anticuerpo. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 comprende seis regiones hipervariables (HVR), en las que:
- (i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos A1-A11, en la que A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1); RASESVDLLH (SEQ ID NO: 7), RASESVDTLH (SEQ ID NO: 8) o RASESVDLLH (SEQ ID NO: 9) o una variante de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 o 9 (SEQ ID NO: 26) en la que el aminoácido A2 se selecciona del grupo que consiste en A, G, S, T y V y/o el aminoácido A3 se selecciona del grupo que consiste en S, G, I, K, N, P, Q, R y T, y/o A4 se selecciona del grupo que consiste en E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N y R, y/o el aminoácido A5 se selecciona del grupo que consiste en S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T y V, y/o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste en V, R, I, A, G, K, L, M y Q, y/o el aminoácido A7 se selecciona del grupo que consiste en D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S y T, y/o el aminoácido A8 se selecciona del grupo que consiste en D, G, N, E, T, P y S, y/o el aminoácido A9 se selecciona del grupo que consiste en L, Y, I y M, y/o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste en L, A, I, M y V y/o el aminoácido A11 se selecciona del grupo que consiste en H, Y, F y S;
- (ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos B1-B8, en la que B1-B8 es KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), RYASQSIG (SEQ ID NO: 20) o X_{aa}YASOSIS (SEQ ID NO: 21, donde X_{aa} representa cualquier aminoácido) o una variante de las SEQ ID NO: 2, 20 o 21 (SEQ ID NO: 27) en la que el aminoácido B1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y y X_{aa} (donde X_{aa} representa cualquier aminoácido), y/o el aminoácido B4 se selecciona del grupo que consiste en S y D, y/o el aminoácido B5 se selecciona del grupo que consiste en Q y S y/o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste en S, D, L y R, y/o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste en I, V, E y K;
- (iii) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos C1-C9, en la que C1-C9 es QQGNSLPNT (SEQ ID NO: 3) o una variante de la SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 28) en la que el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste en N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L y M;
- (iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos D1-D10 en la que D1-D10 es GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4);
- (v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos E1-E17 en la que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) o una variante de la SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO: 29) en la que el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste en Y, F, V y D, y/o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste en S y G, y/o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste en S e Y, y/o el aminoácido E12 se selecciona del grupo que consiste en N, T, A y D, y/o el aminoácido 13 se selecciona del grupo que consiste en P, H, D y A, y/o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste en L y V, y/o el aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste en S y G; y
- (vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos F2-F11 en la que F2-F11 es MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 19); o comprende la secuencia de aminoácidos F1-F11, en la que F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 16), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 17) o AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 18), o una variante de las SEQ ID NO: 6, 16, 17, 18 o 19 (SEQ ID NO: 30) en la que el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S y/o el aminoácido F11 se selecciona del grupo que consiste en F e Y. En determinados de dichos modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 comprende tres secuencias de la región hipervariable de cadena pesada (HVR-H1-H3) y tres secuencias de la región hipervariable de cadena ligera (HVR-L1-L3), en las que:
- (i) HVR-L1 comprende la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9;
- (ii) HVR-L2 comprende la SEQ ID NO: 2;
- (iii) HVR-L3 comprende la SEQ ID NO: 3;

- (iv) HVR-H1 comprende la SEQ ID NO: 4;
- (v) HVR-H2 comprende la SEQ ID NO: 5; y
- 5 (vi) HVR-H3 comprende la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.

En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 (la SEQ ID NO: 31 corresponde a la SEQ ID NO: 25, excepto por la secuencia de aminoácidos de HVR-H3 de SEQ ID NO: 25 (MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6) o AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 16)) que está sustituida con RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 19) o ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 17), respectivamente). En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-beta7 es rhuMAb Beta7, también denominado etrolizumab.

En otro aspecto, el antagonista de integrina beta7 es un anticuerpo monoclonal anti-alfa4/beta7. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-alfa4/beta7 es vedolizumab. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-alfa4/beta7 es AMG 181.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A y 1B muestra la alineación de secuencias de las cadenas ligeras y pesadas variables para las siguientes secuencias consenso y secuencias de anticuerpos antisubunidad beta7: secuencia consenso del subgrupo kappa I humano de cadena ligera (FIG. 1A, SEQ ID NO: 12), secuencia consenso del subgrupo III humano de cadena pesada (FIG. 1B, SEQ ID NO: 13), cadena ligera variable del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (FIG. 1A, SEQ ID NO: 10), cadena pesada variable del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (FIG. 1B, SEQ ID NO: 11) y variantes de anticuerpos humanizados: cadena ligera variable de injerto de hu504K humanizado (FIG. 1A, SEQ ID NO: 14), cadena pesada variable de injerto de hu504K humanizado (FIG. 1B, SEQ ID NO: 15), variantes hu504-5, hu504-16 y hu504-32 (las variaciones de aminoácidos del injerto de hu504K humanizado se indican en la FIG. 1A (cadena ligera) (SEQ ID NO: 22-24, respectivamente, en orden de aparición) y la FIG. 1B (cadena pesada) para las variantes hu504-5, hu504-16 y hu504-32 (SEQ ID NO: 25).

La figura 2 muestra el esquema de estudio para el estudio clínico de fase II como se describe en el ejemplo 1.

La figura 3 muestra el porcentaje de pacientes tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) en remisión en la semana 10 (A), que muestran cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que muestran una respuesta clínica en la semana 10 (C), estratificados por los niveles de expresión génica de beta7 de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en biopsias intestinales como se describe en el ejemplo 2.

La figura 4 muestra el porcentaje de pacientes tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) en remisión en la semana 10 (A), que muestran cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que muestran una respuesta clínica en la semana 10 (C), estratificados por los niveles de expresión génica de CD3 épsilon de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en biopsias intestinales como se describe en el ejemplo 2.

La figura 5 muestra la correlación de los niveles de expresión de beta7 detectados por análisis FACS en células CD45+, células CD3+ y células CD19+ con el nivel de expresión génica de beta7 en sangre periférica, detectado por qPCR tanto en pacientes con EII (puntos vacíos) como en controles sanos (puntos rellenos) como se describe en el ejemplo 2.

La figura 6 muestra el porcentaje de pacientes tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) en remisión en la semana 10 (A), que muestran cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que muestran una respuesta clínica en la semana 10 (C), estratificados por los niveles de expresión génica de beta7 de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en sangre periférica como se describe en el ejemplo 2.

La figura 7 muestra la expresión de integrina alfaE en biopsias intestinales, determinada por inmunohistoquímica o por qPCR como se describe en el ejemplo 2. (A) inmunohistoquímica de alfaE en tejido de colon (paneles de la izquierda) o íleon (paneles de la derecha) obtenido de pacientes sin EII (paneles superiores), pacientes con enfermedad de Crohn (paneles centrales) o un paciente con CU (panel inferior); en cada caso, las regiones de tinción positiva son las más oscuras; (B) recuentos automáticos informatizados de células alfaE+ como porcentaje de las células totales en el tejido del colon, el íleon o el yeyuno, según se indica, de pacientes sin EII, pacientes con CU y pacientes con EC, (C) expresión génica de alfaE relativa a GAPDH en biopsias de espesor total del colon de

pacientes sin EII, con CU y de colon, ileon o yeyuno de pacientes con enfermedad de Crohn, según se indica, sometidos a resecciones intestinales; (D) recuentos automáticos informatizados de células alfaE+ como porcentaje de las células totales en tejido de biopsia obtenido de pacientes incluidos en el ensayo de etrolizumab de fase II en la selección e identificados como no tratados previamente con TNF (lado izquierdo del gráfico) o RI-TNF (lado derecho del gráfico), puntos punteados: pacientes en remisión con etrolizumab, puntos vacíos: pacientes sin remisión con etrolizumab, puntos negros: placebo, la línea punteada indica la mediana; (E) tinción con alfaE ejemplar en las biopsias de la selección de pacientes incluidos en el ensayo de etrolizumab de fase II, panel de la izquierda: paciente con alfaE alta, panel de la derecha: paciente con alfaE baja; en cada caso, las regiones con tinción positiva son las más oscuras; (F) expresión génica de alfaE relativa a la expresión de GAPDH en tejido de biopsia obtenido de pacientes incluidos en el ensayo de etrolizumab de fase II en la selección e identificados como no tratados previamente con TNF (lado izquierdo del gráfico) o RI-TNF (lado derecho del gráfico), puntos punteados: pacientes en remisión con etrolizumab, puntos vacíos: pacientes sin remisión con etrolizumab, puntos negros: placebo, la línea de puntos indica la mediana; (G) gráfico que muestra la relación entre la expresión génica de alfaE medida por qPCR (eje vertical) con la expresión de la proteína alfaE medida por IHQ (eje horizontal); puntos punteados: pacientes en remisión con etrolizumab, puntos vacíos: pacientes sin remisión con etrolizumab, la línea de puntos indica la mediana.

La figura 8 muestra la proporción de pacientes (porcentaje) estratificados por los niveles de expresión génica de alfaE de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en biopsias intestinales y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (A), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (C); o estratificados por la expresión de la proteína alfaE de referencia (baja, por debajo de la mediana frente a alta, por encima de la mediana) en biopsias intestinales y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (D), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (E) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (F), como se describe en el ejemplo 2.

La figura 9 muestra la proporción de pacientes sin tratamiento previo con TNF (porcentaje) estratificados por los niveles de expresión génica de alfaE de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en biopsias intestinales y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (A), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (C); o estratificados por la expresión de la proteína alfaE de referencia (baja, por debajo de la mediana frente a alta, por encima de la mediana) en biopsias intestinales y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (D), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (E) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (F), como se describe en el ejemplo 2.

La figura 10 muestra la proporción de pacientes (porcentaje) estratificados por los niveles de expresión génica de alfaE de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en sangre periférica en la selección y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (A), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (C); o estratificados por la expresión génica de alfaE (baja, por debajo de la mediana frente a alta, por encima de la mediana) en sangre periférica el día 1 y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (D), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (E) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (F), como se describe en el ejemplo 2.

La figura 11 muestra la proporción de pacientes sin tratamiento previo con TNF (porcentaje) estratificados por los niveles de expresión génica de alfaE de referencia (bajo, por debajo de la mediana frente a alto, por encima de la mediana) en sangre periférica en la selección y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (A), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (B) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (C); o estratificados por la expresión génica de alfaE (baja, por debajo de la mediana frente a alta, por encima de la mediana) en sangre periférica el día 1 y tratados con placebo (barras punteadas), 100 mg/dosis de etrolizumab (barras rayadas) o 300 mg/dosis de etrolizumab (barras vacías) que estaban en remisión en la semana 10 (D), que mostraban cicatrización de la mucosa en la semana 10 (E) o que mostraban respuesta clínica en la semana 10 (F), como se describe en el ejemplo 2.

La figura 12 muestra el esquema de estudio para el estudio clínico de extensión de fase II abierto como se describe en el ejemplo 1.

La figura 13 muestra el porcentaje de pacientes con RI-TNF del estudio de prolongación abierto estratificados por la expresión génica de alfaE de referencia (baja, por debajo de la mediana frente a alta, por encima de la mediana) en

5 biopsias intestinales que estaban en remisión clínica (A) o que mostraban respuesta clínica (B); o estratificados por la expresión de la proteína alfaE de referencia (baja, por debajo de la mediana frente a alta, por encima de la mediana) en biopsias intestinales que estaban en remisión clínica (C) o que mostraban respuesta clínica (D); o estratificados por la expresión génica de alfaE en sangre periférica que estaban en remisión clínica (E) o que mostraban respuesta clínica (F).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2.^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4.^a ed., John Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1992), proporcionan al experto en la técnica directrices generales para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

15 DETERMINADAS DEFINICIONES

20 Para propósitos de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando corresponda, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En caso de que alguna definición establecida a continuación entre en conflicto con algún documento mencionado en el presente documento, prevalecerá la definición establecida a continuación.

25 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye una pluralidad de proteínas; la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, y similares.

30 Los intervalos proporcionados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas incluyen los dos valores extremos y todos los puntos entre los valores extremos. Por tanto, por ejemplo, un intervalo de 2,0 a 3,0 incluye 2,0, 3,0 y todos los puntos entre 2,0 y 3,0.

35 "Tratamiento", "tratar" y variaciones gramaticales de los mismos se refieren a una intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo o célula que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado.

40 "Pauta de tratamiento" se refiere a una combinación de dosificación, frecuencia de administración o duración del tratamiento, con o sin la adición de un segundo medicamento.

"Pauta de tratamiento eficaz" se refiere a una pauta de tratamiento que ofrecerá una respuesta beneficiosa a un paciente que está recibiendo el tratamiento.

45 La "respuesta del paciente" o la "reactividad del paciente" se pueden evaluar usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el paciente, incluyendo, sin limitación, (1) la inhibición, hasta cierto punto, de la progresión de la enfermedad, incluyendo la ralentización y la detención completa; (2) la reducción del número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; (3) la reducción del tamaño de la lesión; (4) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células de la enfermedad en órganos y/o tejidos periféricos contiguos; (5) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la propagación de la enfermedad; (6) la disminución de la respuesta autoinmunitaria, que puede dar como resultado, pero no tiene por qué hacerlo, la regresión o destrucción de la lesión de la enfermedad; (7) el alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; (8) el incremento en la duración de la presentación sin enfermedad después del tratamiento; y/o (9) la disminución de la mortalidad en un momento dado después del tratamiento. El término 50 "reactividad" se refiere a una respuesta mensurable, incluyendo respuesta completa (RC) y respuesta parcial (RP).

60 Como se usa en el presente documento, "respuesta completa" o "RC" significa la desaparición de todos los signos de inflamación o la remisión en respuesta al tratamiento. Esto no significa necesariamente que la enfermedad se haya curado.

"Respuesta parcial" o "RP" se refiere a una disminución de al menos un 50 % en la gravedad de la inflamación, en respuesta al tratamiento.

65 Una "respuesta beneficiosa" de un paciente al tratamiento con un antagonista de integrina beta7 y una redacción similar se refiere al beneficio clínico o terapéutico conferido a un paciente con riesgo de padecer un trastorno inflamatorio gastrointestinal por el o como resultado del tratamiento con el antagonista, tal como un anticuerpo

antiintegrina beta7. Dicho beneficio incluye respuestas celulares o biológicas, una respuesta completa, una respuesta parcial, una enfermedad estable (sin progresión o recidiva), o una respuesta con una recidiva posterior del paciente por el o como resultado del tratamiento con el antagonista.

5 Como se usa en el presente documento, "sin respuesta" o "falta de respuesta" o redacción similar significa una ausencia de una respuesta completa, una respuesta parcial o una respuesta beneficiosa al tratamiento con un antagonista de integrina beta7.

10 "Un paciente mantiene la reactividad a un tratamiento" cuando la reactividad del paciente no disminuye con el tiempo durante el transcurso de un tratamiento.

El término "muestra", o "muestra problema", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se va a caracterizar y/o identificar, por ejemplo, en base a características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas.

15 En un modo de realización, la definición engloba muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico y muestras de tejido tal como una pieza de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido como de una muestra o biopsia o aspirado de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; líquidos corporales; y células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto o plasma. El término "muestra", o "muestra problema", incluye

20 muestras biológicas que se han manipulado de alguna manera después de su obtención, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o inclusión en una matriz semisólida o sólida para propósitos de seccionamiento. Para los propósitos del presente documento, una "sección" de una muestra de tejido se refiere a una parte o pieza única de una muestra de tejido, por ejemplo, un corte delgado de tejido o células cortadas de una muestra de tejido. Las

25 muestras incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, células derivadas de la sangre, suero, plasma, líquido linfático, líquido sinovial, extractos celulares y combinaciones de los mismos. En un modo de realización, la muestra es una muestra clínica. En otro modo de realización, la muestra se usa en un ensayo de diagnóstico.

Una "muestra de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra, estándar o nivel que se usa para propósitos de comparación. En un modo de realización, una muestra de referencia se obtiene de una parte sana y/o no enferma del cuerpo (por ejemplo, tejido o células) del mismo sujeto o paciente. En otro modo de realización, una muestra de referencia se obtiene de un tejido y/o célula no tratados del mismo sujeto o paciente. Aún en otro modo de realización, una muestra de referencia se obtiene de una parte sana y/o no enferma del cuerpo (por ejemplo, tejidos o células) de un individuo que no es el sujeto o el paciente. Incluso en otro modo de

30 realización, una muestra de referencia se obtiene de una parte de tejido y/o célula no tratada del cuerpo de un individuo que no es el sujeto o el paciente.

Un "antagonista de integrina beta7" o "antagonista de beta7" se refiere a cualquier molécula que inhibe una o más actividades biológicas o bloquea la unión de la integrina beta7 con una o más de sus moléculas asociadas. Se pueden usar antagonistas de la divulgación para modular uno o más aspectos de los efectos asociados con beta7, que incluyen, pero no se limitan a, la asociación con la subunidad de integrina alfa4, la asociación con la subunidad de integrina alfaE, la unión de la integrina alfa4beta7 a MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina y la unión de la integrina alfaEbeta7 a E-cadherina. Estos efectos se pueden modular por cualquier mecanismo biológicamente pertinente, incluyendo la disociación de la unión del ligando a la subunidad beta7 o a la integrina dimérica alfa4beta7 o alfaEbeta7, y/o mediante la disociación de la asociación entre las subunidades de integrina alfa y beta, de modo que se inhiba la formación de la integrina dimérica. En la invención, el antagonista de beta7 es un anticuerpo antiintegrina beta7 (o anticuerpo anti-beta7). En un modo de realización, el anticuerpo antiintegrina beta7 es un anticuerpo humanizado antiintegrina beta7 y más en particular un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante anti-beta7 (o rhuMAb beta7). En algunos modos de realización, los anticuerpos anti-beta7 son anticuerpos

40 antagonistas antiintegrina beta7 que inhiben o bloquean la unión de la subunidad beta7 con la subunidad de integrina alfa4, la asociación con la subunidad de integrina alfaE, la unión de la integrina alfa4beta7 a MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina y la unión de la integrina alfaEbeta7 a la E-cadherina.

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

55

Por "subunidad alfaE" o "subunidad de integrina alfaE" o "subunidad α E" o "subunidad de integrina α E" o "CD103" se entiende una subunidad de integrina que se encuentra asociada con la integrina beta7 en linfocitos intraepiteliales, mediando dicha integrina alfaEbeta7 la unión de los LiE al epitelio intestinal que expresa E-cadherina

60

(Cepek, K. L. *et al.* (1993) *J. Immunol.* 150:3459; Shaw, S. K. y Brenner, M. B. (1995) *Semin. Immunol.* 7:335).

"MAdCAM" o "MAdCAM-1" se usan de manera intercambiable en el contexto de la presente invención y se refieren a la proteína de la molécula de adhesión celular adhesina de la mucosa-1, que es un polipéptido monocatenario que comprende una cola citoplásmica corta, una región transmembranaria y una secuencia extracelular compuesta por tres dominios de tipo inmunoglobulina. Se han clonado los ADNc para MAdCAM-1 murina, humana y de macaco (Briskin, *et al.*, (1993) *Nature*, 363:461-464; Shyjan *et al.*, (1996) *J. Immunol.* 156:2851-2857).

"VCAM-1" o "molécula de adhesión a células vasculares-1" o "CD106" se refiere a un ligando de alfa4beta7 y alfa4beta1, expresado en el endotelio activado e importante en las interacciones entre el endotelio y los leucocitos, tal como la unión y la trans migración de los leucocitos durante la inflamación.

"CD45" se refiere a una proteína de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Las PTP son conocidas por ser moléculas de señalización que regulan una variedad de procesos celulares que incluyen el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica. Esta PTP contiene un dominio extracelular, un solo segmento transmembranario y dos dominios catalíticos intracitoplásmicos en tándem y, por tanto, pertenece a PTP de tipo receptor. Este gen se expresa específicamente en células hematopoyéticas. Se ha demostrado que esta PTP es un regulador esencial de la señalización de los receptores de antígenos de linfocitos T y B. Funciona a través de la interacción directa con los componentes de los complejos de receptores de antígeno, o activando diversas cinasas de la familia Src necesarias para la señalización de receptores de antígenos. Esta PTP también inhibe las cinasas JAK y, por tanto, funciona como un regulador de la señalización de receptores de citocinas. Se ha informado de cuatro variantes de transcritos con ajuste alternativo de este gen, que codifican isoformas distintas. (Tchilian EZ, Beverley PC (2002). "CD45 in memory and disease." *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 50 (2):85-93. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, *et al.* (2004). "Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation." *Leuk. Lymphoma* 44 (9):1477-81).

Existen diversas isoformas de CD45: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R (ABC). CD45 también está altamente glucosilada. CD45R es la proteína más larga y migra a 200 kDa cuando se aísla de los linfocitos T. Los linfocitos B también expresan CD45R con mayor glucosilación, lo que aumenta el peso molecular hasta 220 kDa, de ahí el nombre B220; isoforma de linfocitos B de 220 kDa. La expresión de B220 no está restringida a los linfocitos B y también se puede expresar en linfocitos T activados, en un subconjunto de células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos. Stanton T, Boxall S, Bennett A, *et al.* (2004). "CD45 variant alleles: possibly increased frequency of a novel exon 4 CD45 polymorphism in HIV seropositive Ugandans." *Immunogenetics* 56 (2):107-10.

Los "linfocitos de migración dirigida al intestino" se refieren a un subgrupo de linfocitos que tienen la característica de migrar selectivamente de forma dirigida a los ganglios linfáticos y los tejidos intestinales, pero no a los ganglios linfáticos y los tejidos periféricos. Este subgrupo de linfocitos se caracteriza por un patrón de expresión único de una combinación de múltiples moléculas de superficie celular, incluyendo, pero sin limitarse a, la combinación de CD4, CD45RA y Beta7. Típicamente, se pueden subdividir al menos dos subconjuntos de linfocitos CD4⁺ de sangre periférica en base a los marcadores de CD45RA y Beta7, linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} y CD45RA⁻ β7^{bajo}. Los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} migran de forma dirigida preferentemente a los ganglios linfáticos y tejidos intestinales, mientras que los linfocitos CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{bajo} migran de forma dirigida preferentemente a los ganglios linfáticos y tejidos periféricos (Rott *et al.* 1996; Rott *et al.* 1997; Williams *et al.* 1998; Rose *et al.* 1998; Williams y Butcher 1997; Butcher *et al.* 1999). Los linfocitos intestinales son, por lo tanto, un subgrupo distintivo de linfocitos identificados como CD4⁺ CD45RA⁻ β7^{alto} en un ensayo de citometría de flujo. Los procedimientos para identificar este grupo de linfocitos son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento con respecto a un marcador de superficie celular, el símbolo "+" indica una expresión positiva de un marcador de superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos CD4⁺ son un grupo de linfocitos que tienen CD4 expresada en su superficie celular.

Como se usa en el presente documento con respecto a un marcador de superficie celular, el símbolo "-" indica una expresión negativa de un marcador de superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos CD45RA⁻ son un grupo de linfocitos que no tienen CD45RA expresada en su superficie celular.

Los trastornos inflamatorios gastrointestinales son un grupo de trastornos crónicos que causan inflamación y/o ulceración en la membrana mucosa. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), mucositis (por ejemplo, mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrosante y esofagitis.

La "enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII" se usa de manera intercambiable en el presente documento para referirse a enfermedades del intestino que causan inflamación y/o ulceración e incluyen, sin limitación, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

"Enfermedad de Crohn (EC)" y "colitis ulcerosa (CU)" son enfermedades inflamatorias intestinales crónicas de

etiología desconocida. La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa, puede afectar a cualquier parte del intestino. El rasgo característico más destacado de la enfermedad de Crohn es el engrosamiento edematoso granular de color púrpura rojizo de la pared intestinal. Con el desarrollo de la inflamación, estos granulomas a menudo pierden sus bordes circunscritos y se integran con el tejido circundante. La diarrea y la obstrucción del intestino son los signos clínicos predominantes. Al igual que con la colitis ulcerosa, la evolución de la enfermedad de Crohn puede ser continua o recidivante, leve o grave, pero a diferencia de la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn no se puede curar mediante resección del segmento afectado del intestino. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Crohn requieren cirugía en algún momento, pero la recidiva posterior es frecuente y el tratamiento médico continuo es habitual.

La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo desde la boca hasta el ano, aunque típicamente aparece en las regiones ileocólica, del intestino delgado o anorrectal colónica. Histopatológicamente, la enfermedad se manifiesta por granulomas discontinuos, abscesos crípticos, fisuras y aftas. El infiltrado inflamatorio es mixto, consistiendo en linfocitos (linfocitos tanto T como B), células plasmáticas, macrófagos y neutrófilos. Hay un incremento desproporcionado en las células plasmáticas, macrófagos y neutrófilos que secretan IgM e IgG.

Los fármacos antiinflamatorios sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) se usan para tratar la enfermedad de Crohn de colon levemente activa y se prescriben comúnmente en un intento por mantener la remisión de la enfermedad. El metroidazol y el ciprofloxacino son de eficacia similar a la sulfasalazina y se prescriben en particular para tratar la enfermedad perianal. En casos más graves, se prescriben corticoesteroides para tratar las exacerbaciones activas y algunas veces pueden mantener la remisión. La azatioprina y la 6-mercaptopurina también se han usado en pacientes que requieren administración crónica de corticoesteroides. Se ha sugerido que estos fármacos pueden desempeñar una función en la profilaxis a largo plazo. Desafortunadamente, puede haber un retardo muy prolongado (hasta seis meses) antes del inicio de la acción en algunos pacientes. Los fármacos antidiarreicos también pueden proporcionar alivio sintomático en algunos pacientes. El tratamiento alimenticio o la dieta elemental pueden mejorar el estado de nutrición de los pacientes e inducir una mejoría sintomática de la enfermedad aguda, pero no induce remisiones clínicas mantenidas. Los antibióticos se usan en el tratamiento de la hiperproliferación bacteriana secundaria en el intestino delgado y en el tratamiento de complicaciones piógenas.

La "colitis ulcerosa (CU)" afecta al intestino grueso. La evolución de la enfermedad puede ser continua o recidivante, leve o grave. La primera lesión es una infiltración inflamatoria con formación de abscesos en la base de las criptas de Lieberkühn. La coalescencia de estas criptas distendidas y rotas tiende a separar la mucosa suprayacente de su suministro de sangre, lo que da lugar a ulceración. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos, dolor en la región abdominal inferior, hemorragia rectal y evacuaciones diarreicas frecuentes que consisten principalmente en sangre, pus y moco con escasas partículas fecales. Es posible que se requiera una colectomía total para la colitis ulcerosa aguda, grave o crónica, que no remite.

Los signos clínicos de la CU son altamente variables, y el inicio puede ser gradual o abrupto, y puede incluir diarrea, tenesmo y hemorragia rectal recurrente. Con la afectación fulminante de todo el colon, se puede producir megacolon tóxico, una urgencia potencialmente mortal. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, piodermia gangrenosa, uveítis y eritema nudoso.

El tratamiento para la CU incluye sulfasalazina y fármacos relacionados que contienen salicilato para casos leves y fármacos corticoesteroides en casos graves. La administración tópica de salicilatos o corticoesteroides a veces es eficaz, en particular cuando la enfermedad se limita al intestino distal, y se asocia con una disminución de los efectos secundarios en comparación con el uso sistémico. Algunas veces están indicadas medidas de apoyo, tales como la administración de hierro y agentes antidiarreicos. La azatioprina, la 6-mercaptopurina y el metotrexato a veces también se prescriben para su uso en casos dependientes de corticoesteroides resistentes al tratamiento.

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

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier sujeto individual para el que se desea tratamiento. En determinados modos de realización, el paciente es un ser humano.

Un "sujeto" en el presente documento es típicamente un ser humano. En determinados modos de realización, un sujeto es un mamífero no humano. Los mamíferos no humanos ejemplares incluyen animales de laboratorio, domésticos, de mascota, deportivos y de ganado, por ejemplo, ratones, gatos, perros, caballos y vacas. Típicamente, el sujeto es idóneo para tratamiento, por ejemplo, tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de manera intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados

fragmentos de anticuerpo (como se describe con más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con afinidad madurada.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una parte de un anticuerpo intacto, en los que la parte retiene preferentemente al menos una, y típicamente la mayor parte o la totalidad de las funciones asociadas normalmente con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En un modo de realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otro modo de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión al complemento. En un modo de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un antígeno único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante único en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno

natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos terapéuticos o de diagnóstico del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En determinados modos de realización, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante el procedimiento de Lowry, y a menudo más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso de un secuenciador de cubilete giratorio o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Se usa una serie de delimitaciones de región hipervariable y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables del AbM representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas de los complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

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

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

Los residuos "marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, como se definen en el presente documento.

Una "región marco de consenso humana" es una región marco que representa el residuo de aminoácido que se produce lo más comúnmente en una selección de secuencias de la región marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En un modo de realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En un modo de realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*

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

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (en general, uno asociado con un anticuerpo de la divulgación y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador) de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores.

"Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A

- menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen, en general, al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen, en general, al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Son conocidos en la técnica una variedad de procedimientos de medición de la afinidad de unión.
- El término "variable", respecto a anticuerpos o inmunoglobulinas, se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectados mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab)_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía puede reticular el antígeno.
- "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Conjuntamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) puede reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.
- El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab)_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.
- Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA_1 e IgA_2 . Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.
- Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.
- Un "anticuerpo no marcado" para los fines del presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un

resto citotóxico o radiomarcador.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define normalmente extendiéndose desde un residuo aminoacídico en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta extremo carboxílico de la misma. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o genomanipulando de forma recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

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

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B, BCR), etc. Dichas funciones efectoras requieren, en general, que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diversos ensayos como se divulga en el presente documento, por ejemplo.

Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y distinto de A), una región Fc de IgG2 humana de secuencia natural, una región Fc de IgG3 humana de secuencia natural y una región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes naturales de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación aminoacídica. En determinados modos de realización, la región Fc variante tiene al menos una sustitución aminoacídica en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una hasta aproximadamente diez sustituciones aminoacídicas y, en determinados modos de realización, de aproximadamente una hasta aproximadamente cinco sustituciones aminoacídicas en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. En determinados modos de realización, la región Fc variante en el presente documento poseerá una homología de al menos aproximadamente un 80 % con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original, o una homología de al menos aproximadamente un 90 % con la misma, o una homología de al menos aproximadamente un 95 % con la misma.

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

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción celular en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan los receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS (EE. UU.)* 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinados modos de realización, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe

en el presente documento.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En determinados modos de realización, el FcR es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la recapitulación en M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se recapitulan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se describen anticuerpos con una unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn) y semividas incrementadas en los documentos WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434 (numeración EU de los residuos). En determinados modos de realización, la variante de anticuerpo que comprende la región Fc con unión mejorada al FcRn comprende sustituciones aminoacídicas en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc de la misma (numeración EU de los residuos).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En determinados modos de realización, el polipéptido de Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una recapitulación de los scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994). Se describen fragmentos scFv del anticuerpo HER2 en el documento WO93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894; y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

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

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácidos" en el presente documento es un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una especie principal del anticuerpo. En determinados modos de realización, las variantes de secuencias de aminoácidos tendrán una homología de al menos aproximadamente un 70 % con la especie principal del anticuerpo, o tendrán una homología de al menos aproximadamente un 80 %, o una homología de al menos aproximadamente un 90 % con la especie principal del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos presentan sustituciones, deleciones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la especie principal del anticuerpo o colindantes a la misma. Los ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, variante de anticuerpo desaminado), una variante básica, un anticuerpo con una extensión líder aminoterminal (por ejemplo, VHS) en una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo con un resto lisina C-terminal de una o dos cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye combinaciones de variaciones de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y/o ligeras. La variante de anticuerpo de particular interés en el presente documento es el anticuerpo que contiene una extensión líder aminoterminal en una o dos cadenas del mismo, que comprende opcionalmente además otra secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glucosilación con respecto a la especie principal del

anticuerpo.

Un anticuerpo "variante de glucosilación" en el presente documento es un anticuerpo que tiene uno o más restos glucídicos unidos al mismo que difieren en uno o más restos glucídicos unidos a la especie principal del anticuerpo. Los ejemplos de variantes de glucosilación en el presente documento incluyen un anticuerpo con una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida a la región Fc del mismo, un anticuerpo con uno o dos restos glucídicos unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo sin glucídicos unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc. y combinaciones de las alteraciones de glucosilación. Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, se puede unir una estructura de oligosacárido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el residuo 299 (298, numeración EU de los residuos).

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterápicos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas hormonas del crecimiento tales como hormona del crecimiento humana; hormona del crecimiento humana *N*-metionilada y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteínicas tales como hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina murina; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento y transformación (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factores de crecimiento insulínicos I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β y γ ; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o procedentes de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

El término "agente inmunosupresor", como se usa en el presente documento para tratamiento complementario, se refiere a sustancias que actúan inhibiendo o enmascarando el sistema inmunitario del sujeto que se está tratando en el presente documento. Esto incluiría sustancias que inhiben la producción de citocinas, regulan por disminución o inhiben la expresión de autoantígenos, o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (véase la patente de EE. UU. n.º 4.665.077); fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); ganciclovir; tacrólimus; glucocorticoesteroides tales como cortisol o aldosterona; agentes antiinflamatorios tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa; un inhibidor de la 5-lipoxigenasa; o un antagonista del receptor de leucotrienos; antagonistas purínicos tales como azatioprina o micofenolato mofetilo (MMF); agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina; 6-mercaptapurina; esteroides tales como corticoesteroides o glucocorticoesteroides o análogos de glucocorticoesteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluyendo SOLU-MEDROLTM succinato de sodio de metilprednisolona y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa, tales como metotrexato (oral o subcutáneo); agentes antipalúdicos tales como cloroquina e hidroxicloroquina; sulfasalazina; anticuerpos o antagonistas de citocinas o receptores de citocinas, incluyendo anticuerpos antiinterferón-alfa, beta o gamma, anticuerpos antifactor de necrosis tumoral (TNF)-alfa (infliximab (REMICADETM) o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti-TNF-beta, anticuerpos antiinterleucina-2 (IL-2) y anticuerpos antirreceptor de IL-2, y anticuerpos y antagonistas antirreceptor de interleucina-6 (IL-6); anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; globulina antilinfocitos heteróloga; anticuerpos pan-T, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptocinasa; factor de crecimiento y transformación beta (TGF-beta); estreptodornasa; ARN o ADN del huésped; FK506; RS-61443; clorambucilo; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de linfocitos T (Cohen *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.114.721); fragmentos del receptor de linfocitos T (Offner *et al.*, Science, 251:430-432 (1991); documento WO 90/11294; laneway, Nature, 341:482 (1989); y documento WO 91/01133); antagonistas de BAFF tales como anticuerpos o inmunoadhesinas de BAFF o BR3 y antagonistas de zTNF4 (para una recapitulación, véase Mackay y Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002) y véase también la definición a continuación); agentes biológicos que interfieren en las señales de los linfocitos T cooperadores, tal como el receptor de anti-CD40 o el ligando anti-CD40 (CD154), incluyendo anticuerpos bloqueantes contra CD40-ligando de CD40 (por ejemplo, Durie *et al.*, Science, 261: 1328-30 (1993); Mohan *et al.*, J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck *et al.*, Science, 265: 1225-7 (1994)); y anticuerpos del receptor de

linfocitos T (documento EP 340.109) tal como T10B9.

El término "mejorar" o "mejoría", como se usa en el presente documento, se refiere a una disminución, reducción o eliminación de una afección, enfermedad, trastorno o fenotipo, incluyendo una anomalía o síntoma.

Un "síntoma" de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn) es cualquier fenómeno mórbido o desviación respecto a la estructura, función o sensación normal que experimenta un sujeto e indicativo de enfermedad.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz para evitar, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn). Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo se refiere a una cantidad del anticuerpo que es eficaz para evitar, mejorar o tratar la enfermedad o trastorno específico. De forma similar, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una combinación de un anticuerpo y un segundo compuesto se refiere a una cantidad del anticuerpo y una cantidad del segundo compuesto que, en combinación, es eficaz para evitar, mejorar o tratar la enfermedad o trastorno específico.

Se debe entender que la terminología "una combinación de" dos compuestos no significa que los compuestos se tengan que administrar mezclados entre sí. Por tanto, el tratamiento con o el uso de dicha combinación engloba una mezcla de los compuestos o la administración separada de los compuestos, e incluye la administración en el mismo día o días diferentes. Por tanto, la terminología "combinación" significa que se usan dos o más compuestos para el tratamiento, ya sea individualmente o mezclados entre sí. Cuando un anticuerpo y un segundo compuesto, por ejemplo, se administran en combinación a un sujeto, el anticuerpo está presente en el sujeto en un momento en que el segundo compuesto también está presente en el sujeto, independientemente de que el anticuerpo y el segundo compuesto se administren individualmente o mezclados al sujeto. En determinados modos de realización, un compuesto distinto del anticuerpo se administra antes del anticuerpo. En determinados modos de realización, un compuesto distinto del anticuerpo se administra después del anticuerpo.

Para los propósitos del presente documento, "factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)" se refiere a una molécula de TNF-alfa humana que comprende la secuencia de aminoácidos como se describe en Pennica *et al.*, Nature, 312:721 (1984) o Aggarwal *et al.*, JBC, 260:2345 (1985).

Un "inhibidor de TNF-alfa" en el presente documento es un agente que inhibe, en cierta medida, una función biológica del TNF-alfa, en general a través de la unión al TNF-alfa y neutralizando su actividad. Ejemplos de inhibidores de TNF contemplados específicamente en el presente documento son etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®), adalimumab (HUMIRA®), golimumab (SIMPONITM) y certolizumab pegol (CIMZIA®).

"Corticoesteroide" se refiere a una cualquiera de las varias sustancias sintéticas o naturales con la estructura química general de los esteroides que imitan o potencian los efectos de los corticoesteroides naturales. Ejemplos de corticoesteroides sintéticos incluyen prednisona, prednisolona (incluyendo metilprednisolona), triamcinolona, dexametasona y betametasona.

Un "antagonista" se refiere a una molécula que puede neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir en las actividades de una proteína particular o específica, incluyendo su unión a uno o más receptores en el caso de un ligando o su unión a uno o más ligandos en el caso de un receptor. Los antagonistas incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, proteínas, péptidos, glucoproteínas, glucopéptidos, glucolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y la traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de la proteína, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a la proteína impidiendo de este modo su unión a su diana, variantes de antagonista de la proteína, moléculas antisentido dirigidas contra la proteína, aptámeros de ARN y ribozimas contra la proteína.

Un "dispositivo de autoinyección" se refiere a un dispositivo médico para autoadministración, por ejemplo, por parte de un paciente o cuidador en el hogar, de un agente terapéutico. Los dispositivos de autoinyección incluyen dispositivos autoinyectores y otros dispositivos diseñados para la autoadministración.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a polinucleótidos monocatenarios cortos que tienen al menos aproximadamente siete nucleótidos de longitud y menos de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior de los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido monocatenario que puede hibridar con un ácido nucleico y permitir la polimerización de un ácido nucleico complementario, en general proporcionando un grupo 3'-OH libre.

El término "amplificación" se refiere al procedimiento de producir una o más copias de una secuencia de ácido

nucleico de referencia o su complemento. La amplificación puede ser lineal o exponencial (por ejemplo, PCR). Una "copia" no significa necesariamente una complementariedad o identidad de secuencia perfecta respecto a la secuencia molde. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos nucleotídicos tales como desoxiinosina, alteraciones de secuencia intencionadas (tales como alteraciones de secuencia introducidas a través de un cebador que comprende una secuencia que se puede hibridar con, pero no es completamente complementaria del, el molde) y/o errores de secuencias que se producen durante la amplificación.

El término "detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo detección directa e indirecta.

"Expresión elevada" o "niveles elevados" se refiere a una expresión incrementada de un ARNm o una proteína en un paciente con respecto a un control, tal como un individuo o individuos que no padecen una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, EII, o con respecto a un umbral o valor de corte preestablecido, o con respecto a la mediana para una población de pacientes y/o sujetos.

"Expresión baja" o "niveles de expresión bajos" se refiere a una expresión disminuida de un ARNm o una proteína en un paciente con respecto a un control, tal como un individuo o individuos que no padecen una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, EII, o con respecto a un umbral o valor de corte preestablecido, o con respecto a la mediana para una población de pacientes y/o sujetos.

El término "PCR múltiple" se refiere a una única reacción de PCR llevada a cabo en ácido nucleico obtenido de una sola fuente (por ejemplo, un paciente) usando más de un conjunto de cebadores con el propósito de amplificar dos o más secuencias de ADN en una sola reacción.

El término "biomarcador", como se usa en el presente documento, se refiere a un indicador de un fenotipo de un paciente, por ejemplo, un estado patológico o una reactividad probable a un agente terapéutico, que se puede detectar en una muestra biológica del paciente. Los biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores moleculares basados en ADN, ARN, proteínas, carbohidratos o glucolípidos.

El término "diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a la identificación o clasificación de un estado molecular o patológico, enfermedad o afección. Por ejemplo, "diagnóstico" se puede referir a la identificación de un tipo particular de EII, por ejemplo, CU o enfermedad de Crohn. "Diagnóstico" también se puede referir a la clasificación de un subtipo particular de EII, por ejemplo, mediante criterios histopatológicos o mediante rasgos característicos moleculares (por ejemplo, un subtipo caracterizado por la expresión de uno o una combinación de genes particulares o proteínas codificadas por dichos genes).

La expresión "que colabora en el diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a procedimientos que ayudan a hacer una determinación clínica con respecto a la presencia, o naturaleza, de un tipo particular de síntoma o afección. Por ejemplo, un procedimiento que colabora en el diagnóstico de EII puede comprender medir la expresión de determinados genes en una muestra biológica de un individuo.

El término "pronóstico" se usa en el presente documento para referirse a la predicción de la probabilidad de síntomas de enfermedad atribuibles a un trastorno autoinmunitario de una enfermedad autoinmunitaria, tal como la EII.

El término "predicción" se usa en el presente documento para referirse a la probabilidad de que un paciente responda favorablemente o desfavorablemente a un fármaco (agente terapéutico) o conjunto de fármacos o una pauta terapéutica. En un modo de realización, la predicción se refiere al grado de esas respuestas. En un modo de realización, la predicción se refiere a si un paciente sobrevivirá o mejorará, y/o a la probabilidad de que lo haga, después del tratamiento, por ejemplo, el tratamiento con un agente terapéutico particular, o durante un determinado período de tiempo sin recidiva de la enfermedad. Los procedimientos predictivos de la divulgación se pueden usar clínicamente para tomar decisiones de tratamiento al elegir las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente en particular. Los procedimientos predictivos de la presente divulgación son herramientas valiosas para predecir si es probable que un paciente responda favorablemente a una pauta de tratamiento, tal como una pauta terapéutica dada, incluyendo, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico dado o combinación, intervención quirúrgica, tratamiento con esteroides, etc., o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente o la remisión o remisión mantenida después de una pauta terapéutica.

Un "sujeto de control" se refiere a un sujeto sano al que no se ha diagnosticado una enfermedad en particular, por ejemplo, EII, y que no padece ningún signo o síntoma asociado con esa enfermedad.

Por "correlacionar" o "correlación" se entiende comparar, de cualquier manera, el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para llevar a cabo un segundo protocolo y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si se debe realizar un segundo análisis o protocolo. Con respecto al modo de realización de un análisis o protocolo de expresión génica, se pueden usar los resultados del análisis o protocolo de expresión génica para determinar si se debe realizar una pauta terapéutica

específica.

El término "comparar", como se usa en el presente documento, se refiere a comparar el nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente con el nivel de referencia del biomarcador especificado en otra parte de esta descripción. Se debe entender que comparación, como se usa en el presente documento, se refiere normalmente a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida del biomarcador en una muestra se compara con el mismo tipo de señal de intensidad obtenida de una muestra de referencia. La comparación se puede llevar a cabo de forma manual o asistida por ordenador. Por tanto, la comparación se puede llevar a cabo por un dispositivo informático (por ejemplo, de un sistema divulgado en el presente documento). El valor del nivel medido o detectado del biomarcador en la muestra del individuo o paciente y el nivel de referencia se pueden comparar, por ejemplo, entre sí, y dicha comparación se puede llevar a cabo de forma automática mediante un programa informático que ejecute un algoritmo para la comparación. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede evaluar además el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la valoración deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede evaluar además el resultado de la comparación, es decir, proporciona automáticamente la valoración deseada en un formato de salida adecuado.

La expresión "recomendar un tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere al uso de la información o los datos generados referidos el nivel o la presencia del ARNm de la integrina beta7 o de la proteína, ARNm de la integrina alfaE o de la proteína, o ARNm de CD3 épsilon o de la proteína en una muestra de un paciente para identificar que el paciente se trata adecuadamente o no se trata adecuadamente con un tratamiento. En algún modo de realización, el tratamiento puede comprender un antagonista de integrina beta7, incluyendo un anticuerpo antiintegrina beta7 tal como etrolizumab. En algunos modos de realización, la expresión "recomendar un tratamiento" incluye la identificación de un paciente que requiere adaptación de una cantidad eficaz del antagonista de integrina beta7 que se está administrando. En algunos modos de realización, recomendar un tratamiento incluye recomendar que se adapte la cantidad de antagonista de integrina beta7 que se está administrando. La expresión "recomendar un tratamiento", como se usa en el presente documento, también se puede referir al uso de la información o los datos generados para proponer o seleccionar un tratamiento que comprenda un antagonista de integrina beta7 para un paciente identificado o seleccionado como más o menos probable que responda al tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7. La información o los datos usados o generados pueden estar en cualquier forma, escrita, verbal o electrónica. En algunos modos de realización, el uso de la información o los datos generados incluye comunicarlos, presentarlos, notificarlos, almacenarlos, enviarlos, transferirlos, suministrarlos, transmitirlos, distribuirlos o combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, la comunicación, la presentación, la notificación, el almacenamiento, el envío, la transferencia, el suministro, la transmisión, la distribución o las combinaciones de los mismos se realizan mediante un dispositivo informático, una unidad de análisis o una combinación de los mismos. En otros modos de realización, la comunicación, la presentación, la notificación, el almacenamiento, el envío, la transferencia, el suministro, la transmisión, la distribución o las combinaciones de los mismos se realizan mediante un profesional de laboratorio o médico. En algunos modos de realización, la información o los datos incluyen una comparación del nivel de ARNm de la integrina beta7 o la proteína, ARNm de la integrina alfaE o la proteína, o ARNm de CD3 épsilon o la proteína con un nivel de referencia. En algunos modos de realización, la información o los datos incluyen una indicación de que el ARNm de la integrina beta7 o la proteína, el ARNm de la integrina alfaE o la proteína, o el ARNm de CD3 épsilon o la proteína están presentes o ausentes en la muestra. En algunos modos de realización, la información o los datos incluyen una indicación de que el paciente está tratado adecuadamente o no tratado adecuadamente con un tratamiento que comprende un antagonista de integrina beta7, incluyendo un anticuerpo antiintegrina beta7 tal como etrolizumab.

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones incluidas normalmente en envases comerciales de productos terapéuticos o medicamentos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos para combinar con el producto envasado y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos o medicamentos y similares.

Un "kit" es cualquier producto fabricado (por ejemplo, un envase o recipiente) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una EII, por ejemplo, CU o enfermedad de Crohn, o una sonda para detectar específicamente un gen o proteína biomarcadores usados en la presente invención.

Un "público destinatario" es un grupo de personas o una institución a los que se está promocionando o se pretende promocionar un medicamento en particular, como por marketing o anuncios, especialmente para usos, tratamientos o indicaciones particulares, tales como pacientes individuales, poblaciones de pacientes, lectores de periódicos, literatura médica y revistas, espectadores de televisión o usuarios de Internet, radioyentes u oyentes por Internet,

médicos, empresas farmacéuticas, etc.

La expresión "muestra de suero" se refiere a cualquier muestra de suero obtenida de un individuo. Son bien conocidos en la técnica procedimientos para obtener suero de mamíferos.

El término "sangre completa" se refiere a cualquier muestra de sangre completa obtenida de un individuo. Típicamente, la sangre completa contiene todos los componentes de la sangre, por ejemplo, los componentes celulares y el plasma. Son bien conocidos en la técnica procedimientos para obtener sangre completa de mamíferos.

La expresión "no sensible a", "ausencia de respuesta" y variantes gramaticales de la misma, referidas a la reacción de los sujetos o pacientes a uno o más de los medicamentos (agentes terapéuticos) que se les administraron previamente, describe aquellos sujetos o pacientes que, tras la administración de dicho(s) medicamento(s), no presentaron ningún signo o signos adecuados de tratamiento del trastorno para el que se les estaba tratando, o presentaron un grado de toxicidad inaceptablemente alto clínicamente para el(los) medicamento(s), o no mantuvieron los signos del tratamiento después de haberse administrado por primera vez dicho(s) medicamento(s), usándose la palabra tratamiento en este contexto como se define en el presente documento. La expresión "no sensible" incluye una descripción de aquellos sujetos que son resistentes y/o insensibles al(a los) medicamento(s) administrado(s) previamente, e incluye las situaciones en las que un sujeto o paciente ha progresado mientras recibe el(los) medicamento(s) que se le están dando, y en el que un sujeto o paciente ha progresado en los 12 meses (por ejemplo, en los seis meses) después de completar una pauta que implica el(los) medicamento(s) a los que ya no es sensible. La falta de reactividad a uno o más medicamentos incluye, por tanto, sujetos que siguen teniendo enfermedad activa después del tratamiento previo o actual con los mismos. Por ejemplo, un paciente puede tener actividad de la enfermedad activa después de aproximadamente uno a tres meses, o tres a seis meses, o seis a 12 meses, de tratamiento con el(los) medicamento(s) a los que no es sensible. Dicha reactividad se puede evaluar por un médico experto en el tratamiento del trastorno en cuestión.

Para propósitos de ausencia de respuesta al(a los) medicamento(s), un sujeto que experimenta "un nivel de toxicidad inaceptablemente alto clínicamente" del tratamiento anterior o actual con uno o más medicamentos experimenta uno o más efectos secundarios negativos o acontecimientos adversos asociados con los mismos, que un médico experimentado considera significativos, tales como, por ejemplo, infecciones graves, insuficiencia cardíaca congestiva, desmielinización (que da lugar a esclerosis múltiple), hipersensibilidad significativa, acontecimientos neuropatológicos, altos grados de autoinmunidad, un cáncer tal como cáncer de endometrio, linfoma no hodgkiniano, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o melanoma, tuberculosis (TB) y similares.

La "cantidad" o "nivel" de un biomarcador asociado con un beneficio clínico incrementado para un paciente que padece una determinada enfermedad o trastorno, o predictivo de una respuesta a un agente terapéutico o pauta de tratamiento en particular, es un nivel detectable en una muestra biológica. Estos se pueden medir por procedimientos conocidos por un experto en la técnica y también se divulgan en el presente documento. El nivel de expresión o cantidad de biomarcador evaluado se puede usar para determinar la respuesta o la respuesta prevista a un tratamiento o agente terapéutico.

Los términos "nivel de la expresión" o "nivel de expresión" se usan, en general, de manera intercambiable y, en general, se refieren a la cantidad de un polinucleótido o un producto de aminoácido o proteína en una muestra biológica. "Expresión" se refiere, en general, al proceso por el que la información codificada por el gen se convierte en las estructuras presentes y en funcionamiento en la célula. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, "expresión" de un gen se puede referir a la transcripción en un polinucleótido, a la traducción en una proteína o incluso a la modificación postraduccional de la proteína. Los fragmentos del polinucleótido transcrito, la proteína traducida o la proteína modificada postraduccionalmente también se considerarán expresados, con independencia de que se originen a partir de un transcrito generado por ajuste alternativo o un transcrito degradado, o de un procesamiento postraduccional de la proteína, por ejemplo, por proteólisis. Los "genes expresados" incluyen aquellos que se transcriben en un polinucleótido como ARNm y a continuación se traducen en una proteína, y también aquellos que se transcriben en ARN, pero no se traducen en una proteína (por ejemplo, ARN de transferencia y ribosómicos).

Una variedad de términos adicionales se define o caracteriza de otro modo en el presente documento.

COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

A. Antagonistas de la integrina beta7

Se proporcionan procedimientos de tratamiento de un trastorno inflamatorio gastrointestinal en un sujeto, por ejemplo, un ser humano, administrando antagonistas de integrina beta7. Los ejemplos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con integrina beta7 y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos

monocatenarios, anticuerpos antiidiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo. De forma alternativa, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada de la integrina beta7 que reconoce el ligando, pero no confiere ningún efecto, inhibiendo de este modo competitivamente la acción de la integrina beta7.

Otro antagonista de integrina beta7 potencial es un o una construcción de ADN o ARN antisentido preparada usando tecnología antisentido, donde, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm mediante hibridación con el ARNm seleccionado y evitando la traducción de proteínas. Se puede usar tecnología antisentido para controlar la expresión génica a través de la formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, basándose ambos procedimientos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia polinucleotídica, que codifica la integrina beta7 en el presente documento, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN está diseñado para que sea complementario de una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice, véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241:456 (1988); Dervan *et al.*, Science, 251: 1360 (1991)), impidiendo de este modo la transcripción y la producción de la integrina beta7. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en la proteína integrina beta7 (antisentido - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, Fla., 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden administrar a células de manera que el ARN o ADN antisentido se pueda expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO. Cuando se usa ADN antisentido, son típicos los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones aproximadamente -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

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

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que pueden catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguida de escisión endonucleolítica. Se pueden identificar por técnicas conocidas sitios de escisión de la ribozima específicos dentro de una diana de ARN potencial. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), y la publicación PCT n.º WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deben ser monocatenarias y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos está diseñada de modo que promueva la formación de triples hélices por medio de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que en general requieren grandes extensiones de purinas o pirimidinas en una hebra de una doble hélice. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 97/33551. Estas pequeñas moléculas se pueden identificar mediante uno cualquiera o más de los ensayos de cribado analizados anteriormente en el presente documento y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la técnica.

Los ensayos de cribado de antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con la integrina beta7 codificada por los genes identificados en el presente documento, o que interfieren de otro modo en la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles al cribado de alto rendimiento de colecciones químicas, lo que los hace adecuados en particular para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña.

Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

B. Anticuerpos antiintegrina beta7

En un modo de realización, los antagonistas de integrina beta7 son anticuerpos antibeta7. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecíficos y heteroconjugados, etc., como se describe a continuación.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se pueden obtener preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un

agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

5 Se inmunizan animales contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por ruta intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el título de anticuerpos. Se administra una dosis de refuerzo a los animales hasta alcanzar una meseta del título. En determinados modos de realización, se administra una dosis de refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden preparar conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunitaria.

2. *Anticuerpos monoclonales*

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente para generar linfocitos que producen o que pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. De forma alternativa, se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y a continuación se fusionan con una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, que es un medio que puede contener una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas (también denominadas compañera de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT.

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

Se somete a ensayo el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. En determinados modos de realización, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos

convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede disponer el ADN en vectores de expresión que, a continuación, se transfecan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de recapitulación sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 5:256-262 (1993) y Plükhun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En otro modo de realización, se pueden aislar anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo a partir de colecciones de fagos de anticuerpos generadas usando, por ejemplo, las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante reorganización de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para que produzca polipéptidos de anticuerpos de fusión o quiméricos, por ejemplo, sustituyendo las secuencias murinas homólogas por las secuencias del dominio constante de cadena pesada y de cadena ligera (CH y CL) humanas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o fusionando la secuencia codificante de inmunoglobulina con la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Los dominios constantes de un anticuerpo pueden sustituir las secuencias polipeptídicas distintas de inmunoglobulina, o los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo puede sustituirlos para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

Ejemplos de anticuerpos anti-beta7 son Fib504, Fib 21, 22, 27, 30 (Tidswell, *M. J Immunol.* 1 de agosto de 1997; 159(3):1497-505) o derivados humanizados de los mismos. Se divulgaron en detalle anticuerpos humanizados de Fib504 en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20060093601 (publicada como patente de EE. UU. n.º 7.528.236), (véase también el análisis a continuación).

3. Anticuerpos humanos y humanizados

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

Son bien conocidos en la técnica procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por CDR o secuencias de CDR de roedor. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La elección de los dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como de pesada, que

se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano antirratón) cuando el anticuerpo está destinado para su uso terapéutico en seres humanos. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias de dominio variable humanas conocidas. Se identifica la secuencia de dominio V humana que es la más próxima a la del roedor y se acepta la región marco (FR) humana dentro de la misma para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Se puede usar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993)). Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con determinados modos de realización, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Están disponibles comúnmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias de receptor y de importación de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en influir en la unión a antígeno.

Se contemplan diversas formas de un anticuerpo antiintegrina beta7 humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoc conjugado. De forma alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Los anticuerpos anti-beta7 humanizados ejemplares incluyen, pero no se limitan a rhuMAb Beta7, que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la subunidad $\beta 7$ de la integrina y se obtuvo del anticuerpo monoclonal de rata antirratón/humano FIB504 (Andrew *et al.*, 1994 J Immunol 1994; 153:3847-61). Se ha genomanipulado para que incluya los marcos de cadena pesada y de cadena ligera $\kappa 1$ de inmunoglobulina IgG1 humana y se produce por células de ovario de hámster chino. Este anticuerpo se une a dos integrinas, $\alpha 4\beta 7$ (Holzmann *et al.* 1989 Cell, 1989;56:37-46; Hu *et al.*, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:8254-8) y $\alpha E\beta 7$ (Cepek *et al.*, 1993 J Immunol 1993;150:3459-70), que regulan el transporte y la retención de subconjuntos de linfocitos en el tubo gastrointestinal y están implicadas en enfermedades inflamatorias intestinales (EII) tal como la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). rhuMAb Beta7 es un potente bloqueador *in vitro* de la interacción celular entre $\alpha 4\beta 7$ y sus ligandos (molécula de adhesión celular adreína de la mucosa-1 [MAdCAM]-1, molécula de adhesión a células vasculares [VCAM]-1 y fibronectina), así como la interacción entre $\alpha E\beta 7$ y su ligando (E-cadherina). rhuMAb Beta7 se une de forma reversible, con afinidad alta similar, a $\beta 7$ en linfocitos de conejos, macacos cangrejeros y seres humanos. También se une a $\beta 7$ de ratón con alta afinidad. La secuencia de aminoácidos, así como la preparación y uso de rhuMAb Beta7 y sus variantes se divulgan en detalle, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060093601 (publicada como patente de EE. UU. n.º 7.528.236).

Las figs. 1A y 1B representan la alineación de secuencias de las cadenas ligeras y pesadas variables para lo siguiente: secuencia consenso del subgrupo kappa I humano de cadena ligera (FIG. 1A, SEQ ID NO: 12), secuencia consenso del subgrupo III humano de cadena pesada (FIG. 1B, SEQ ID NO: 13), cadena ligera variable del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (FIG. 1A, SEQ ID NO: 10), cadena pesada variable del anticuerpo de rata anti-beta7 de ratón (Fib504) (FIG. 1B, SEQ ID NO: 11), y variantes de anticuerpos humanizados: cadena ligera variable de injerto de hu504K humanizado (FIG. 1A, SEQ ID NO: 14), cadena pesada variable de injerto de hu504K humanizado (FIG. 1B, SEQ ID NO: 15), variantes hu504-5, hu504-16 y hu504-32 (las variaciones de aminoácidos del injerto de hu504K humanizado se indican en la FIG. 1A (cadena ligera) (SEQ ID NO: 22-24, respectivamente, en orden de aparición) y la FIG. 1B (cadena pesada) para las variantes hu504-5, hu504-16 y 504-32 (SEQ ID NO: 25).

4. Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras su inmunización, puedan producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno. 7:33 (1993); patentes de EE. UU. n.º 5.545.806,

5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); patente de EE. UU. n.º 5.545.807; y documento WO 97/17852.

De forma alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro* a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan sin cambio de pauta de lectura en un gen de proteína de la cápside mayor o bien menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, resumidos en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña colección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos con respecto a una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse también, las patentes de EE. UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Como se analiza anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.567.610 y 5.229.275).

5. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas circunstancias, existen ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser mono-específicos o bis-específicos.

6. Anticuerpos bis-específicos

Los anticuerpos bis-específicos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos bis-específicos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes de integrina beta7 como se describe en el presente documento. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TAT con un sitio de unión para otra proteína. De forma alternativa, se puede combinar un brazo de anti-integrina beta7 con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa TAT. También se pueden usar anticuerpos bis-específicos para localizar agentes citotóxicos con respecto a células que expresan TAT. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-alfa, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Se pueden preparar anticuerpos bis-específicos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos bis-específicos F(ab')₂).

Son conocidos en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos bis-específicos. La producción tradicional de anticuerpos bis-específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura bis-específica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan

procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión
 5 deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de
 inmunoglobulina. En determinados modos de realización, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada
 de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, H2 y H3. En determinados modos de realización, la
 primera región constante de cadena pesada (C_{H1}), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera,
 10 está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de
 inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión
 separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad al ajustar las
 proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modos de realización en los que proporciones
 desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del
 anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres
 15 cadenas polipeptídicas en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas
 polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen un
 efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de
 inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena
 20 ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se
 descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de
 combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de
 inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este
 enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos
 25 biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.731.168, se puede genomanipular la interfase
 entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del
 cultivo de células recombinantes. En determinados modos de realización, la interfase comprende al menos una
 30 parte del dominio C_{H3}. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la
 interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo,
 tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es)
 grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos
 grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para
 35 incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, se puede acoplar
 uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos
 anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y
 40 para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden
 preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de
 reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto
 con varias técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de
 anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*,
 Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos
 para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente arsenito de sodio que forma
 complejos con ditiol para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A
 50 continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB): uno de los
 derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se
 mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los
 anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden
 acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)
 describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada
 fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar
 el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado se pudo unir a células que sobreexpresaban el
 60 receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos
 humanos frente a dianas de tumor de mama humanas. También se han descrito diversas técnicas para preparar y
 aislar directamente fragmentos de anticuerpo biespecífico del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han
 producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553
 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las partes Fab' de dos
 65 anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra
 para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este

procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

7. Anticuerpos heteroconjugados

También se divulgan anticuerpos heteroconjugados en el presente documento. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas [patente de EE. UU. n.º 4.676.980], y para el tratamiento de la infección por el VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; documento EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los divulgados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980.

8. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unan los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En determinados modos de realización, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno aminoterminal con respecto a la región Fc. En determinados modos de realización, el anticuerpo multivalente en el presente documento comprende (o consiste en) de tres hasta aproximadamente ocho, pero típicamente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y típicamente dos cadenas polipeptídicas), en el que la(s) cadena(s) polipeptídica(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (y típicamente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos hasta aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9. Genomanipulación de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la divulgación con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad celular dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones aminoacídicas en una región Fc del anticuerpo. De forma alternativa o adicionalmente, se puede(n) introducir (un) residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research 53:2560-2565 (1993). De forma alternativa, se puede genomanipular un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y, de este modo, pueda tener capacidades de lisis mediada por el complemento y de ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para incrementar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por

ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

10. *Inmunconjugados*

El antagonista o anticuerpo usado en los procedimientos en el presente documento opcionalmente se conjuga con otro agente, tal como un agente citotóxico o citocina.

La conjugación normalmente se logrará a través de un enlace covalente, cuya naturaleza precisa estará determinada por la molécula de direccionamiento y el sitio de enlace en el antagonista de integrina beta7 o el polipéptido del anticuerpo. Típicamente, un agente no peptídico se modifica mediante la adición de un conector que permite la conjugación con el anticuerpo antiintegrina beta7 a través de sus cadenas laterales de aminoácido, cadenas glucídicas o grupos reactivos introducidos en el anticuerpo por modificación química. Por ejemplo, un fármaco se puede unir a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina, a través de un grupo alfa-amino libre, por intercambio de disulfuro a un residuo de cisteína, o por oxidación de los 1,2-dioles en una cadena glucídica con ácido peryódico para permitir la unión de fármacos que contienen diversos nucleófilos a través de un enlace de base de Schiff. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.256.833. Los agentes modificadores de proteínas incluyen reactivos que son reactivos con aminas (por ejemplo, ésteres reactivos, isotiocianatos, aldehídos y haluros de sulfonilo), reactivos que son reactivos con tiol (por ejemplo, derivados haloacetílicos y maleimidas), y reactivos que son reactivos con aldehído y ácido carboxílico. El antagonista de integrina beta7 o los polipéptidos de anticuerpo se pueden unir covalentemente a agentes peptídicos a través del uso de reactivos de reticulación bifuncionales. Se usan más frecuentemente reactivos heterobifuncionales y permiten el acoplamiento controlado de dos proteínas diferentes a través del uso de dos restos reactivos diferentes (por ejemplo, reactivo con amina más tiol, yodoacetamida o maleimida). El uso de dichos agentes de unión es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Brinkley, *supra*, y la patente de EE. UU. n.º 4.671.958. También se pueden emplear conectores peptídicos. En la alternativa, un polipéptido de anticuerpo antiintegrina beta7 se puede unir a un resto peptídico a través de la preparación de un polipéptido de fusión.

Los ejemplos de otros agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales incluyen propionato de *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(*N*-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno).

11. *Inmunoliposomas*

Los anticuerpos antiintegrina beta7 divulgados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo, que es útil para administrar un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); patentes de EE. UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se divulgan liposomas con tiempo en circulación potenciado en la patente de EE. UU. n.º 5.013.556.

Se pueden generar liposomas útiles en particular mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Se pueden conjugar fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente divulgación con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente un agente quimioterápico está contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

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

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-beta7 o agentes polipeptídicos descritos en el presente documento, vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y técnicas recombinantes para la producción de los anticuerpos.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se puede aislar e insertar en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. En otro modo de realización, el

anticuerpo se puede producir por recombinación homóloga, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.204.244, el ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y se secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.534.615 publicada el 9 de julio de 1996.

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo antiintegrina beta7. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más usada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, otros varios géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-Beta7 glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como el virus, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

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

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos antiintegrina beta7 y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo antiintegrina beta7 se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de EE. UU. re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento

epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, se retiran los restos de partículas, células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar, en general, usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes casuales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación típica. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es lo más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con poli(ácido aspártico)), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar. Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizada típicamente a concentraciones de sal bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

C. Formulaciones farmacéuticas

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

Las formulaciones en el presente documento pueden contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, típicamente aquellos que tienen actividades complementarias que no resultan afectadas de manera adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales

(por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

- 5 Las formulaciones que se vayan a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la divulgación, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno y acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Si bien polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden ingeniar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

D. Administración

El médico que administre el tratamiento podrá determinar la dosis adecuada para el sujeto individual para una dosificación basada en el peso o, para una dosificación fija, seguirá las instrucciones en la ficha técnica. La preparación y las pautas posológicas para los segundos compuestos terapéuticos y otros compuestos comercialmente disponibles administrados en combinación con los antagonistas de integrina beta7 se pueden usar de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o se pueden determinar empíricamente por el experto en la técnica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada del antagonista de integrina beta7 y cualquier segundo compuesto terapéutico u otro compuesto administrado en combinación con el anticuerpo no reductor dependerá del tipo de trastorno inflamatorio gastrointestinal que se vaya a tratar, por ejemplo, EII, CU, EC, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el antagonista de integrina beta7 o combinación se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la anamnesis del paciente y la respuesta al antagonista de integrina beta7 o combinación, y el criterio del médico especialista. El antagonista de integrina beta7 o combinación se administra adecuadamente al paciente de una vez o, más típicamente, durante una serie de tratamientos. En determinados modos de realización, el antagonista de integrina beta7 se administra una vez a la semana, o una vez cada dos semanas, o una vez cada cuatro semanas, o una vez cada seis semanas, o una vez cada ocho semanas durante un periodo de un mes (4 semanas), o dos meses, tres meses, o seis meses, o 12 meses, o 18 meses, o 24 meses, o crónicamente durante la vida del paciente. En determinados modos de realización, el paciente se autoadministra el tratamiento.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 0,5 mg/kg a 4,0 mg/kg de anticuerpo anti-beta7 es una dosificación inicial candidata para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación.

Por ejemplo, en determinados modos de realización, se administra una dosis fija de anticuerpo anti-beta7 al paciente. Una dosis fija es una cantidad particular de anticuerpo anti-beta7 que se administra a cada paciente independientemente del peso. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, se administra al paciente una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y 450 mg de anticuerpo anti-beta7, que puede ser una o más inyecciones o infusiones o administraciones separadas. Dicha dosis fija se puede administrar por ruta intravenosa o subcutánea o por otras rutas como se describe en el presente documento. En determinados modos de realización, la dosis fija es de 50 mg, o 100 mg, o 150 mg, o 200 mg, o 300 mg, o 400 mg, o 420 mg, o 450 mg.

En determinados modos de realización, una dosis inicial fija de anticuerpo anti-beta7 va seguida de una o más dosis de mantenimiento fijas de anticuerpo anti-beta7. La dosis inicial es una cantidad mayor de anticuerpo anti-beta7 que la dosis de mantenimiento. En determinados modos de realización, la dosis de ataque está entre aproximadamente 400 mg y 450 mg y la dosis de mantenimiento está entre aproximadamente 50 mg y 350 mg. En determinados

modos de realización, la dosis de ataque es de 400 mg, o 420 mg, o 430 mg, o 450 mg. En determinados modos de realización, la dosis de mantenimiento es de 50 mg, o 100 mg, o 150 mg, o 200 mg, o 300 mg, o 350 mg.

5 Típicamente, el médico administrará un anticuerpo (solo o en combinación con un segundo compuesto) hasta que se alcance una o más dosificaciones que proporcionen el efecto biológico requerido. La evolución de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

10 El antagonista de integrina beta7 se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, tópica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. También se contempla la administración intratecal (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2002/0009444 por Grillo-Lopez). Además, el antagonista de integrina beta7 se puede administrar adecuadamente mediante infusión pulsada, por ejemplo, con dosis decrecientes del anticuerpo. En determinados modos de realización, la dosificación se administra por ruta intravenosa o subcutánea. Cada exposición se puede proporcionar usando el mismo medio de administración o uno diferente. En un modo de realización, cada exposición al anticuerpo anti-beta7 es por administración subcutánea. En un modo de realización, la primera exposición al anticuerpo anti-beta7, por ejemplo, la dosis de ataque, es por administración intravenosa y cada exposición posterior es por administración subcutánea.

20 En determinados modos de realización, se administra un anticuerpo anti-beta7 usando, por ejemplo, un dispositivo de autoinyección, dispositivo autoinyector u otro dispositivo diseñado para la autoadministración. Diversos dispositivos de autoinyección, incluyendo los dispositivos autoinyectores, son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los dispositivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, jeringas precargadas (tales como BD HYPAK SCF®, READYFILL™, y STERIFILL SCF™ de Becton Dickinson; jeringas precargadas de copolímero CLEARSHOT™ de Baxter; y jeringas precargadas CRYSTAL ZENITH® de Daikyo Seiko disponibles en West Pharmaceutical Services); dispositivos de inyección de pluma desechables tales como BD Pen de Becton Dickinson; dispositivos ultra afilados y de microaguja (tales como INJECT-EASE™ y dispositivos microinfusores de Becton Dickinson; y H-PATCH™ disponible en Valeritas), así como dispositivos de inyección sin aguja (tales como BIOJECTOR® e IJECT® disponibles en Bioject; y SOF-SERTER® y dispositivos de parche disponibles en Medtronic). En determinados modos de realización, rhuMAb Beta7 es un artículo de fabricación que comprende una jeringa precargada que comprende 2 ml (150 mg) de rhuMAb Beta7. En determinados modos de realización, rhuMAb Beta7 es un artículo de fabricación que comprende una jeringa precargada que comprende 1 ml (180 mg) de rhuMAb Beta7.

35 Como se indica, el antagonista de integrina beta7 se puede administrar solo o en combinación con al menos un segundo compuesto terapéutico. Estos segundos compuestos terapéuticos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las mismas rutas de administración que las usadas hasta ahora o aproximadamente desde un 1 a un 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora. Si se usan dichos segundos compuestos, se usan en determinados modos de realización en cantidades más bajas que si no estuviera presente el antagonista de integrina beta7, para eliminar o reducir los efectos secundarios causados por el mismo.

40 También como se indica (por ejemplo, véase a continuación), una variedad de segundos compuestos terapéuticos adecuados para el tratamiento de EII, por ejemplo, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, son conocidos en la técnica, y también se han descrito las dosificaciones y procedimientos de administración para dichos segundos compuestos terapéuticos.

50 La administración del antagonista de integrina beta7 y cualquier segundo compuesto terapéutico se puede realizar simultáneamente, por ejemplo, como una composición única o como dos o más composiciones distintas usando las mismas rutas de administración o diferentes. De forma alternativa, o adicionalmente, la administración se puede hacer secuencialmente, en cualquier orden. En determinados modos de realización, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, a semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el antagonista de integrina beta7 se puede administrar primero, seguido del segundo compuesto terapéutico. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del segundo compuesto terapéutico antes del antagonista de integrina beta7.

55 El tratamiento de referencia para sujetos con CU activa moderada-grave implica el tratamiento con dosis estándar de: un aminosalicilato, un corticoesteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y/o azatioprina. El tratamiento con un antagonista de integrina beta7, tal como un anticuerpo antiintegrina beta7 como se divulga en el presente documento, dará como resultado una mejoría en la remisión de la enfermedad (control rápido de la enfermedad y/o remisión prolongada) y/o una respuesta clínica, superior a la lograda con el tratamiento de referencia para dichos sujetos.

60 En un modo de realización, el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto humano con EII comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico, tal como un anticuerpo antiintegrina beta7 y comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un segundo medicamento, que es un inmunosupresor, un agente para controlar el dolor, un agente antidiarreico, un antibiótico o una combinación de los

mismos.

En un modo de realización ejemplar, dicho segundo medicamento se selecciona del grupo que consiste en un aminosalicilato, un corticoesteroide oral, 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina. En otro modo de realización ejemplar, dicho segundo medicamento es otro antagonista de integrina beta7, tal como otro anticuerpo antiintegrina beta7 o un anticuerpo contra una citocina.

Todos estos segundos medicamentos se pueden usar en combinación entre sí o por sí mismos con el primer medicamento, de modo que la expresión "segundo medicamento", como se usa en el presente documento, no significa que sea el único medicamento además del primer medicamento, respectivamente. Por tanto, el segundo medicamento no tiene que ser un medicamento, sino que puede constituir o comprender más de uno de dichos fármacos.

La administración combinada en el presente documento incluye la administración conjunta, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica y la administración sucesiva en cualquier orden, en la que en general habrá un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los ingredientes activos ejerzan sus actividades biológicas de modo simultáneo.

La administración combinada de un segundo medicamento incluye la administración conjunta (administración concurrente), usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica y la administración sucesiva en cualquier orden, en la que en general habrá un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los ingredientes activos (medicamentos) ejerzan sus actividades biológicas de modo simultáneo.

E. Diseño de pautas de tratamiento

El desarrollo de fármacos es un procedimiento complejo y costoso. El coste de llevar un nuevo medicamento al mercado se estima entre 800 millones de dólares americanos y mil millones de dólares americanos. Menos de un 10 % de los fármacos en ensayos clínicos en fase I llegan a la fase de aprobación. Dos razones clave por las que los fármacos fracasan en las últimas etapas son la falta de comprensión de la relación entre la respuesta a la concentración de la dosis y los acontecimientos de toxicidad no previstos. Dada esta situación, es importante contar con herramientas habilitadoras que ayuden a predecir el funcionamiento de un fármaco *in vivo* y ayuden en el éxito de un candidato terapéutico clínico (Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK/PD Testing Drug Discovery & Development (2006)).

La farmacocinética (FC) caracteriza las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco. La farmacodinámica (FD) define la respuesta fisiológica y biológica al fármaco administrado. La generación de modelos de FC/FD establece un vínculo matemático y teórico entre estos dos procesos y ayuda a predecir mejor la acción del fármaco. La generación integrada de modelos de FC/FD y el diseño de ensayos asistido por ordenador por medio de simulación se están incorporando a muchos programas de desarrollo de fármacos y están teniendo un impacto cada vez mayor (Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK/PD Testing Drug Discovery & Development (2006)).

Las pruebas de FC/FD se realizan normalmente en cada fase del procedimiento de desarrollo de fármacos. Debido a que el desarrollo es cada vez más complejo, requiere mucho tiempo y es costoso, las empresas buscan hacer un mejor uso de los datos de FC/FD para eliminar los candidatos defectuosos al principio e identificar aquellos con las mejores probabilidades de éxito clínico. (Lakshmi Kamath, *supra*).

Los enfoques de generación de modelos de FC/FD están demostrando ser útiles para determinar las relaciones entre la respuesta de biomarcadores, los niveles de fármacos y las pautas posológicas. El perfil FC/FD de un fármaco candidato y la capacidad de predecir la respuesta de un paciente son críticos para el éxito de los ensayos clínicos. Los avances recientes en las técnicas de biología molecular y una mejor comprensión de las dianas de diversas enfermedades han validado los biomarcadores como un buen indicador clínico de la eficacia terapéutica de un fármaco. Los ensayos de biomarcadores (incluyendo los descritos en el presente documento) y el uso de dichos ensayos de biomarcadores ayudan a identificar una respuesta biológica a un fármaco candidato. Una vez que un biomarcador se valida clínicamente, las simulaciones de los ensayos se pueden modelar eficazmente. Los biomarcadores tienen el potencial de lograr un estado de indicador indirecto que algún día podrá sustituir los criterios de valoración clínicos en el desarrollo de fármacos. (Lakshmi Kamath, *supra*).

La cantidad de biomarcadores en la sangre periférica, tales como los descritos en el presente documento, se puede usar para identificar la respuesta biológica a un tratamiento con antagonistas de integrina beta7 y, por lo tanto, puede funcionar como un buen indicador clínico de la eficacia terapéutica de un tratamiento candidato.

La generación de modelos FC/FD tradicional en el desarrollo de fármacos define parámetros tales como la concentración de la dosis del fármaco, los efectos de la exposición al fármaco, la semivida del fármaco, las concentraciones del fármaco a lo largo del tiempo y los efectos del fármaco a lo largo del tiempo. Cuando se usan de manera más amplia, las técnicas cuantitativas, tales como el modelado de fármacos, el modelado de

enfermedades, el modelado de ensayos y el modelado de mercado, pueden respaldar todo el procedimiento de desarrollo, lo que se traduce en mejores decisiones a través de una consideración explícita del riesgo y una mejor utilización del conocimiento. Está disponible una variedad de herramientas de generación de modelos FC/FD para los investigadores de desarrollo de fármacos, por ejemplo, WinNonlin y Knowledgebase Server (PKS) desarrollados por Pharsight, Inc. Mountain View, California.

Técnicas generales de biomarcadores

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la literatura, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

Los cebadores, oligonucleótidos y polinucleótidos empleados en la presente invención se pueden generar usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

En el presente documento se proporcionan biomarcadores de expresión génica asociados con la predicción de la reactividad de los pacientes con EII, incluyendo pacientes que padecen CU o enfermedad de Crohn, a determinados agentes terapéuticos. Estos niveles de expresión del ARNm o proteínas individuales codificadas por los genes constituyen biomarcadores para predecir la reactividad a los agentes terapéuticos de la EII, a los agentes terapéuticos de la CU y/o a los agentes terapéuticos de la enfermedad de Crohn. En consecuencia, la presente divulgación es útil en una variedad de entornos, por ejemplo, en procedimientos y composiciones relacionadas con el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.

Detección de los niveles de expresión génica

El ácido nucleico, de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, puede ser ARN transcrito a partir de ADN genómico o ADNc generado a partir de ARN o ARNm. El ácido nucleico se puede derivar de un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Se dice que un ácido nucleico se "deriva de" una fuente particular si se obtiene directamente de esa fuente o si es una copia de un ácido nucleico encontrado en esa fuente.

El ácido nucleico incluye copias del ácido nucleico, por ejemplo, copias que son el resultado de la amplificación. La amplificación puede ser deseable en determinados casos, por ejemplo, para obtener una cantidad deseada de material para detectar variaciones. Los amplicones se pueden someter a continuación a un procedimiento de detección de variaciones, tales como los que se describen a continuación, para determinar la expresión de determinados genes.

Los niveles de ARNm se pueden medir y cuantificar mediante diversos procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el uso de kits y reactivos disponibles comercialmente. Uno de dichos procedimientos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otro procedimiento, para uso cuantitativo, es la PCR cuantitativa en tiempo real, o qPCR. Véase, por ejemplo, "PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications", (M.A. Innis et al., eds., Academic Press, Inc., 1990); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

Una micromatriz es una tecnología múltiple que usa típicamente una serie ordenada de miles de sondas de ácido nucleico para que hibriden con, por ejemplo, una muestra de ADNc o ARNc en condiciones de alta restricción. La hibridación de la sonda y la diana se detecta y cuantifica típicamente mediante la detección de dianas marcadas con fluoróforos, plata o quimioluminiscencia para determinar la abundancia relativa de secuencias de ácido nucleico en la diana. En micromatrices típicas, las sondas se unen a una superficie sólida mediante un enlace covalente a una matriz química (por medio de epoxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida u otros). La superficie sólida es, por ejemplo, vidrio, un chip de silicio o microesferas microscópicas. Diversas micromatrices están disponibles comercialmente, incluyendo las fabricadas, por ejemplo, por Affymetrix, Inc. e Illumina, Inc.

Se puede obtener una muestra biológica usando determinados procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden obtener de animales vertebrados y, en particular, de mamíferos. En determinados casos, una muestra biológica es tejido sinovial, suero o leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC). Cribando dichas muestras corporales, se puede lograr un diagnóstico temprano y simple para enfermedades tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Además, la evolución del tratamiento se puede supervisar más fácilmente sometiendo a prueba dichas muestras corporales para detectar variaciones en los niveles de expresión de los ácidos nucleicos diana (o polipéptidos codificados).

Posteriormente a la determinación de que un sujeto, o la muestra de tejido o células, comprende una característica

distintiva de expresión génica o niveles relativos de determinados biomarcadores divulgados en el presente documento, se contempla que se pueda administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico apropiado al sujeto para tratar la enfermedad particular en el sujeto, por ejemplo, CU o enfermedad de Crohn. El experto en la técnica puede hacer un diagnóstico clínico en mamíferos de las diversas afecciones patológicas descritas en el presente documento. En la técnica están disponibles técnicas de diagnóstico clínico que permiten, por ejemplo, el diagnóstico o la detección de enfermedades inflamatorias intestinales en un mamífero, por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Kits

Para su uso en las aplicaciones descritas o sugeridas en el presente documento, también se proporcionan kits o artículos de fabricación. Dichos kits pueden comprender un medio de soporte que está compartimentado para recibir en estrecho confinamiento uno o más medios de recipiente tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios de recipiente uno de los elementos separados para su uso en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender una sonda que está o puede estar marcada de forma detectable. Dicha sonda puede ser un polinucleótido específico para un polinucleótido que comprende uno o más genes de una característica distintiva de expresión génica. Cuando el kit utiliza la hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen uno o más nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y/o un recipiente que comprende un medio indicador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioisotópico.

Los kits comprenderán típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprendan materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones de uso. Puede estar presente una etiqueta en el recipiente para indicar que la composición se usa para un tratamiento específico o una aplicación no terapéutica, y también puede indicar las directrices para su uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente. Otros componentes opcionales en el kit incluyen uno o más tampones (por ejemplo, tampón de bloqueo, tampón de lavado, tampón de sustrato y similares), otros reactivos tales como el sustrato (por ejemplo, cromógeno) que se altera químicamente por un marcador enzimático, solución de recuperación de epítomos, muestras de control (controles positivos y/o negativos), uno o más portaobjetos de control, etc.

La memoria descriptiva escrita anterior y los siguientes ejemplos se consideran suficientes para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas. Diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los siguientes ejemplos, y están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

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

Se ilustran más detalles de la invención por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

ESTUDIO DE FASE II ALEATORIZADO DOBLE CIEGO Y CONTROLADO CON PLACEBO PARA EVALUAR LA EFICACIA Y LA SEGURIDAD DE rhuMAb BETA7 (ETROLIZUMAB) EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA DE MODERADA A GRAVE Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN ABIERTO

Descripción del estudio clínico

Descripción de rhuMAb Beta7 (etrolizumab)

RhuMAb Beta7 (etrolizumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado basado en las secuencias consenso del subgrupo III de V_H, del subgrupo de κ-1 de V_L de IgG1 humana y está dirigido específicamente a la subunidad β7 del heterodímero de integrina. Véanse las figs. 1A y B. Se ha demostrado que se une con alta afinidad a α4β7 (K_d de aproximadamente 116 pM) y αEβ7 (K_d de aproximadamente 1800 pM).

Este anticuerpo recombinante tiene dos cadenas pesadas (446 residuos) y dos cadenas ligeras (214 residuos) que están unidas covalentemente por enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios típicos de los anticuerpos IgG1. Para el trabajo descrito en el presente documento, se produjo en células de ovario de hámster chino (CHO). La masa molecular de la molécula de rhuMAb Beta7 intacta y no glucosilada era de aproximadamente 144 kDa. Cada cadena pesada de rhuMAb Beta7 tiene un sitio de N-glucosilación conservado en Asn297. Los oligosacáridos

presentes en este sitio eran típicos de los observados en los anticuerpos recombinantes expresados en células CHO, siendo las glucoformas predominantes los asialoglucanos, glucanos biantenarios G0 y G1. La masa de la forma de rhuMAb Beta7 más predominante que contiene dos glucanos G0 y ningún residuo de lisina C-terminal era de aproximadamente 147 kDa.

5 Genentech preparó el producto farmacéutico rhuMAb Beta7 y el placebo. Eran soluciones acuosas transparentes a ligeramente opalescentes, incoloras a ligeramente amarillas. Ambas soluciones eran líquidos estériles y sin conservantes, destinados a la administración i.v. y s.c.

10 **Diseño del estudio**

Descripción del estudio

15 Este estudio de fase II fue un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo y multicéntrico para evaluar la eficacia y la seguridad en dos niveles de dosis de rhuMAb Beta7 en comparación con placebo en pacientes con CU de moderada a grave. El criterio principal de valoración de la eficacia se evaluó en la semana 10 (2 semanas después de la administración de la dosis final del fármaco del estudio) con un criterio secundario de valoración de la eficacia en la semana 6.

20 Los pacientes se aleatorizaron en una proporción 1:1:1 en un intervalo de dosis de rhuMAb Beta7 de 100 mg s.c. (dosis fija) en las semanas 0, 4 y 8, y 420 mg s.c. (dosis de ataque fija) en la semana 0, seguida de 300 mg s.c. en las semanas 2, 4 y 8 o placebo s.c. de aspecto idéntico. El esquema del estudio se muestra en la figura 2. El estudio se dividió en un periodo de selección de 0-35 días, un periodo de tratamiento doble ciego de 10 semanas, un periodo de seguimiento de la seguridad de 18 semanas y un periodo de seguimiento de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) de 17 meses (2 años después de la aleatorización).

30 Para ser idóneos, los pacientes deben haber tenido una duración mínima de 12 semanas de CU diagnosticada de acuerdo con las directrices de práctica del American College of Gastroenterology (ACG); es decir, pruebas clínicas y endoscópicas corroboradas por un informe histopatológico, con pruebas de enfermedad moderada a grave que se demuestra, en determinados casos, por una MCS de ≥ 5 , o en determinados casos, una MCS de ≥ 6 , incluyendo una subpuntuación endoscópica de ≥ 2 ; una subpuntuación de hemorragia rectal de ≥ 1 (véase la tabla 1); y pruebas endoscópicas de actividad de la enfermedad a un mínimo de 25 cm del borde anal. Se incluyen criterios de inclusión y exclusión adicionales para este estudio en la publicación de patente internacional n.º WO/2012/135589.

35 **Tabla 1.** Sistema de puntuación de la Clínica de Mayo para la evaluación de la actividad de la colitis ulcerosa.

Puntuación	Categoría de evaluación			
	Frecuencia de deposiciones ^a	Hemorragia rectal ^b	Hallazgos en endoscopia	Evaluación global del médico ^c
0	n.º normal de deposiciones para este paciente	no se observa sangre	enfermedad normal o inactiva	normal
1	1 a 2 deposiciones más de lo normal	rastros de sangre con las heces menos de la mitad del tiempo	enfermedad leve (eritema, patrón vascular disminuido, friabilidad leve)	enfermedad leve
2	3 a 4 deposiciones más de lo normal	sangre obvia con las heces la mayor parte del tiempo	enfermedad moderada (eritema notable, ausencia de patrón vascular, friabilidad, erosiones)	enfermedad moderada
3	5 o más deposiciones más de lo normal	solo defeca sangre	enfermedad grave (hemorragia espontánea, ulceración)	enfermedad grave
	subpuntuación: 0 a 3	subpuntuación: 0 a 3	subpuntuación: 0 a 3	subpuntuación: 0 a 3

^a Cada paciente sirve como su propio control para establecer el grado de anomalía de la frecuencia de las deposiciones.

40 ^b La puntuación de hemorragia diaria representa la hemorragia más intensa del día.

^c La evaluación global del médico reconoce los otros tres criterios, el recuerdo diario del paciente de malestar en la región abdominal y sensación general de bienestar, y otras observaciones, tales como los hallazgos físicos y el estado funcional del paciente.

45

Antes de la aleatorización, los pacientes deben haber estado en tratamiento con dosis estables de medicamentos concomitantes para la CU. Las dosis orales de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) e inmunosupresor (azatioprina [AZA], 6-mercaptopurina [6-MP] o metotrexato) se deben haber mantenido estables durante al menos 4 semanas antes de la aleatorización el día 1. Los pacientes que recibieron 5-ASA tópico o corticoesteroides deben haber suspendido el tratamiento 2 semanas antes de la aleatorización el día 1. Las dosis de corticoesteroides orales se deben haber mantenido estables durante 2 semanas antes de la aleatorización el día 1. Los pacientes que reciben dosis altas de esteroides deben haber tenido una dosis reducida a ≤ 20 mg/día durante 2 semanas antes de la aleatorización el día 1. Para los pacientes que reciben corticoesteroides orales durante el periodo de tratamiento del estudio, la reducción de los esteroides debe haber comenzado en la semana 10 a una tasa de 5 mg de prednisona o equivalente de prednisona por semana durante 2 semanas y a continuación a una tasa de 2,5 mg de prednisona o equivalente de prednisona por semana hasta la suspensión. Para los pacientes que reciben inmunosupresores orales (que no sean corticoesteroides orales), la reducción de los inmunosupresores debe haber comenzado en la semana 8, y los pacientes deben haber suspendido completamente los inmunosupresores para la semana 10. Los pacientes que previamente han recibido tratamiento anti-TNF deben haber suspendido el tratamiento durante un mínimo de 8 semanas antes de la aleatorización para recibir el medicamento del estudio el día 1. Si los pacientes experimentaban una actividad de la enfermedad persistente o en aumento en cualquier momento durante el estudio, el tratamiento de rescate en forma de un incremento de la dosis de esteroides o inmunosupresores se puede incrementar o iniciar de acuerdo con el criterio clínico del investigador. A los pacientes que requirieron tratamiento de rescate se les permitió permanecer en el estudio, pero suspendieron el tratamiento del estudio y, durante el análisis de los datos, se clasificaron como pacientes que habían experimentado fracaso del tratamiento.

Se evaluó a los pacientes para determinar si no respondían al tratamiento convencional, incluyendo al menos un agente anti-TNF. Como se usa en el presente documento, la pérdida de respuesta y/o intolerancia a los agentes anti-TNF e inmunosupresores significa lo siguiente. Con respecto a los agentes anti-TNF, la pérdida de respuesta y/o intolerancia significa que los síntomas de la enfermedad activa persisten a pesar del tratamiento previo con uno o más de (a) infliximab: 5 mg/kg i.v., 3 dosis durante 6 semanas con evaluación a las 8 semanas; (b) adalimumab: una dosis s.c. de 160 mg en la semana 0, seguida de una dosis de 80 mg en la semana 2 y a continuación 40 mg a las 4 y 6 semanas, con evaluación a las 8 semanas; o síntomas activos recurrentes durante la administración de mantenimiento programada regularmente después de una respuesta previa (la suspensión programada del tratamiento por parte del paciente que ha respondido y no perdió la respuesta no reúne los requisitos); o antecedentes de intolerancia a al menos un anticuerpo anti-TNF (incluyendo, pero sin excluir o sin limitarse a, reacciones relacionadas con la infusión o reacción en el sitio de inyección, infección, insuficiencia cardíaca congestiva, desmielinización). Con respecto a los agentes inmunosupresores, la pérdida de respuesta y/o intolerancia significa que los síntomas de la enfermedad activa persisten a pesar del tratamiento previo con uno o más de azatioprina ($\geq 1,5$ mg/kg) o dosis equivalente de 6-mercaptopurina en mg/kg ($\geq 0,75$ mg/kg) o metotrexato, 25 mg s.c./intramuscular (o según se indique) a la semana durante al menos 8 semanas; o antecedentes de intolerancia de al menos un inmunosupresor (incluyendo, pero sin excluir y sin limitarse a, pancreatitis, fiebre medicamentosa, erupción, náuseas/vómitos, elevación en la prueba de función hepática, mutación genética de tiopurina S-metiltransferasa, infección).

La aleatorización al tratamiento del estudio se estratificó por el tratamiento concomitante con corticoesteroides (sí/no), el tratamiento concomitante con inmunosupresores (sí/no), la exposición previa a anti-TNF (sí/no) (excepto los pacientes aleatorizados en los Estados Unidos) y el centro del estudio.

La actividad de la enfermedad CU se evaluó utilizando la MCS en la selección (y esta se consideró la MCS de referencia), la semana 6 (2 semanas después de la administración en la semana 4) y la semana 10 (2 semanas después de la dosis final del fármaco del estudio). Las biopsias de colon se obtuvieron durante la sigmoidoscopia flexible realizada en estos mismos puntos temporales. También se recogieron MCS parciales a lo largo del estudio. Los resultados comunicados por los pacientes (PRO) también se evaluaron utilizando un cuestionario abreviado de la enfermedad inflamatoria intestinal (SIBDQ) y la MCS, que los pacientes debían completar el día 1 y en las semanas 6 y 10. Además, la actividad de la enfermedad, los síntomas diarios y el impacto de la CU se recopilaron en un diario del paciente, que los pacientes debían completar diariamente desde la selección (aproximadamente 7 días antes y hasta el día 1) y al menos 7 días antes y hasta las visitas de estudio en las semanas 6 y 10. También se obtuvieron muestras de suero y fecales para el análisis de biomarcadores. Las heces se obtuvieron en la selección y en las semanas 6, 10 y 28 para la medición de biomarcadores. Los biomarcadores ejemplares que se consideraron para la medición incluyen, pero no se limitan a, lipocalina, calprotectina y lactoferrina. El suero y el plasma se obtuvieron en la selección, el día 1 y en las semanas 4, 6, 10, 16 y 28 para la medición de biomarcadores exploratorios.

El criterio principal de valoración de la eficacia para este estudio fue la proporción de pacientes que lograron una remisión clínica, definida como una reducción absoluta en la MCS a ≤ 2 sin subpuntuación individual superior a 1 punto, en la semana 10. Los criterios secundarios de valoración adicionales se enumeran en los criterios de valoración del estudio como se describe a continuación.

Criterios de valoración

Criterio principal de valoración de la eficacia

5 El criterio principal de valoración de la eficacia fue la remisión clínica en la semana 10. La remisión clínica se define por una MCS ≤ 2 sin una subpuntuación individual superior a 1 punto (véase la tabla 1).

Criterios secundarios de valoración de la eficacia

10 Los criterios secundarios de valoración de la eficacia para este estudio fueron: (1) respuesta clínica en la semana 6 y en la semana 10, donde la respuesta clínica se definió por al menos una disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de ≥ 1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o la puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1; (2) remisión clínica (definida anteriormente) en la semana 6; y (3) un indicador para la puntuación endoscópica y puntuación de hemorragia rectal de 0 en la semana 6 y en la semana 10.

15 Criterios de valoración exploratorios

20 El criterio de valoración exploratorio para este estudio fue el tiempo transcurrido hasta el brote de CU en pacientes que lograron respuesta o remisión. Para este criterio de valoración, un brote se define como un incremento de 2 puntos en la MCS parcial acompañado de 3 días de hemorragia rectal continua y una puntuación endoscópica de 2 en la sigmoidoscopia flexible.

Criterios de valoración de la seguridad

25 La seguridad y la tolerabilidad de rhuMAb Beta7 se evaluaron usando las siguientes medidas: (1) Incidencia de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves clasificados de acuerdo con los criterios de terminología comunes para acontecimientos adversos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI CTCAE), versión 4.0; (2) cambios clínicamente significativos en las constantes vitales y análisis clínicos de seguridad; (3) retiradas debido a acontecimiento(s) adverso(s); (4) incidencia y naturaleza de las reacciones en el sitio de inyección e hipersensibilidad; (5) incidencia de complicaciones infecciosas; y (6) inmunogenicidad medida por la incidencia de ATA.

Criterios de valoración farmacocinéticos

35 Los criterios de valoración farmacocinéticos incluyeron lo siguiente: (1) $C_{m\acute{a}x}$ después de la primera y última dosis; (2) tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$) después de la primera y última dosis; (3) área bajo la curva de concentración sérica en el tiempo (AUC) dentro de un intervalo de dosis después de la dosis final; (4) AUC desde el tiempo 0 hasta el tiempo de la última observación detectable (AUC_{ult}) o hasta el infinito (AUC_{inf}); (5) aclaramiento aparente (CL/F); (6) volumen aparente de distribución (V/F); y (7) semivida de eliminación ($t_{1/2}$).

40 **EJEMPLO 2 - Estudios y análisis de biomarcadores predictivos**

Fundamento para la selección de los biomarcadores predictivos integrina beta7 y CD3 épsilon para el enriquecimiento de la eficacia en pacientes tratados con etrolizumab

45 Como se analiza anteriormente, el etrolizumab se une a la integrina $\beta 7$ y bloquea la unión a MAdCAM1, que se expresa en las células endoteliales de la mucosa. La unión de los linfocitos que expresan la integrina $\beta 7$ a MAdCAM1 desempeña una función importante en la migración de las células al intestino delgado, los folículos linfoides del intestino grueso y los ganglios linfáticos mesentéricos. Se plantea la hipótesis de que debido a que se cree que la migración incrementada de los linfocitos de migración dirigida al intestino por medio de interacciones de $\alpha 4\beta 7$:MAdCAM impulsan la inflamación continua en la CU, los pacientes con pruebas de una migración dirigida incrementada de los linfocitos al intestino se beneficiarían del tratamiento con etrolizumab. Por tanto, se seleccionaron marcadores de diagnóstico predictivos que medían la actividad de los linfocitos y/o de la vía de $\beta 7$:MAdCAM1 para detectar una eficacia incrementada en pacientes que pueden tener una enfermedad fuertemente impulsada por la migración y la presencia de linfocitos en el tejido enfermo.

55 Los marcadores de diagnóstico predictivos candidatos integrina beta7 y CD3 épsilon se preseleccionaron antes del análisis de los resultados de eficacia clínica. La expresión en la biopsia de CD3 ϵ , que es un componente del complejo de señalización del receptor de linfocitos T-CD3, se eligió como un biomarcador predictivo potencial debido a su expresión relativamente exclusiva en los linfocitos T, que puede impulsar la enfermedad en el intestino. Además, la integrina $\beta 7$ se expresa en linfocitos y células dendríticas y otros tipos de células. Como se predice en los estudios preclínicos y clínicos de fase I, se debe bloquear el transporte de estas células que expresan $\beta 7$ al intestino en pacientes tratados con etrolizumab. En consecuencia, se intentó determinar si los niveles de integrina $\beta 7$ en biopsias y/o en sangre periférica eran predictivos de la respuesta al tratamiento con etrolizumab.

60

65

Recogida y procesamiento de tejido de biopsia intestinal

Se obtuvieron biopsias intestinales de los participantes del estudio durante la sigmoidoscopia flexible/colonoscopia completa en la visita de selección (hasta 4 semanas antes del tratamiento). Se realizaron biopsias de la zona más inflamada del colon a 10-40 cm del borde anal. Se evitaron las biopsias en zonas necrosadas de mucosa ulcerada o en sitios de sutura en pacientes con resección colónica previa. Las piezas de biopsia se colocaron en un tampón estabilizador de ARN tisular (RNAlater, Qiagen, Cat. n.º 76104) y se congelaron para su envío. Al recibir las muestras, las muestras de biopsia se descongelaron y homogeneizaron con microesferas de acero de 3 mm usando un TissueLyzer (Qiagen, Cat. n.º 69989) y se aisló el ARN usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Cat. n.º 74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se evaluó la integridad del ARN con el bioanalizador Agilent 2100 usando el kit Pico Agilent RNA 6000 (Agilent Technologies, Cat. n.º 5067-1513). Las muestras con baja calidad de ARN (RIN ≤ 5) se excluyeron del análisis. El ARN se retrotranscribió en ADNc usando el kit de RT de alta capacidad ABI (Life Technologies, Cat. n.º 4368814). Los niveles de expresión génica (es decir, los niveles de ARN) se evaluaron mediante PCR en tiempo real, también denominada PCR cuantitativa o qPCR. Las reacciones de PCR en tiempo real se ejecutaron en el sistema HD BioMark™ con la mezcla general de preamplificación Fluidigm (Life Technologies, Cat. n.º 4391128) y reactivos (Fluidigm, Cat. n.º BMK-M10-96.96) usando CD3 ϵ humano (Cat. n.º Hs00167894_m1), α E (Cat. n.º Hs01025372_m1), β 7 (Cat. n.º Hs01565750_m1) y conjuntos de cebadores de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Cat. n.º Hs99999905_m1) (todos de Applied Biosystems [Life Technologies]) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de CD3 ϵ , α E y β 7 se normalizó a la expresión de GAPDH usando el procedimiento de δ CT descrito previamente.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las figs. 3A-C (expresión génica de β 7) y 4A-C (expresión génica de CD3 ϵ). En cada gráfico de barras, la expresión génica baja (por debajo de la mediana para la población de pacientes del estudio de fase II) se muestra en la mitad izquierda del gráfico para placebo, 100 mg/dosis de etrolizumab y 300 mg/dosis de etrolizumab y la expresión génica alta (por encima de la mediana para la población de pacientes del estudio de fase II) se muestra en la mitad derecha del gráfico para placebo, 100 mg/dosis de etrolizumab y 300 mg/dosis de etrolizumab. Tanto para la expresión génica de beta7 como para la expresión de CD3 ϵ en el valor de referencia (también denominado de selección, es decir, antes de la primera administración del fármaco o placebo), se evaluó el porcentaje de pacientes que habían alcanzado una respuesta clínica (figs. 3C y 4C; definida como una disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de ≥ 1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1), cicatrización de la mucosa (figs. 3B y 4B; definida como una subpuntuación endoscópica de 0 o 1) o remisión (figs. 3A y 4A; definida como una MCS ≤ 2 sin subpuntuación individual > 1) en la semana 10 en el estudio clínico descrito anteriormente. Todos los valores de los que informó (números por encima de las barras) se corrigieron por la respuesta al placebo en las poblaciones de beta7 alto y beta7 bajo (fig. 3A-C) y las poblaciones de CD3 ϵ alto y CD3 ϵ bajo (fig. 4A-C).

Como se puede observar en la fig. 3A-C, los pacientes con niveles altos de expresión génica de beta7 en el valor de referencia mostraron una respuesta más alta corregida por placebo al tratamiento con 100 mg/dosis de etrolizumab, medida por los tres criterios de valoración de (i) remisión (un 31 % de beta7 alto frente a un 18 % de beta7 bajo), (ii) cicatrización de la mucosa (un 37 % de beta7 alto frente a un 1 % de beta7 bajo), y (iii) respuesta clínica (un 29 % de beta7 alto frente a un -3 % de beta7 bajo). Este beneficio clínico enriquecido no se observó con los 300 mg/dosis de etrolizumab para la cicatrización de la mucosa (un 14 % de beta7 alto frente a un 16 % de beta7 bajo) y los criterios de valoración de remisión (un 7 % de beta7 alto frente a un 20 % de beta7 bajo), pero se observó para el criterio de valoración de respuesta clínica (un 21 % de beta7 alto frente a un -1 % de beta7 bajo). De forma similar, los pacientes con niveles altos de expresión génica de CD3 ϵ en el valor de referencia mostraron una respuesta más alta corregida por placebo al tratamiento con 100 mg/dosis de etrolizumab (pero no 300 mg/dosis de etrolizumab) medida por los tres criterios de valoración de respuesta clínica (un 36 % de CD3 ϵ alto frente a un -6 % de CD3 ϵ bajo a 100 mg/dosis; un 10 % de CD3 ϵ alto frente a un 9 % de CD3 ϵ bajo a 300 mg/dosis), cicatrización de la mucosa (un 36 % de CD3 ϵ alto frente a un 5 % de CD3 ϵ bajo a 100 mg/dosis; un 12 % de CD3 ϵ alto frente a un 21 % de CD3 ϵ bajo a 300 mg/dosis), y remisión (un 36 % de CD3 ϵ alto frente a un 15 % de CD3 ϵ bajo a 100 mg/dosis; un 13 % de CD3 ϵ alto frente a un 15 % de CD3 ϵ bajo a 300 mg/dosis). En consecuencia, estos resultados demuestran que los niveles más altos que la mediana de la expresión génica de beta7 y/o la expresión génica de CD3 ϵ en las biopsias intestinales de zonas inflamadas del colon se asocian con un mayor beneficio clínico del tratamiento con etrolizumab, y este beneficio clínico es mayor cuando se administra etrolizumab a 100 mg/dosis. Por tanto, los niveles más altos que la mediana de la expresión génica de beta7 y/o la expresión génica de CD3 ϵ en las biopsias intestinales de zonas inflamadas del colon muestran un potencial como biomarcadores predictivos para identificar a los pacientes con CU que tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con agentes terapéuticos dirigidos a la subunidad de integrina beta7, incluyendo etrolizumab.

En determinados casos, son deseables procedimientos menos invasivos que la obtención de biopsias intestinales. Los procedimientos de evaluación de los niveles de expresión génica en la sangre periférica son ejemplos de dichos procedimientos menos invasivos. Por tanto, se intentó determinar si el beneficio clínico enriquecido observado en pacientes tratados con etrolizumab que tenían niveles más altos que la mediana de la expresión génica de beta7 en el tejido de la biopsia intestinal también se podría observar evaluando los niveles de expresión génica de beta7 en muestras de sangre periférica.

En un ensayo de fase I, se había observado que los pacientes que expresaron niveles altos de beta7 en células CD3+ mediante el análisis FACS parecieron responder mejor al tratamiento con etrolizumab (datos no mostrados) que los pacientes que tenían niveles bajos de beta7 en células CD3+. En ese ensayo, no se había recogido sangre periférica para el análisis de ARN y, por tanto, no se pudieron analizar esas muestras en busca de correlaciones entre los niveles del ARN de beta7 y los niveles de proteína beta7 y la respuesta a etrolizumab. Por tanto, antes de analizar las muestras de pacientes del ensayo de fase II, se intentó determinar si los niveles de expresión génica de beta7 (niveles de ARN) se correlacionaban con los niveles de expresión de la proteína beta7 en células CD3+ y en otras poblaciones de células sanguíneas en muestras de pacientes con EII no incluidos en el ensayo de fase II y de sujetos de control sanos.

Para los experimentos descritos a continuación, se extrajo sangre completa de acuerdo con los procedimientos estándar; la sangre para los estudios de ARN se recogió en tubos PAXgene de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para el análisis FACS, los anticuerpos se obtuvieron de Becton Dickenson (véase la tabla 2). Las células de muestras de sangre periférica se incubaron con anticuerpos marcados de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica y se analizaron en una máquina FACSCalibur. La expresión de Beta7 se cuantificó utilizando microesferas de PE-MESF Quantum (Bangs Laboratory, Cat. n.º 827). También se determinó que la expresión de beta7 mediante análisis FACS era óptima cuando las muestras de pacientes se enviaron y/o almacenaron durante la noche a temperatura ambiente antes de realizar los análisis FACS.

Tabla 2. Anticuerpos usados para los análisis FACS.

	Conjugado	Catálogo de BD n.º
Beta7	PE	555945
CD45RA	FITC	347723
CD19	FITC	555412
CD27	APC	558664
CD3	APC	340440
CD3	FITC	555332
CD3	PE	347347
CD4	PerCP Cy5.5	341654
IgD	PerCP Cy5.5	561315
isotipo IgG1 de ratón	FITC	556649
isotipo IgG1 de ratón	APC	550854
isotipo IgG2a de ratón	FITC	554647
isotipo IgG2a de ratón	PerCP Cy5.5	552577
isotipo IgG1 de ratón	PerCP Cy5.5	550795
isotipo IgG2a de rata	PE	555844

Para qPCR, se generó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript Select de BioRad (Cat. n.º 170-8897) de acuerdo con el protocolo del fabricante y a continuación se realizó la qPCR con los análisis ABI Taqman para integrina beta7, CD3 épsilon, CD20 (Cat. n.º Hs00544819_m1), CD45 (Cat. n.º Hs04189704_m1) y GAPDH de acuerdo con el protocolo del fabricante. La fig. 5 muestra una curva que correlaciona estos análisis FACS y las mediciones de qPCR. Como se puede observar en la fig. 5, los niveles del ARN de beta7 medidos por qPCR no se correlacionaban con los niveles de proteína beta7 en linfocitos T CD3+ o en linfocitos B CD19+. Sin embargo, los niveles de proteína beta7 en los linfocitos se correlacionaban significativamente con los niveles del ARN de beta7 normalizados a los niveles del gen constitutivo de GAPDH o los niveles del ARN de CD45. Véase la fig. 5, cuadrados en recuadro, correlaciones estadísticas (se indican los valores *r* y *p* de Spearman). En consecuencia, se determinó que la expresión génica de beta7 (niveles de ARN) en sangre periférica (sangre completa recogida en tubos PAXgene) se podía detectar y cuantificar de forma fiable mediante qPCR.

A continuación, se analizó la expresión génica de beta7 en la sangre periférica de pacientes tratados con etrolizumab de acuerdo con el protocolo de fase II descrito anteriormente y se buscaron asociaciones entre los niveles de ARN de beta7 en sangre periférica y los criterios de valoración de la eficacia.

Se aisló el ARN total de tubos de sangre PAXgene congelados mediante aislamiento automatizado en un separador de partículas magnéticas KingFisher. En resumen, se dejaron descongelar los tubos durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de centrifugación y lavado para recoger los sedimentos de glóbulos blancos, se lisaron las células en un tampón que contenía guanidinio. La extracción orgánica se realizó antes de añadir el tampón de unión y las microesferas magnéticas en preparación para la ejecución de KingFisher. El procedimiento se optimizó para la retención de microARN e incluyó una etapa de tratamiento con DNasa y una limpieza antes de la elución de las microesferas magnéticas. La pureza y la cantidad de las muestras de ARN total se determinaron mediante lecturas

de absorbancia a 260 y 280 nm usando un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000. La integridad del ARN total se calificó por electroforesis de microfluidos Agilent Bioanalyzer 2100, usando el sistema Nano Assay y el Caliper LabChip.

5 El ARN total (hasta 2 µg) se retrotranscribió durante una hora en un volumen de reacción total de 20 µl usando el kit de síntesis de ADNc de alta capacidad TaqMan® (Applied Biosystems [Life Technologies]) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR rápidas en tiempo real se ejecutaron en un sistema de PCR en tiempo real Viia™ 7 (Applied Biosystems [Life Technologies]) usando los conjuntos de cebadores de β7 y GAPDH humanos (Applied Biosystems [Life Technologies]) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de
10 beta7 se normalizó a la expresión de GAPDH.

Los resultados son visibles en las figs. 6A-C. Los pacientes con niveles altos de expresión génica de beta7 en sangre periférica en el valor de referencia mostraron una mayor respuesta corregida por placebo al tratamiento con 100 mg/dosis de etrolizumab para el criterio de valoración de cicatrización de la mucosa (un 30 % de beta7 alto frente a un 3 % de beta7 bajo) (fig. 6B) y el criterio de valoración de remisión (un 42 % de beta7 alto frente a un 11 % de beta7 bajo) (fig. 6A). Los pacientes que expresaban beta7 alto en el grupo de 100 mg/dosis de etrolizumab también mostraron una mayor respuesta al tratamiento con etrolizumab que los pacientes que expresaban niveles bajos de beta7 para el criterio de valoración de respuesta clínica, pero estos resultados no se corrigieron con placebo (fig. 6C). El beneficio clínico enriquecido observado en pacientes con niveles altos de beta 7 en el grupo de 20 100 mg/dosis no se observó con los 300 mg/dosis de etrolizumab para la cicatrización de la mucosa (fig. 6B) y los criterios de valoración de respuesta clínica (fig. 6C), pero se observó para el criterio de valoración de remisión (fig. 6A), aunque la magnitud de la diferencia entre los pacientes con niveles altos de beta 7 y los pacientes con niveles bajos de beta 7 fue baja. En consecuencia, estos resultados demuestran que los niveles más altos que la mediana de la expresión génica de beta7 en la sangre periférica se asocian con un mayor beneficio clínico del tratamiento con etrolizumab, y este beneficio clínico es mayor cuando se administra etrolizumab a 100 mg/dosis. Por tanto, niveles más altos que la mediana de la expresión génica de beta7 en sangre periférica muestran potencial como biomarcador predictivo para identificar pacientes con EII, tales como los pacientes con CU y con enfermedad de Crohn, que probablemente se beneficien del tratamiento con agentes terapéuticos dirigidos a la subunidad de
25 integrina beta7, incluyendo etrolizumab.

30 Fundamento para la selección del biomarcador predictivo integrina alfaE para el enriquecimiento de la eficacia en pacientes tratados con etrolizumab

El etrolizumab se une a la integrina β7 y bloquea la unión tanto a MAdCAM1, que se expresa en las células endoteliales de la mucosa, como a la E-cadherina, que se expresa en las células epiteliales. La unión de los linfocitos que expresan integrina αEβ7 a la E-cadherina puede ayudar a posicionar y retener células colindantes con el epitelio intestinal. Se plantea la hipótesis de que la unión de αEβ7:E-cadherina también puede ser importante en la inflamación continua en la CU y, por lo tanto, los pacientes con pruebas de linfocitos αEβ7+ incrementados se beneficiarían del tratamiento con etrolizumab. Por tanto, se ampliaron los marcadores de diagnóstico predictivos para incluir αE en los marcadores de la vía de β7 para detectar una eficacia incrementada en pacientes que pueden tener una enfermedad fuertemente impulsada por la migración y presencia de linfocitos en el tejido enfermo. En consecuencia, se intentó determinar si los niveles de integrina αE en biopsias y/o en sangre periférica eran predictivos de la respuesta al tratamiento con etrolizumab.

45 Se recogieron piezas de biopsias intestinales, se colocaron en RNAlater y se procesaron como se describe anteriormente. Se obtuvieron piezas de biopsia adicionales, se colocaron en formol y se almacenaron hasta el envío. Tras la recepción, el segundo conjunto de muestras de biopsia se incluyó en bloques de parafina. Para los estudios descritos en esta sección, se realizaron biopsias intestinales durante el ensayo de fase II descrito anteriormente o se obtuvieron de otras fuentes donde se recogieron muestras de pacientes que se sometieron a procedimientos de
50 biopsia intestinal por razones no relacionadas con el ensayo de fase II descrito anteriormente. Los bloques de parafina se procesaron en secciones de 4 µm y se colocaron en portaobjetos de vidrio. La tinción se realizó en un teñidor automático Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ). El pretratamiento se realizó con acondicionamiento celular 1 durante el tiempo recomendado. El anticuerpo primario, anti-αE (monoclonal de conejo EPR4166 (2), Cat. n.º ab 129202, Abcam, Cambridge, MA) se usó a una concentración de 1,896 µg/ml y se incubó en portaobjetos durante 60 minutos a 37 °C. Esta etapa estuvo seguida de la incubación de los portaobjetos con Ventana Ultraview (Ventana Medical Systems; AZ). Se usaron DAB de Ventana y hematoxilina II para la detección cromogénica y la contratinción.

60 Como se muestra en la fig. 7, la inmunohistoquímica para αE demostró tinción de células redondas pequeñas que probablemente sean linfocitos. La mayoría de estas células estaban colindantes o asociadas con criptas de células epiteliales en el colon (fig. 7A, paneles de la izquierda) y dentro de las vellosidades en el intestino delgado (fig. 7A, paneles de la derecha). También se observó asociación con el epitelio de superficie (datos no mostrados). También se observó una subpoblación de células más grandes con tinción más difusa y podría representar células dendríticas. Se contaron las células αE+ en secciones teñidas de un panel de muestras de tejido de colon, íleon y yeyuno de pacientes sin EII. Se usaron recuentos automatizados informatizados para contar las células αE+ en los portaobjetos teñidos; el análisis se limitó a las células que mostraban simetría radial en la zona de la mucosa de la
65

sección del tejido. Se observaron mayores números de células $\alpha E+$ por células totales en yeyuno e íleon en comparación con muestras de tejido colónico (fig. 7B). También se observaron mayores números de células $\alpha E+$ como un porcentaje de las células totales en muestras de íleon y yeyuno de pacientes con EC (fig. 7B). Finalmente, no se observaron diferencias entre las células $\alpha E+$ como un porcentaje de células totales en muestras de tejido de

5 pacientes con EII en comparación con pacientes sin EII. La expresión génica de αE normalizada a GAPDH también se realizó en muestras de colon sin EII y CU, y colon, íleon y yeyuno con EC (fig. 1C). Nuevamente, se observó un aumento de la expresión génica de αE en el intestino delgado y no se observaron diferencias entre las muestras de tejido con EII y sin EII.

10 El intestino delgado es de particular interés en la EC, ya que la mayoría (un 50-60 %) de los pacientes con EC tienen una enfermedad que incluye el íleon terminal. Los niveles superiores tanto de las células $\alpha E+$ como de la expresión génica de αE en muestras de intestino delgado pueden indicar que estas células desempeñan una función clave en la patobiología de la EC y su abundancia relativa puede servir como un marcador predictivo en pacientes con EC para el tratamiento con etrolizumab. Las células alfaE+, junto con la expresión génica de alfaE, en las

15 muestras de biopsia de la selección se consideraron biomarcadores predictivos potenciales en el estudio de fase II de etrolizumab en la CU (descrito anteriormente).

Las biopsias de tejido de la selección fijadas con formol incluidas en bloques de parafina de los pacientes incluidos en el estudio de fase II se seccionaron y tiñeron para la detección de αE mediante inmunohistoquímica y se contaron como se detalla anteriormente. Las biopsias de la selección en pacientes incluidos con muestras de tejido disponibles se usaron para establecer una mediana de células $\alpha E+$ por valor de corte de células totales (fig. 7D (donde los puntos punteados representan niveles en la selección en pacientes tratados con etrolizumab que entraron en remisión, los puntos vacíos representan pacientes que no consiguieron remisión y los puntos negros representan pacientes que recibieron placebo; la línea discontinua indica la mediana; también se muestran los no

20 tratados previamente con TNF y los que tienen respuesta inadecuada a TNF [RI-TNF]). La fig. 7E muestra ejemplos de tinción de αE en las biopsias de la selección de pacientes incluidos en el estudio de fase II que tenían niveles de células $\alpha E+$ por células totales que estaban por encima de (αE alto) y por debajo (αE bajo) de la mediana. La distribución de la expresión génica de αE en las biopsias de la selección de pacientes incluidos en el estudio de fase II se muestra en la fig. 7F y la relación de las dos medidas se muestra en la fig. 7G.

30 El comportamiento de αE determinado por la expresión génica y la inmunohistoquímica usando biopsias intestinales de pacientes se muestra en las figs. 8A-C y 8D-F, respectivamente. En estos experimentos, los pacientes no se estratificaron por el estado de TNF (no tratados previamente con TNF o RI-TNF). En cada gráfico de barras, la expresión génica o números de células $\alpha E+$ bajos (por debajo de la mediana para la población de pacientes del estudio de fase II) se muestra en la mitad izquierda del gráfico para placebo, 100 mg/dosis de etrolizumab y 300 mg/dosis de etrolizumab y la expresión génica alta (por encima de la mediana para la población de pacientes del estudio de fase II) se muestra en la mitad derecha del gráfico para placebo, 100 mg/dosis de etrolizumab y 300 mg/dosis de etrolizumab. Se muestran los datos de todos los pacientes. Tanto para la expresión génica de αE como para inmunohistoquímica en el valor de referencia (también denominado de selección, es decir, antes de la primera administración del fármaco o placebo), se evaluó el porcentaje de pacientes que habían alcanzado una respuesta clínica (fig. 8C y F; definida como una disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de >1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1), cicatrización de la mucosa (fig. 8B y E; definida como una subpuntuación endoscópica de 0 o 1) o remisión (fig. 8A y D; definida como una MCS <2 sin subpuntuación individual >1) en la semana 10 en el estudio clínico descrito anteriormente. Todos los valores presentados (números por encima de las

35 40 45 barras) representan el número de pacientes que lograron este criterio de valoración (numerador) respecto al número de pacientes en cada grupo de dosis que formaron parte del análisis (denominador).

Como se puede observar en la fig. 8A-C, los pacientes con niveles altos de expresión génica de αE en la selección mostraron una respuesta más alta corregida por placebo al tratamiento con 100 mg/dosis de etrolizumab, medida por la cicatrización de la mucosa (un 19 % de αE alto frente a un 13 % de αE bajo) y remisión (un 38 % de αE alto frente a un 13 % de αE bajo). Este beneficio clínico enriquecido no se observó con los 300 mg/dosis de etrolizumab. Los pacientes con niveles altos de células $\alpha E+$ por células totales mostraron una respuesta más alta corregida por placebo al tratamiento con 100 mg/dosis de etrolizumab, medida por la cicatrización de la mucosa (fig. 8E; un 19 % de αE alto frente a un -3 % de αE bajo) y remisión (fig. 8D; un 50 % de αE alto frente a un 7 % de αE bajo). En este experimento, solo la remisión se enriqueció en pacientes a los que se administraron 300 mg/dosis con niveles altos de células $\alpha E+$ por células totales en la selección (fig. 8D; un 14 % de αE alto frente a un 9 % de αE bajo).

Las figuras 9A-F muestran resultados en pacientes no tratados previamente con TNF. Los pacientes no tratados previamente con TNF con niveles altos de expresión génica de αE en la selección mostraron una respuesta más alta corregida por placebo al tratamiento con etrolizumab de 100 mg/dosis, medida por los tres criterios de valoración de la respuesta clínica (un 28 % de αE alto frente a un 13 % de αE), cicatrización de la mucosa (un 42 % de αE alto frente a un 17 % de αE) y remisión (un 67 % de αE alto frente a un 17 % de αE bajo); solo la remisión se enriqueció en pacientes a los que se administró 300 mg/dosis de etrolizumab (un 50 % de αE alto frente a un 20 % de αE bajo a 300 mg/dosis) (fig. 9A-C). Asimismo, los pacientes no tratados previamente con TNF con niveles altos de células $\alpha E+$ por células totales en la selección mostraron una respuesta más alta corregida por placebo al tratamiento con

60 65

etrolizumab, medida por la cicatrización de la mucosa (fig. 9E; un 38 % de α E alto frente a un 25 % de α E en el grupo de 100 mg/dosis y un 46 % de α E alto frente a un 25 % de α E en el grupo de 300 mg/dosis) y remisión (fig. 9D; un 67 % de α E alto frente a un 25 % de α E en el grupo de 100 mg/dosis y un 50 % de α E alto frente a un 25 % de α E en el grupo de 300 mg/dosis).

5 Como se analiza previamente, son deseables procedimientos menos invasivos que la obtención de biopsias intestinales. Los procedimientos de evaluación de los niveles de expresión génica en la sangre periférica son ejemplos de dichos procedimientos menos invasivos. Como ya se había examinado el beneficio clínico enriquecido en pacientes tratados con etrolizumab evaluando los niveles de expresión génica de beta7 en muestras de sangre periférica completa y beta7 se puede emparejar con α 4 y α E, a continuación se usó la expresión génica de α E en la sangre periférica de la selección y el día 1 para analizar el enriquecimiento de la respuesta y la remisión. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figs. 10A-F. En estos experimentos, los pacientes no se estratificaron por el estado de TNF (no tratados previamente con TNF o RI-TNF).

15 Como se muestra en la fig. 10A, los pacientes con niveles más altos de expresión génica de α E en la sangre periférica en la selección mostraron una mayor respuesta corregida por placebo al tratamiento con etrolizumab para el criterio de valoración de remisión (fig. 10A; un 29 % de α E alto frente a un 8 % de α E bajo en el grupo de 100 mg/dosis, un 19 % de α E alto frente a un 5 % de α E bajo en el grupo de 300 mg/dosis). La expresión génica de α E también se midió el día 1 en sangre periférica y se encontró que los pacientes con α E alto en el grupo de 20 100 mg/dosis tenían una remisión incrementada (fig. 10D; un 33 % de α E alto frente a un 13 % de α E bajo) y la curación de la mucosa (fig. 10E; un 27 % de α E alto frente a un 2 % de α E bajo).

Las figuras 11A-F muestran los resultados de la expresión génica en sangre periférica en la selección o el día 1 en pacientes no tratados previamente con TNF. Los pacientes no tratados previamente con TNF con niveles altos de expresión génica de α E en sangre periférica mostraron una remisión más alta corregida por placebo al tratamiento con etrolizumab en la selección (fig. 11A; un 29 % de α E alto frente a un 8 % de α E en el grupo de 100 mg/dosis y un 40 % de α E alto frente a un 17 % de α E en el grupo de 300 mg/dosis) y el día 1 (fig. 11D; un 55 % de α E alto frente a un 20 % de α E).

30 A los pacientes incluidos en el estudio de fase II se les dio la opción de inscribirse en un estudio de extensión abierto en el que todos los pacientes recibieron 300 mg/dosis de etrolizumab cada cuatro semanas como se describe anteriormente. Los pacientes que no respondieron pudieron entrar en el estudio después de completar el periodo de tiempo de 10 semanas o en cualquier momento durante el seguimiento de seguridad. Como se muestra en la fig. 12, 33 pacientes con RI-TNF (14 en el grupo de 100 mg/dosis y 19 en el grupo de 300 mg/dosis) que recibieron el fármaco activo en el estudio de fase II, pero no tuvieron una respuesta a las 10 semanas, se incluyeron en el estudio de extensión abierto sin suspender la pauta de administración. Estos pacientes se puntuaron para la remisión después de cuatro semanas (14-16 semanas después de la primera dosis) usando la puntuación clínica parcial de la Clínica Mayo. La puntuación clínica parcial de la Clínica Mayo es una puntuación clínica de 9 puntos en la que se recogen todas las subpuntuaciones de la Clínica Mayo, excepto la subpuntuación endoscópica. La remisión se define como una puntuación total de ≤ 2 puntos y la respuesta se define como una reducción en la puntuación clínica parcial de la Clínica Mayo de referencia en un 25 % y ≥ 2 puntos.

Los pacientes con RI-TNF con niveles altos de expresión génica de α E en biopsias intestinales en la selección que no tuvieron una respuesta en el criterio principal de valoración a las 10 semanas mostraron una mayor remisión (fig. 45 13A; un 18 % de α E alto frente a un 0 % de α E bajo) y respuesta (fig. 13B; un 53 % de α E alto frente a un 8 % de α E bajo) al tratamiento continuado. Los pacientes con RI-TNF con niveles altos de células α E+ por células totales en la selección también mostraron una remisión (fig. 13C; un 22 % de α E alto frente a un 0 % de α E bajo) y respuestas más altas (fig. 13D; un 56 % de α E alto frente a un 17 % de α E bajo) al tratamiento adicional. Los pacientes con RI-TNF con niveles altos de α E en sangre periférica mostraron una respuesta más alta (fig. 13F; un 41 % de α E alto frente a un 15 % de α E bajo).

En consecuencia, estos resultados demuestran que los niveles más altos que la mediana de la expresión génica de α E o las células α E+ por células totales en las biopsias intestinales de las zonas inflamadas del colon, así como los niveles más altos que la mediana de la expresión génica de α E en sangre periférica se asociaron con un mayor beneficio clínico del tratamiento con etrolizumab en pacientes, y este beneficio clínico fue mayor cuando se administró etrolizumab a 100 mg/dosis por ruta subcutánea cada cuatro semanas. Por tanto, niveles mayores que la mediana de la expresión génica de α E o de células α E+ en las biopsias intestinales de las zonas inflamadas del colon o la expresión génica de α E en sangre periférica muestran un potencial como biomarcadores predictivos para identificar pacientes con EII, tales como pacientes con CU y con enfermedad de Crohn, con más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con agentes terapéuticos dirigidos a la subunidad de integrina beta7, incluyendo etrolizumab.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. *ET AL.*

5 <120> PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR ENFERMEDADES INFLAMATORIAS
INTESTINALES

<130> P4989R1-WO

10 <140>
<141>

<150> 61/860.422
<151> 31/07/2013

15 <150> 61/710.656
<151> 05/10/2012

<160> 31

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 11

25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 1
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 2
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

45 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 3
Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr
1 5

55 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

ES 2 738 305 T3

<400> 4
 Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn Tyr Trp Gly
 1 5 10

5 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 5
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15

15 **Ser**

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 6
 Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

30 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 7
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Leu Leu His
 1 5 10

40 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 8
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Leu Leu His
 1 5 10

50 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 9
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu Leu His
 1 5 10

60 <210> 10
 <211> 108

ES 2 738 305 T3

<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

<400> 10

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Gly Val Glu Leu
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ser Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn
85 90 95

5 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
10 <213> *Rattus* sp.

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 738 305 T3

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

10

<210> 13
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

ES 2 738 305 T3

Ser

<210> 14

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

15 <210> 15

<211> 117

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 15

ES 2 738 305 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn
 20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16
 Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

15 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 17
 Ala Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

25 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 18
 Ala Gln Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 19

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 19
Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

10 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 20
Arg Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

20 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Cualquier aminoácido

35 <400> 21
Xaa Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

40 <210> 22
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 22

ES 2 738 305 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Leu
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 23

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Leu
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 24

<211> 108

15 <212> PRT

ES 2 738 305 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

10

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 25

ES 2 738 305 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn
 20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 26
- <211> 11
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (2) . . (2)
- <223> Ala, Gly, Ser, Thr o Val
- 15

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (3) . . (3)
- <223> Ser, Gly, Ile, Lys, Asn, Pro, Gln, Arg o Thr
- 20

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4) . . (4)
- <223> Glu, Val, Gln, Ala, Asp, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn o Arg
- 25

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (5) . . (5)
- <223> Ser, Tyr, Ala, Asp, Gly, His, Ile, Lys, Asn, Pro, Arg, Thr o Val
- 30

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (6) . . (6)
- <223> Val, Arg, Ile, Ala, Gly, Lys, Leu, Met o Gln
- 35

- <220>
- <221> MOD_RES

- <222> (7) . . (7)
 <223> Asp, Val, Ser, Ala, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Ser o Thr
- 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) . . (8)
 <223> Asp, Gly, Asn, Glu, Thr, Pro o Ser
- 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) . . (9)
 <223> Leu, Tyr, Ile o Met
- 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) . . (10)
 <223> Leu, Ala, Ile, Met o Val
- 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) . . (11)
 <223> His, Tyr, Phe o Ser
- 25 <400> 26
 Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
- 30 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) . . (1)
 <223> Cualquier aminoácido
- 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) . . (4)
 <223> Ser o Asp
- 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) . . (5)
 <223> Gln o Ser
- 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) . . (6)
 <223> Ser, Asp, Leu o Arg
- 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) . . (7)
 <223> Ile, Val, Glu o Lys
- 60 <220>
 <223> véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y determinados modos de realización
- <400> 27

Xaa Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Ser
1 5

- 5 <210> 28
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (8) . . (8)
- <223> Asn, Val, Trp, Tyr, Arg, Ser, Thr, Ala, Phe, His, Ile, Leu o Met
- 15 <400> 28
- Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Xaa Thr**
1 5
- 20 <210> 29
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (2) . . (2)
- 30 <223> Tyr, Phe, Val o Asp
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (6) . . (6)
- 35 <223> Ser o Gly
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10) . . (10)
- 40 <223> Ser o Tyr
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (12) . . (12)
- 45 <223> Asn, Thr, Ala o Asp
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (13) . . (13)
- 50 <223> Pro, His, Asp o Ala
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (15) . . (15)
- 55 <223> Leu o Val
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (17) . . (17)
- 60 <223> Ser o Gly
- <400> 29

ES 2 738 305 T3

Gly Xaa Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Thr Xaa Tyr Xaa Xaa Ser Xaa Lys
 1 5 10 15

Xaa

<210> 30

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) . . (1)

<223> Puede estar presente o no

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2) . . (2)

<223> Arg, Met, Ala, Glu, Gly, Gln o Ser

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11) . . (11)

<223> Phe o Tyr

25

<400> 30

Ala Xaa Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Xaa

1 5 10

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

35

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn

20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

ES 2 738 305 T3

Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende: (i)
- 5 (a) medir el nivel de expresión del ARNm de al menos un gen en una muestra de tejido intestinal o muestra de sangre completa periférica de un paciente, en el que al menos un gen es de integrina beta7 o de integrina alfaE;
- 10 (b) comparar el nivel de expresión del ARNm medido en (a) con un nivel de referencia;
- (c) identificar que es más probable que el responda a un tratamiento que comprende el anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo cuando el nivel de expresión del ARNm medido en (a) está por encima del nivel de referencia; y
- 15 (d) administrar el tratamiento cuando el nivel de expresión del ARNm medido en (a) está por encima del nivel de referencia, tratando de este modo la enfermedad inflamatoria intestinal; o (ii)
- (a') administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que se ha determinado que una muestra de tejido intestinal o una muestra de sangre completa periférica obtenida del paciente expresa niveles de expresión del ARNm elevados de al menos un gen seleccionado de integrina beta7 e integrina alfaE; o
- 20 (b') en el que el paciente se ha seleccionado para el tratamiento en base a niveles de expresión del ARNm elevados en una muestra de tejido intestinal o muestra de sangre completa periférica obtenida de un paciente, de al menos un gen seleccionado de integrina beta7 e integrina alfaE; o (iii)
- 25 (a'') medir el número de células que expresan al menos una proteína en una muestra de tejido intestinal del paciente, en el que la al menos una proteína es integrina beta7 o integrina alfaE;
- 30 (b'') comparar el número de células de expresión medido en (a'') con un nivel de referencia;
- (c'') identificar que es más probable que el paciente responda a un tratamiento que comprende administrar un anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo cuando el número de células que expresan la proteína medido en (a'') está por encima del nivel de referencia; y
- 35 (d'') administrar el tratamiento cuando el número de células que expresan la proteína medido en (a'') está por encima del nivel de referencia, tratando de este modo la enfermedad inflamatoria intestinal;
- en el que el paciente es un ser humano.
- 40 2. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que 100 mg de anticuerpo antiintegrina beta7 se administran por ruta subcutánea una vez cada cuatro semanas.
- 45 3. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paciente tiene una respuesta inadecuada al TNF (RI-TNF).
- 50 4. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- 55 5. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa y la respuesta se selecciona de respuesta clínica, cicatrización de la mucosa y remisión.
- 60 6. El anticuerpo monoclonal de antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, con referencia a la reivindicación 1(i) o 1(ii), en el que el nivel de expresión del ARNm se mide mediante un procedimiento de PCR.
7. El anticuerpo monoclonal de antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el procedimiento de PCR comprende qPCR.
- 65 8. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(i), en el que la medición comprende amplificar uno o más de ARNm de integrina beta7 o ARNm de integrina alfaE y detectar el ARNm amplificado, midiendo de este modo el nivel de

ARNm amplificado.

- 5 9. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(i), en el que el nivel de referencia es un valor de mediana.
- 10 10. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(iii), que comprende medir el número de células con expresión mediante un procedimiento inmunohistoquímico.
- 10 11. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(iii), en el que la medición comprende poner en contacto la muestra con un agente que se une específicamente a la proteína integrina beta7 o a la proteína integrina alfaE y detectar la cantidad de complejo formado y, medir de este modo el número de células que expresan la proteína.
- 15 12. El anticuerpo monoclonal de antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(iii), en el que el número de células con expresión en la muestra se divide entre el número total de células en la muestra.
- 20 13. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(iii), en el que se determina el número de células con expresión en un campo de gran aumento en un microscopio óptico.
- 25 14. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1(iii), en el que el nivel de referencia es un valor de mediana.
- 30 15. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la administración del anticuerpo antiintegrina beta7 da como resultado uno o más de los siguientes: (1) una disminución de 3 puntos y una reducción de un 30 % respecto al valor de referencia en la MCS y una disminución de ≥ 1 punto en la subpuntuación de hemorragia rectal o puntuación de hemorragia rectal absoluta de 0 o 1, (2) una subpuntuación endoscópica de 0 o 1, (3) MCS ≤ 2 sin subpuntuación individual >1 .
- 35 16. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, en el que el anticuerpo antiintegrina beta7 se selecciona de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.
- 40 17. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el anticuerpo antiintegrina beta7 comprende seis regiones hipervariables (HVR), en las que:
- (i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos A1-A11, en la que A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1); RASESVDLLH (SEQ ID NO: 7), RASESVDTLH (SEQ ID NO: 8) o RASESVDLLH (SEQ ID NO: 9) o una variante de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 o 9 (SEQ ID NO: 26) en la que el aminoácido A2 se selecciona del grupo que consiste en A, G, S, T y V y/o el aminoácido A3 se selecciona del grupo que consiste en S, G, I, K, N, P, Q, R y T, y/o A4 se selecciona del grupo que consiste en E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N y R, y/o el aminoácido A5 se selecciona del grupo que consiste en S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T y V, y/o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste en V, R, I, A, G, K, L, M y Q, y/o el aminoácido A7 se selecciona del grupo que consiste en D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S y T, y/o el aminoácido A8 se selecciona del grupo que consiste en D, G, N, E, T, P y S, y/o el aminoácido A9 se selecciona del grupo que consiste en L, Y, I y M, y/o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste en L, A, I, M y V y/o el aminoácido A11 se selecciona del grupo que consiste en H, Y, F y S;
- (ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos B1-B8, en la que B1-B8 es KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), RYASQSIG (SEQ ID NO: 20) o XaaYASQSIG (SEQ ID NO: 21, donde Xaa representa cualquier aminoácido) o una variante de las SEQ ID NO: 2, 20 o 21 (SEQ ID NO: 27) en la que el aminoácido B1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y y Xaa (donde Xaa representa cualquier aminoácido), y/o el aminoácido B4 se selecciona del grupo que consiste en S y D, y/o el aminoácido B5 se selecciona del grupo que consiste en Q y S y/o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste en S, D, L y R, y/o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste en I, V, E y K;
- (iii) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos C1-C9, en la que C1-C9 es QQGNSLPNT (SEQ ID NO: 3) o una variante de la SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 28) en la que el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste en N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L y M;
- (iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos D1-D10 en la que D1-D10 es GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4);

- 5 (v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos E1-E17 en la que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) o una variante de la SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO: 29) en la que el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste en Y, F, V y D, y/o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste en S y G, y/o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste en S e Y, y/o el aminoácido E12 se selecciona del grupo que consiste en N, T, A y D, y/o el aminoácido 13 se selecciona del grupo que consiste en P, H, D y A, y/o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste en L y V, y/o el aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste en S y G; y
- 10 (vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos F2-F11 en la que F2-F11 es MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 19); o comprende la secuencia de aminoácidos F1-F11, en la que F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 16), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 17) o AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 18), o una variante de las SEQ ID NO: 6, 16, 17, 18 o 19 (SEQ ID NO: 30) en la que el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S y/o el aminoácido F11 se selecciona del grupo que consiste en F e Y.
- 15 18. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el anticuerpo antiintegrina beta7 comprende tres secuencias de la región hipervariable de cadena pesada (HVR-H1-H3) y tres secuencias de la región hipervariable de cadena ligera (HVR-L1-L3), en las que:
- 20 (i) HVR-L1 comprende la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9;
- (ii) HVR-L2 comprende la SEQ ID NO: 2;
- (iii) HVR-L3 comprende la SEQ ID NO: 3;
- 25 (iv) HVR-H1 comprende la SEQ ID NO: 4;
- (v) HVR-H2 comprende la SEQ ID NO: 5; y
- 30 (vi) HVR-H3 comprende la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.
19. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el anticuerpo antiintegrina beta7 comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.
- 35 20. El anticuerpo monoclonal antiintegrina beta7 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el anticuerpo antiintegrina beta7 es etrolizumab.

40

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35					
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W					
Fib504	D	V	V	M	T	Q	S	P	A	F	L	S	V	T	P	G	E	R	I	S	L	S	C	R	A	S	E	S	V	D	T	Y	L	H	W					
Injerto de	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	E	S	V	D	T	Y	L	H	W						
504K																							S	L																
hu504-5																							L																	
hu504-16																							L																	
hu504-32																							D	L																
Kabat n.º	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
huKI	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
Fib504	Y	Q	Q	K	P	N	E	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	Q	S	I	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I
Injerto de	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	Q	S	I	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I
504K																																								
Kabat n.º	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108						
huKI	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R						
Fib504	N	G	V	Z	L	E	D	L	S	I	Y	Y	C	Q	Q	G	N	S	L	P	N	T	F	G	A	G	T	X	L	E	L	K	R							
Injerto de	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	S	L	P	N	T	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R						
504K																																								

FIG. 1A

Kabat n.º 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42

hum III E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G
 Fib504 E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T G F F I T N N Y W G W I R K F P G
 Injerto de E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F F I T N N Y W G W V R Q A P G
 504K

HVR1

Kabat n.º 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a

hum III K G L E W V S Y I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R R D N S K N T L Y L Q M N
 Fib504 N K M E W M G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L N N
 Injerto de X G L E W V G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S R R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 504K
 hu504-5
 hu504-16
 hu504-32

HVR2

Kabat n.º b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a k 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

hum III S L R A E D T A V Y Y C A R G W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 13)
 Fib504 S V T T E D T A T Y Y C A M T G S S G Y F D F W G P G T M V T V S S (SEQ ID NO: 11)
 Injerto de S L R A E D T A V Y Y C A M T G S S G Y F D F W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 15)
 504K

HVR3

FIG. 1B

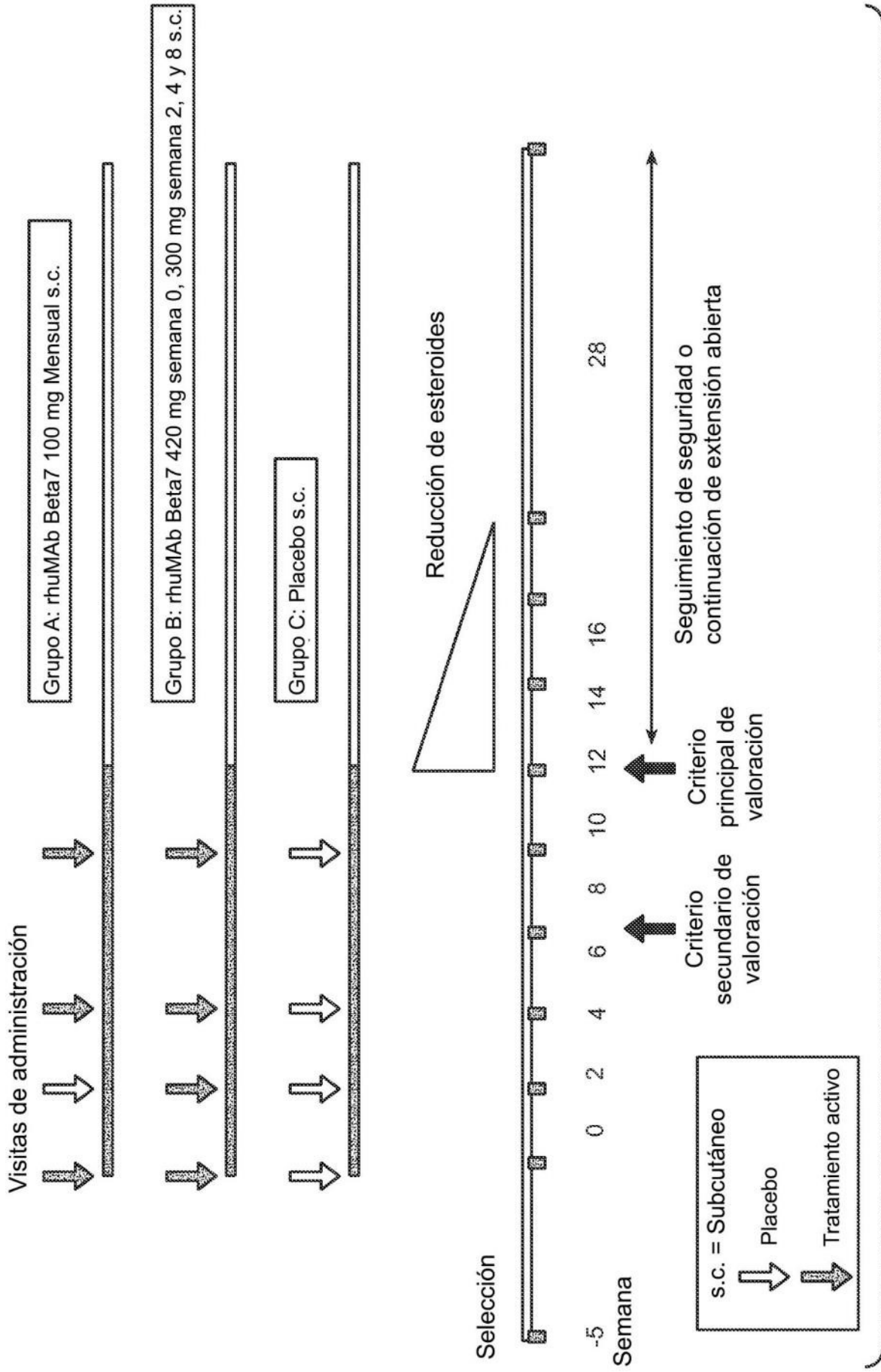


FIG. 2

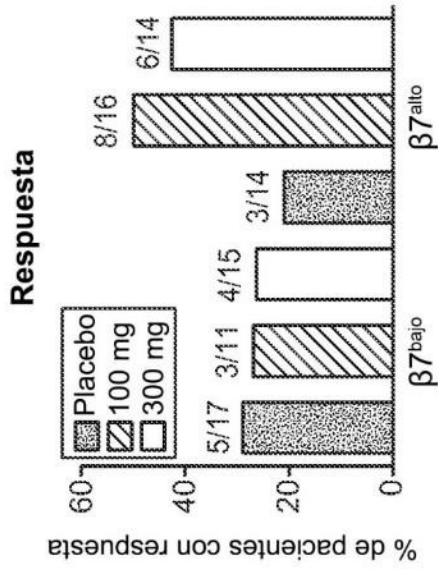


FIG. 3C

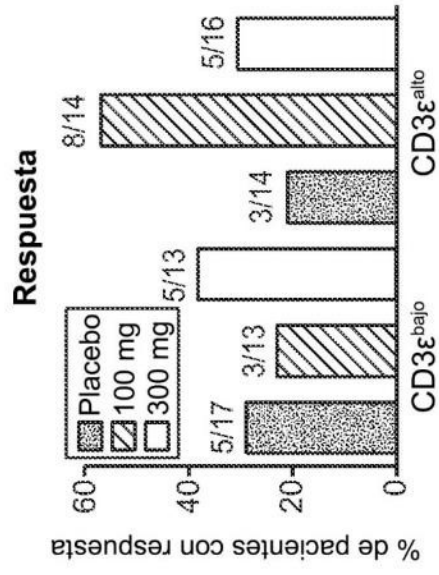


FIG. 4C

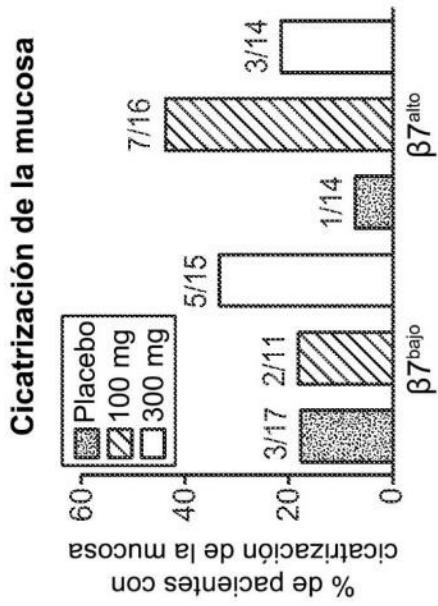


FIG. 3B

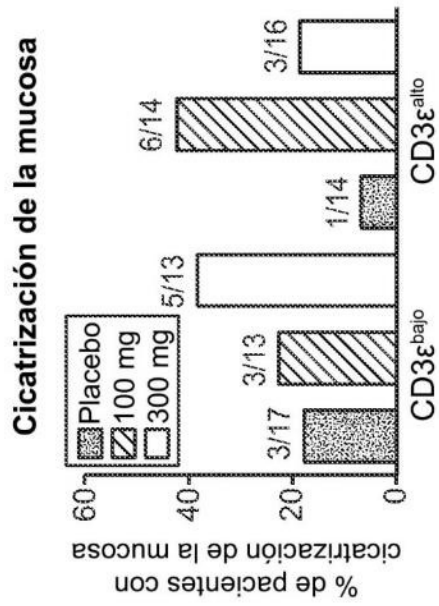


FIG. 4B

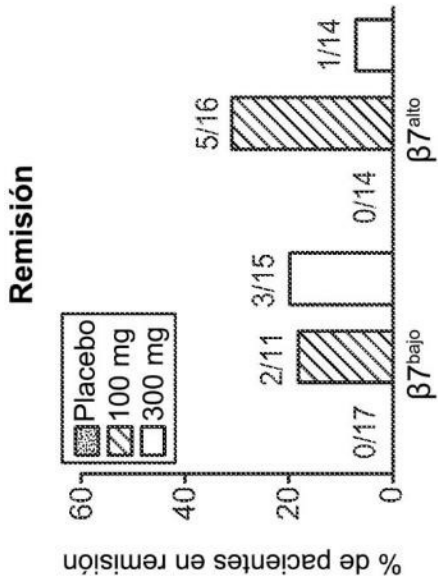


FIG. 3A

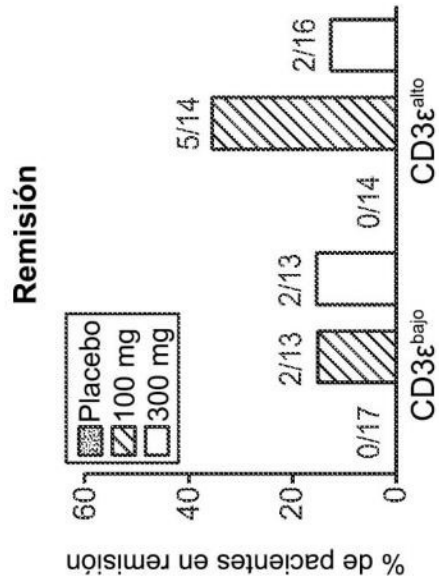


FIG. 4A

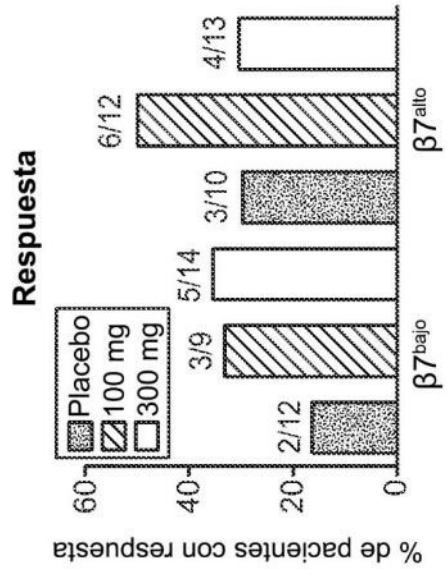


FIG. 6C

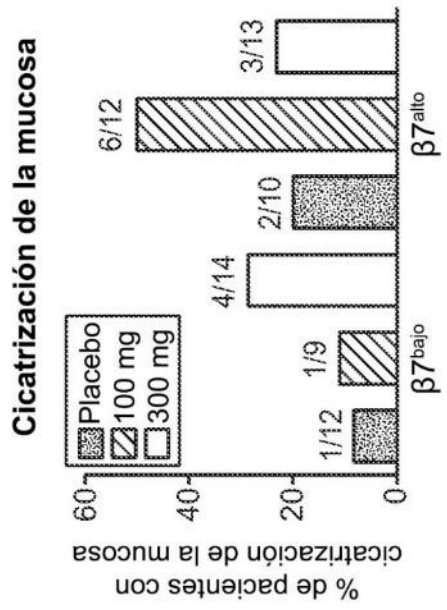


FIG. 6B

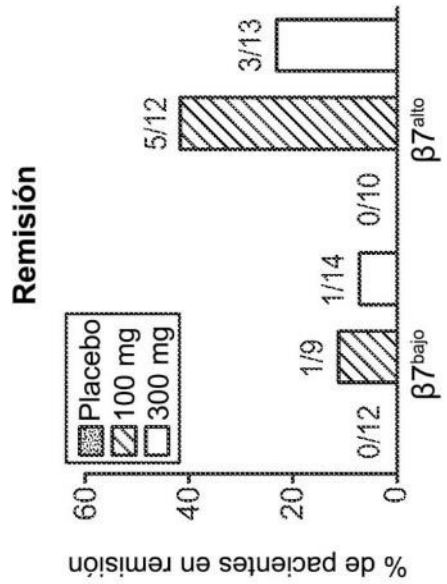


FIG. 6A

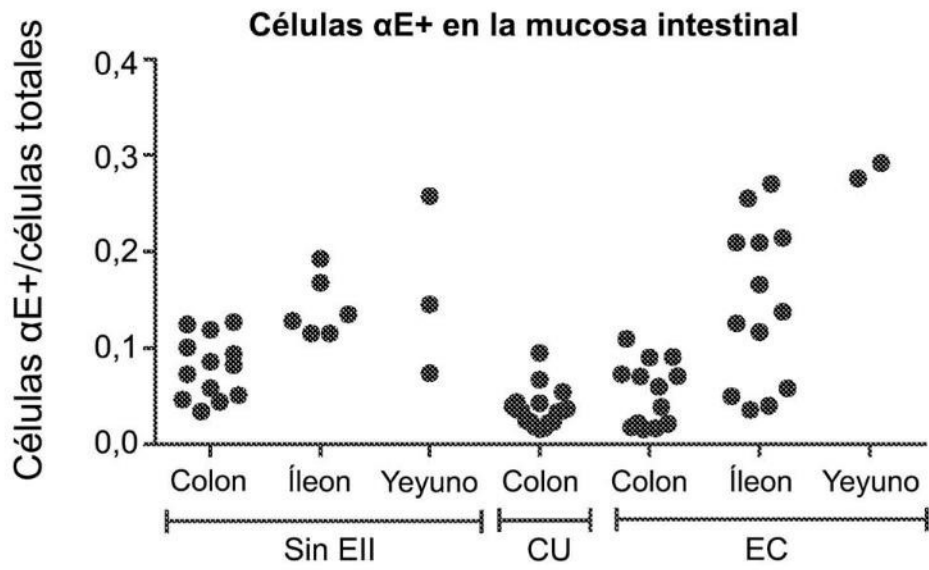
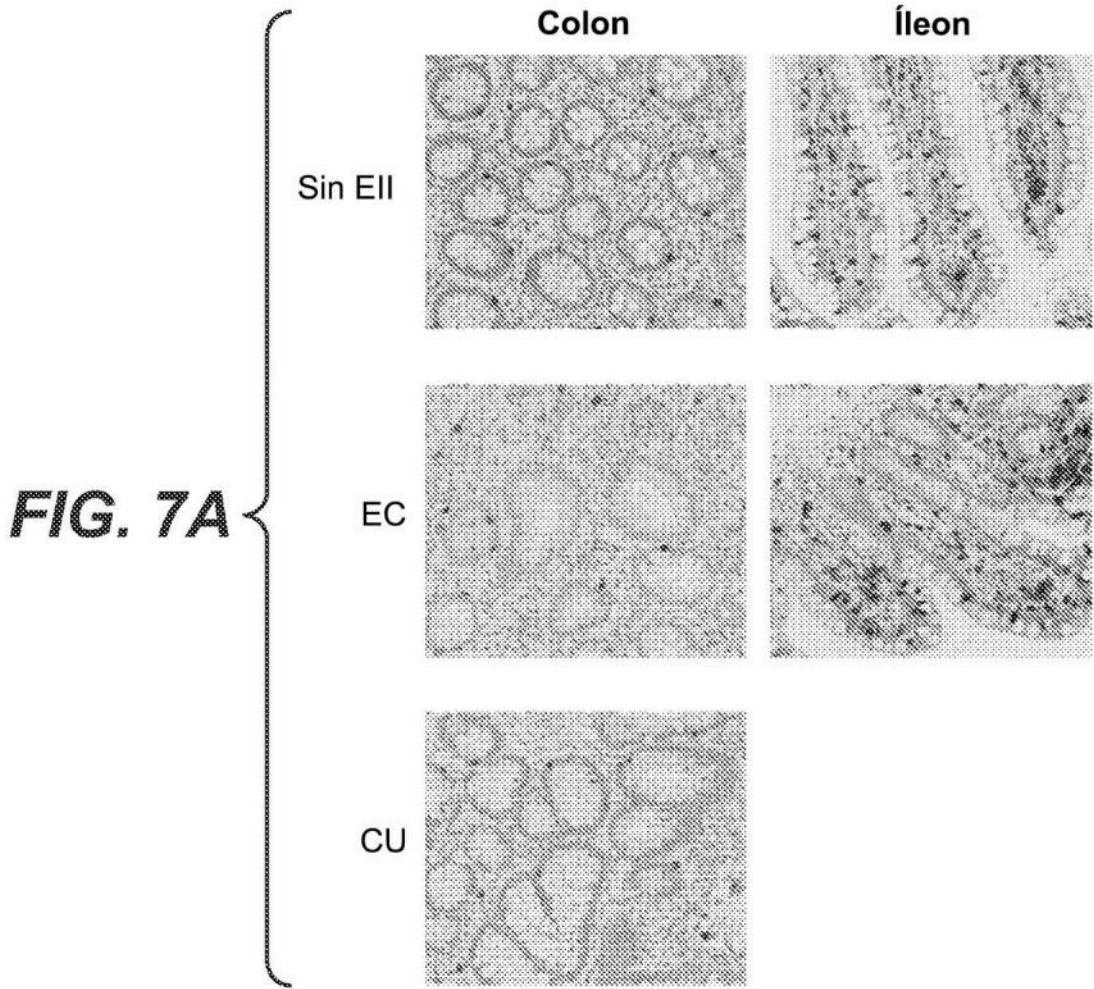


FIG. 7B

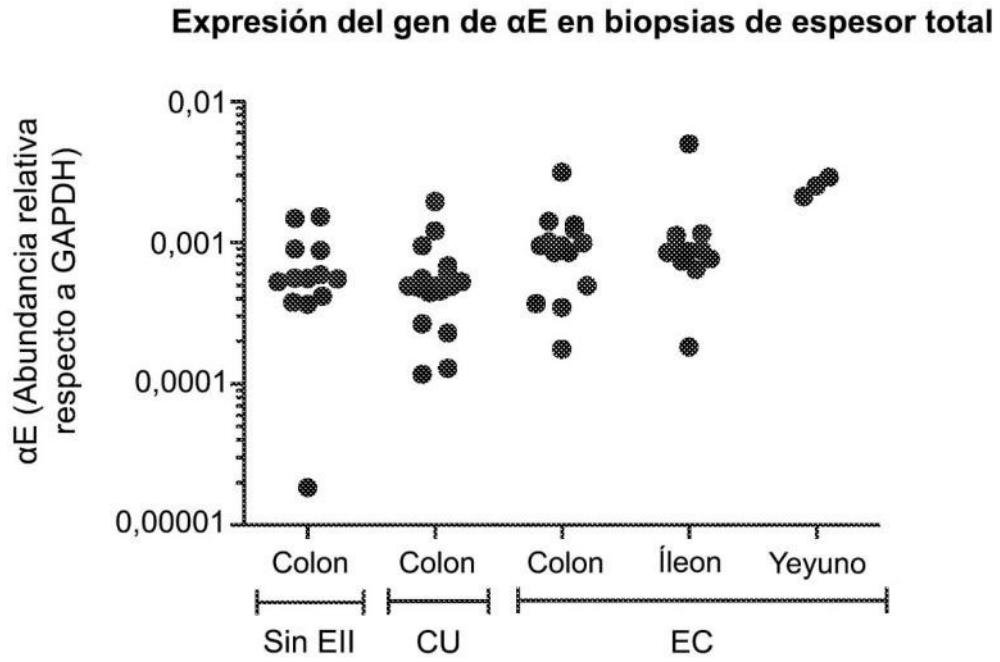


FIG. 7C

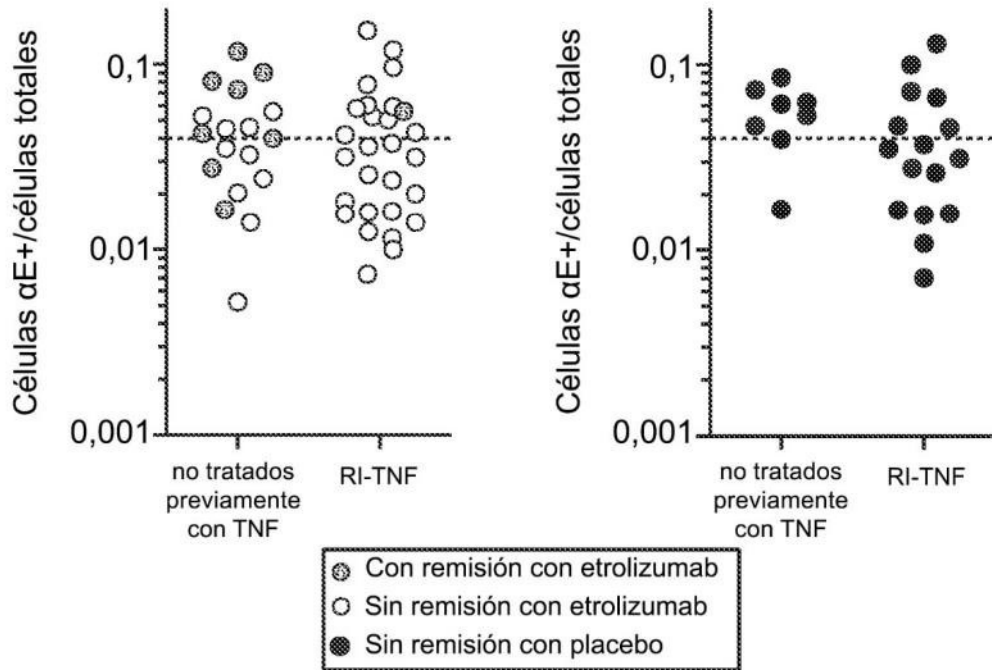


FIG. 7D

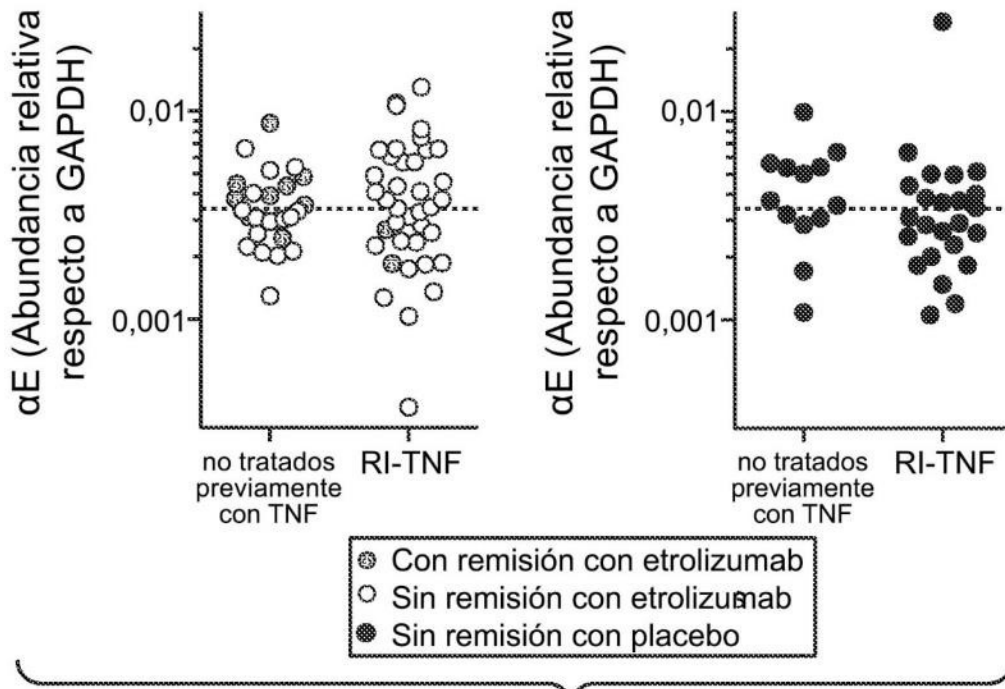
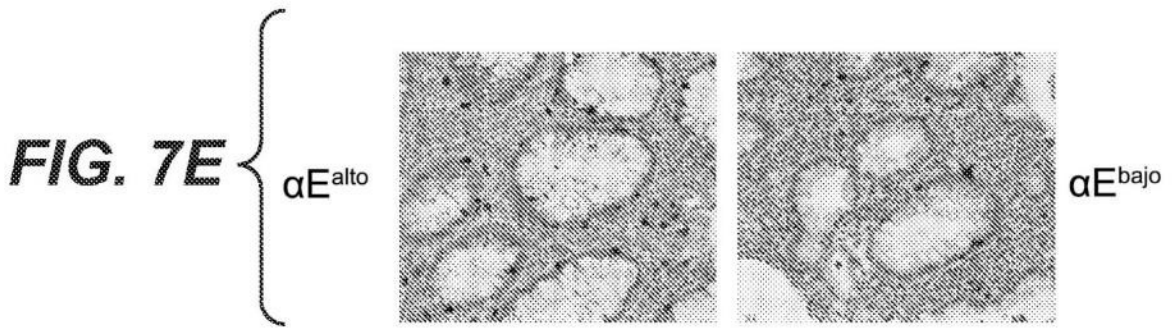


FIG. 7F

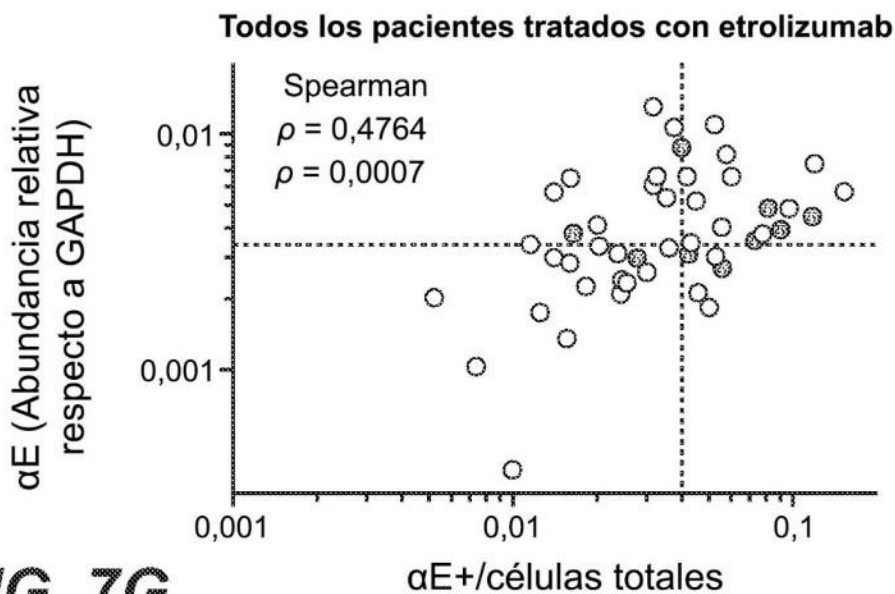


FIG. 7G

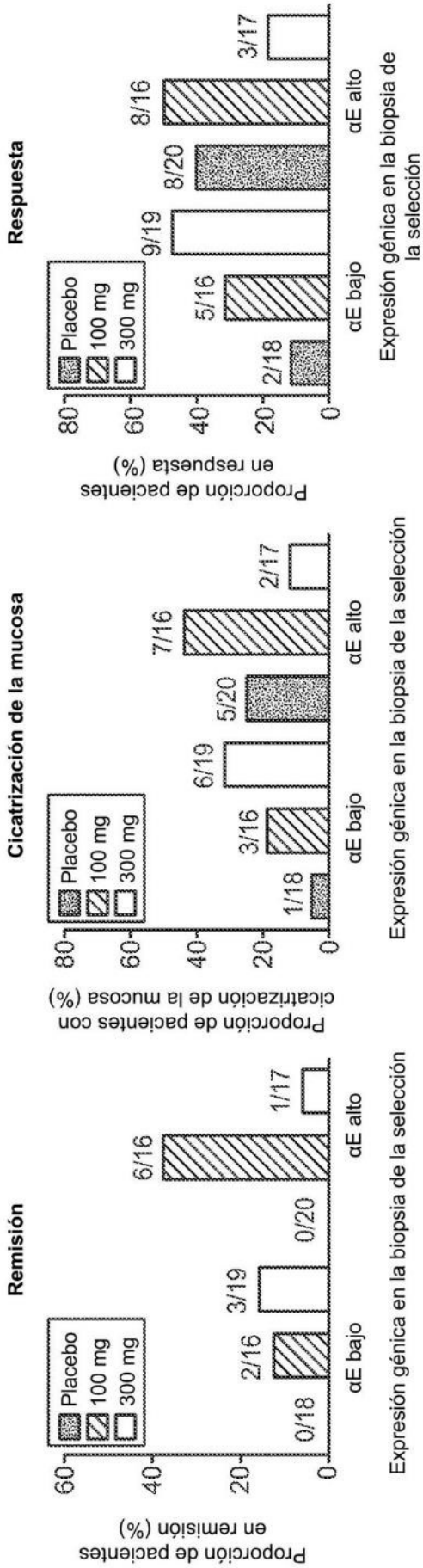


FIG. 8A

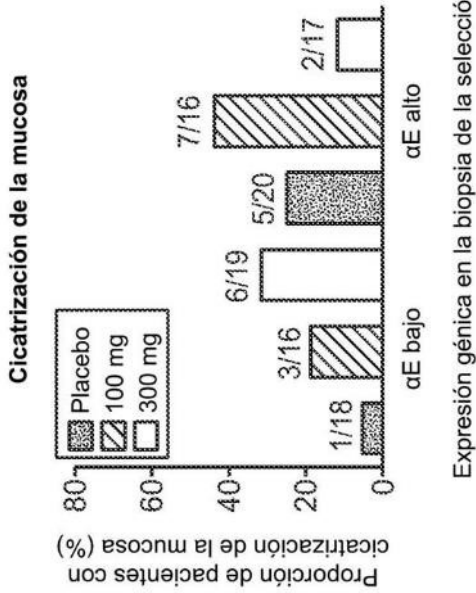


FIG. 8B

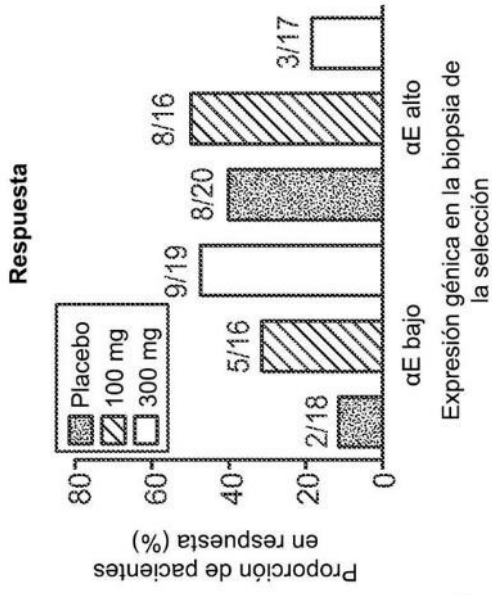


FIG. 8C

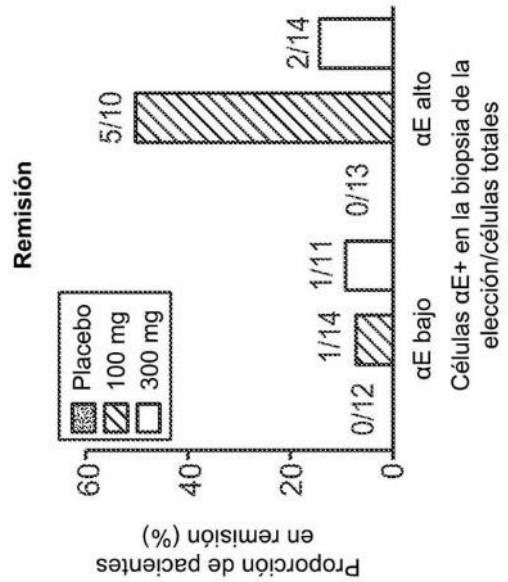


FIG. 8D

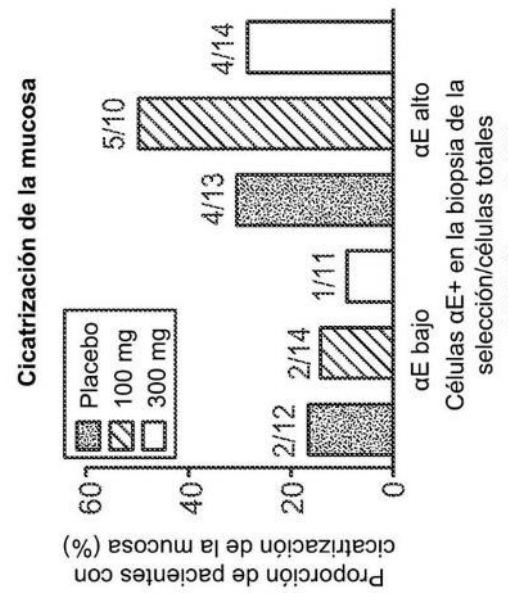


FIG. 8E

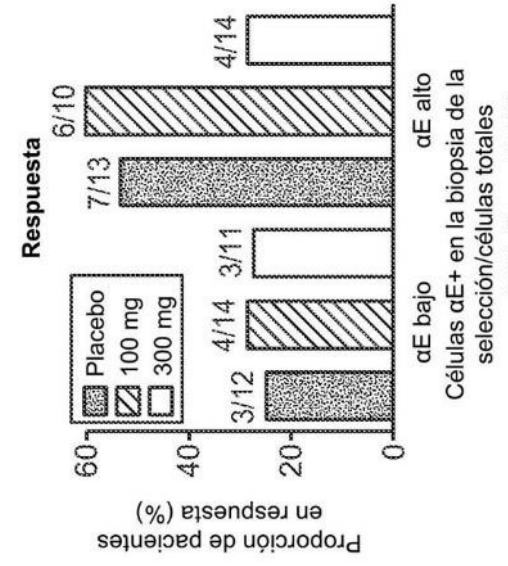


FIG. 8F

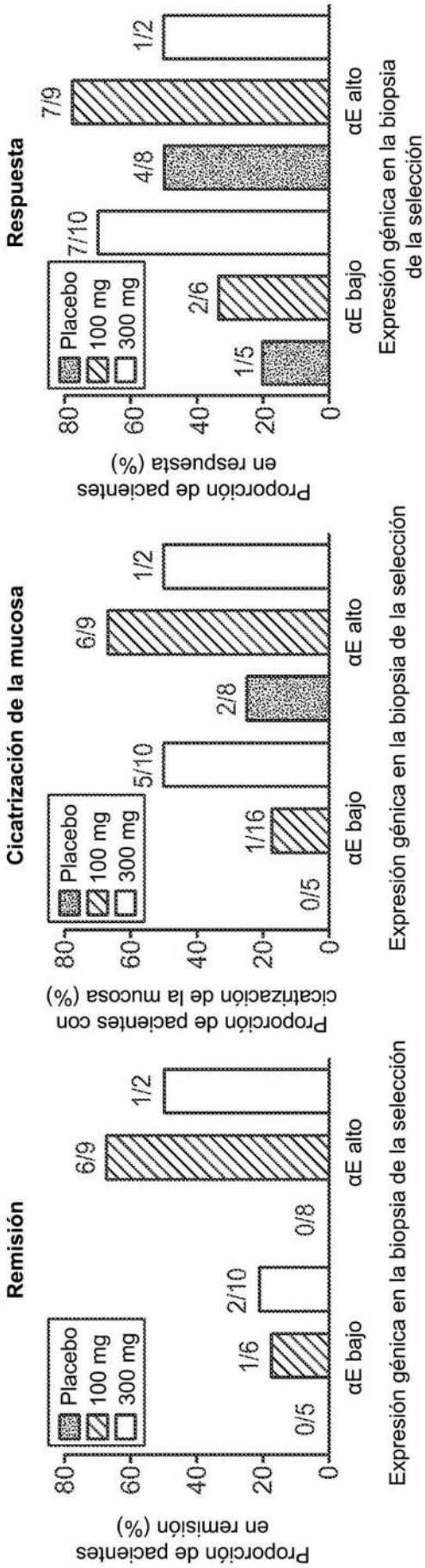


FIG. 9A

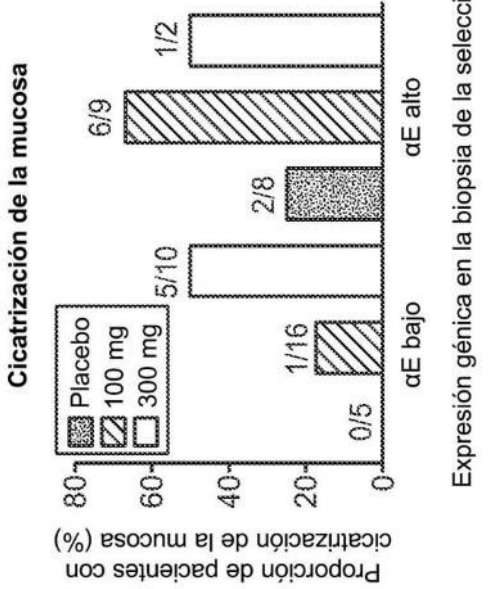


FIG. 9B

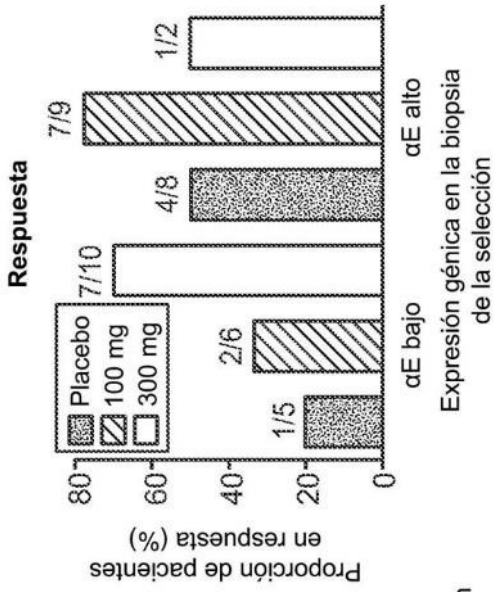


FIG. 9C

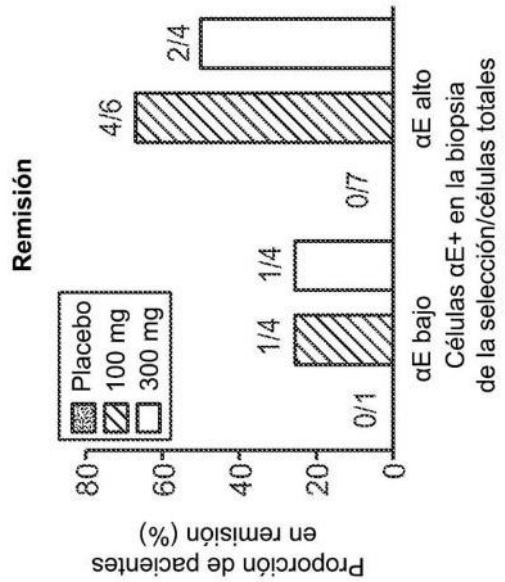


FIG. 9D

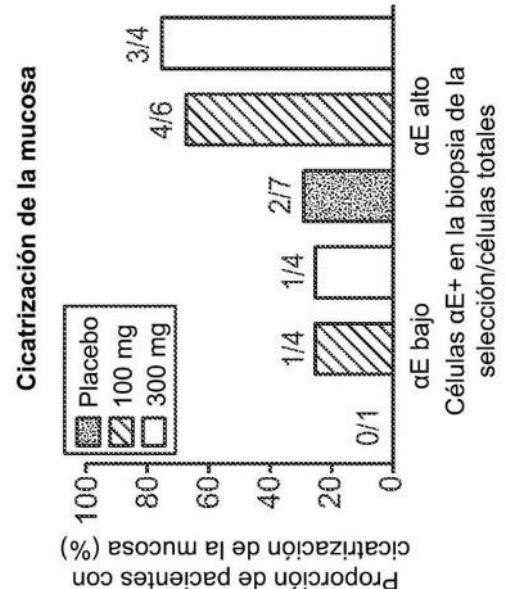


FIG. 9E

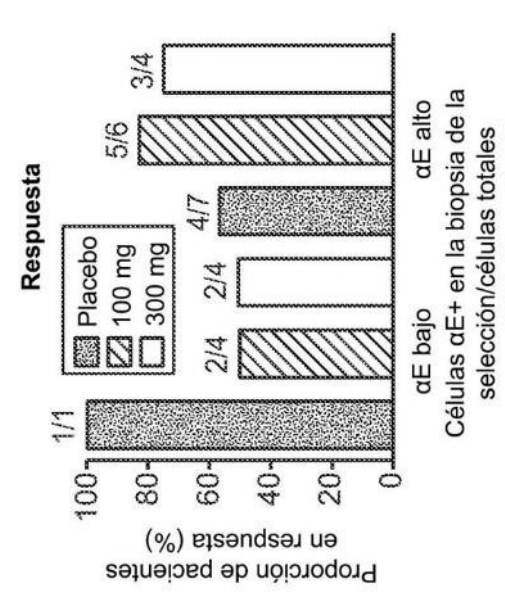


FIG. 9F

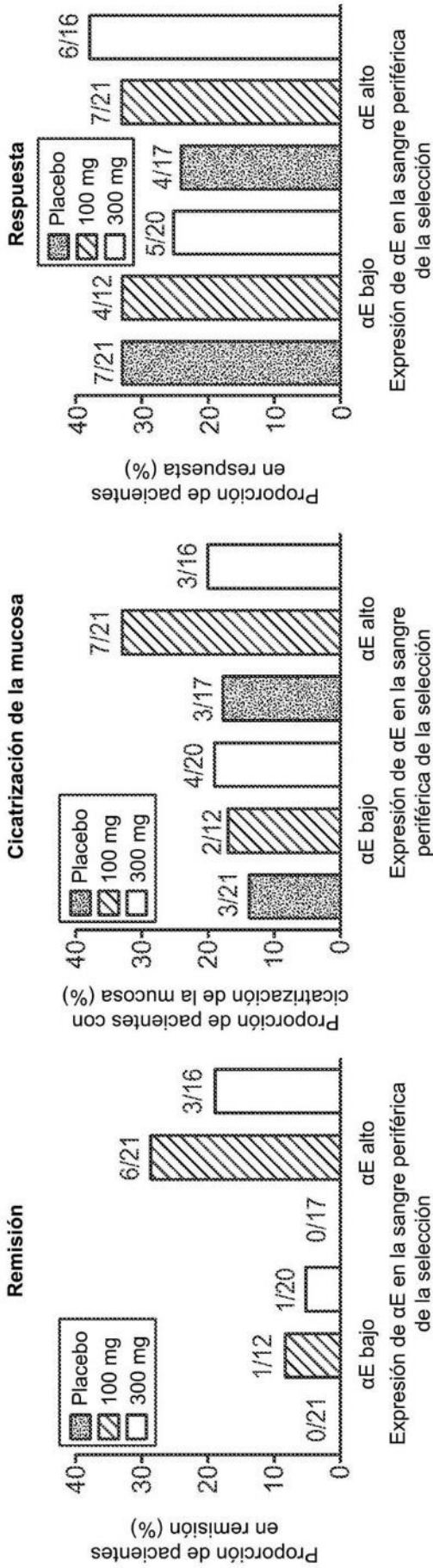


FIG. 10A

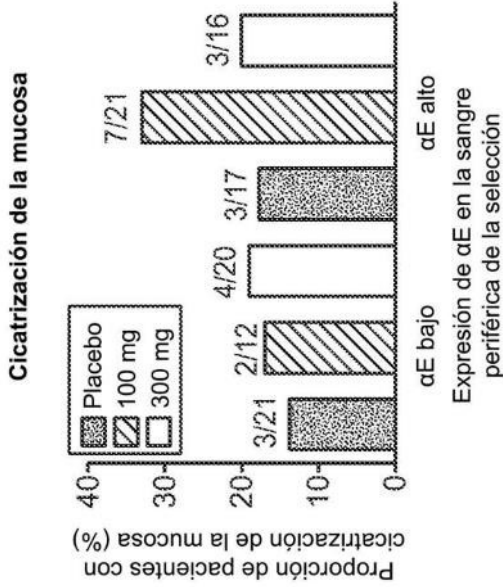


FIG. 10B

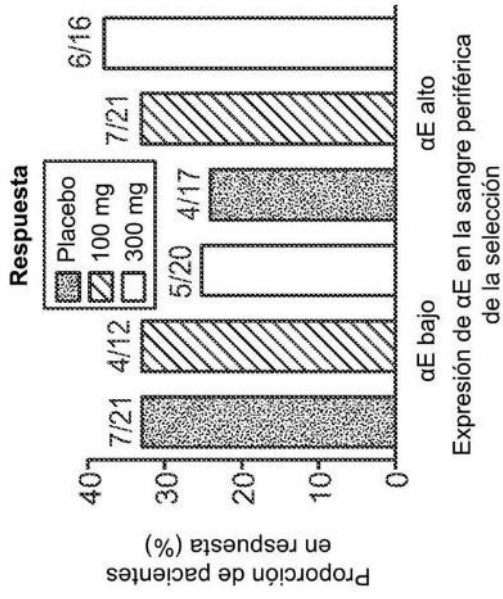
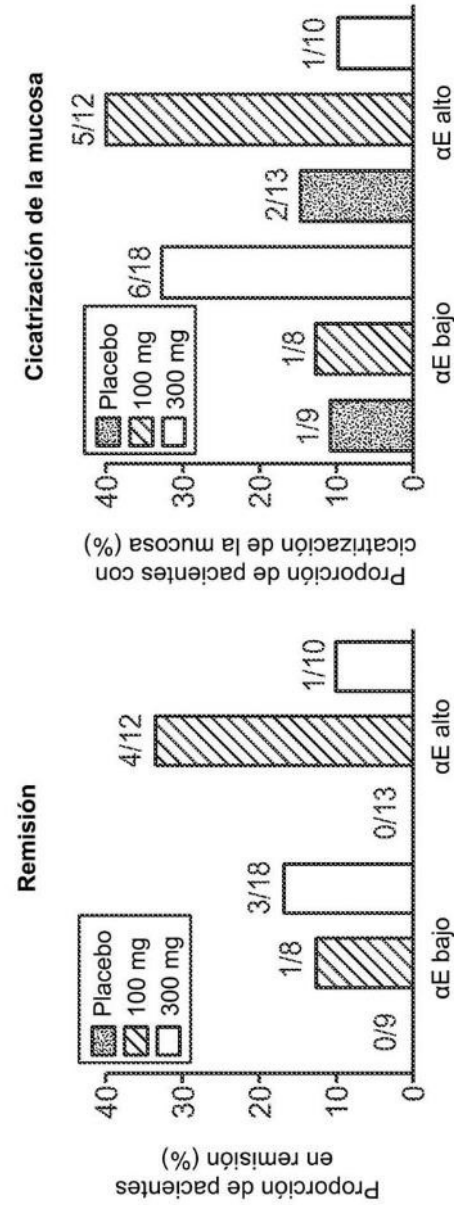
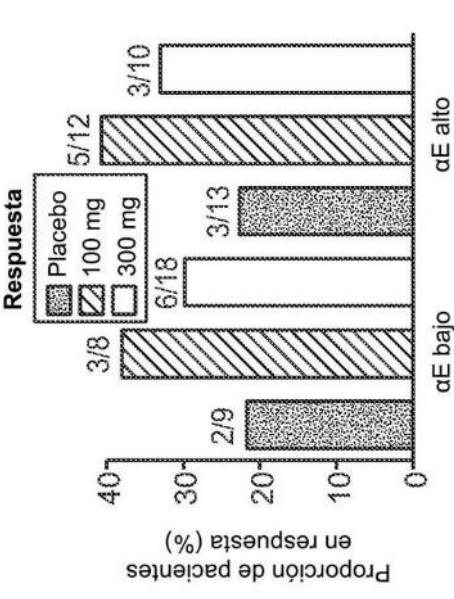


FIG. 10C



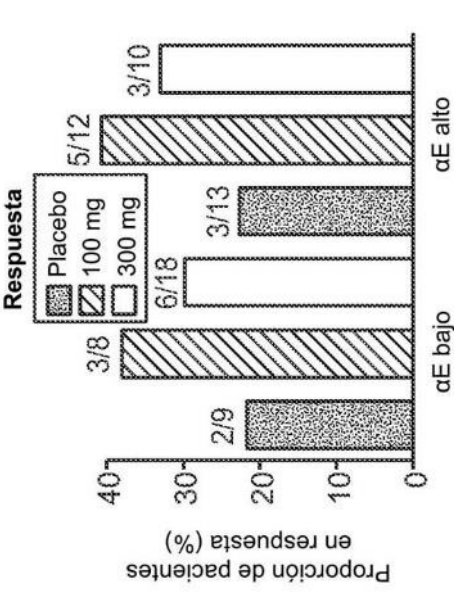
Día 1: Expresión de αE en sangre periférica

FIG. 10D



Día 1: Expresión de αE en sangre periférica

FIG. 10E



Día 1: Expresión de αE en sangre periférica

FIG. 10F

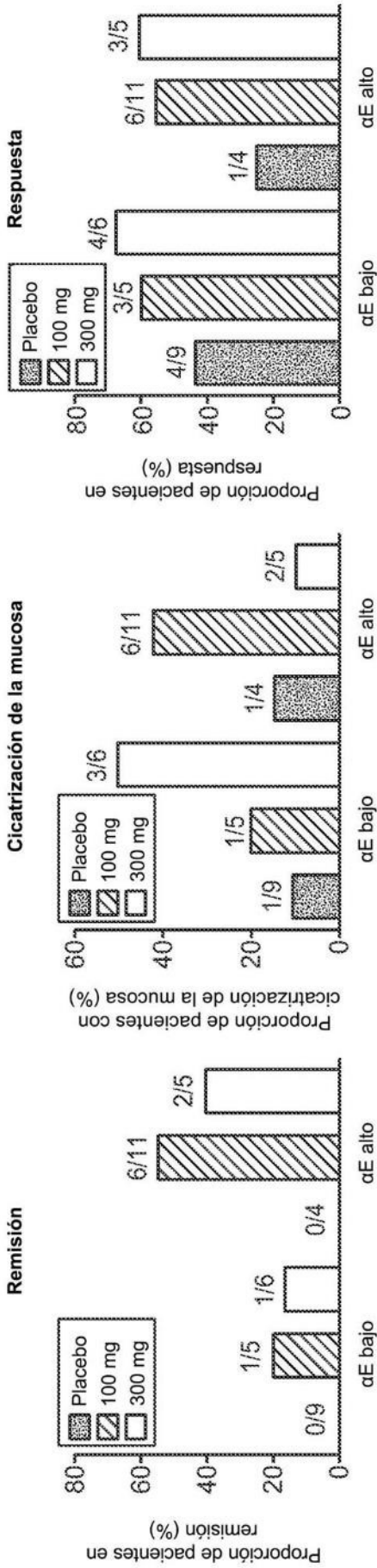


FIG. 11A

Expresión de αE en la sangre periférica de la selección

Expresión de αE en la sangre periférica de la selección

Expresión de αE en la sangre periférica de la selección

FIG. 11B

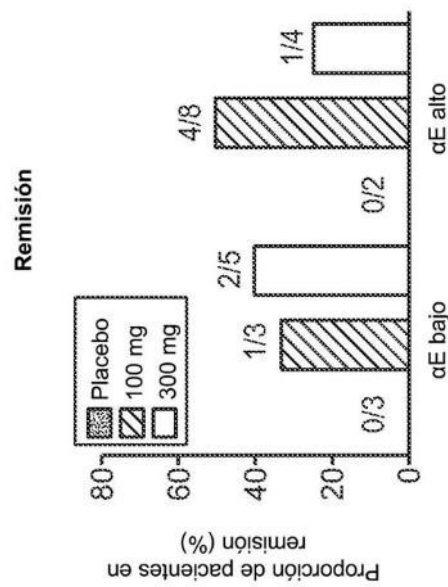


FIG. 11D

Día 1: Expresión de αE en sangre periférica

FIG. 11E

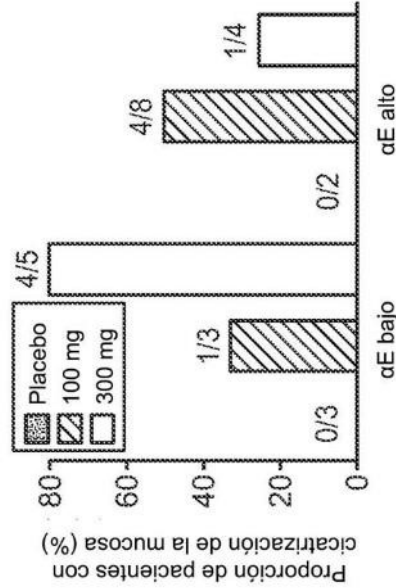


FIG. 11E

Día 1: Expresión de αE en sangre periférica

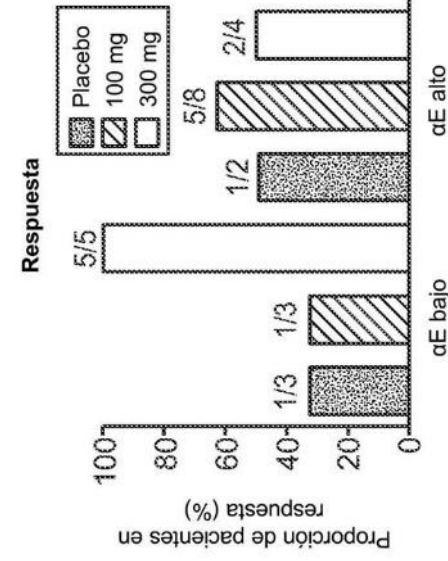


FIG. 11F

Día 1: Expresión de αE en sangre periférica

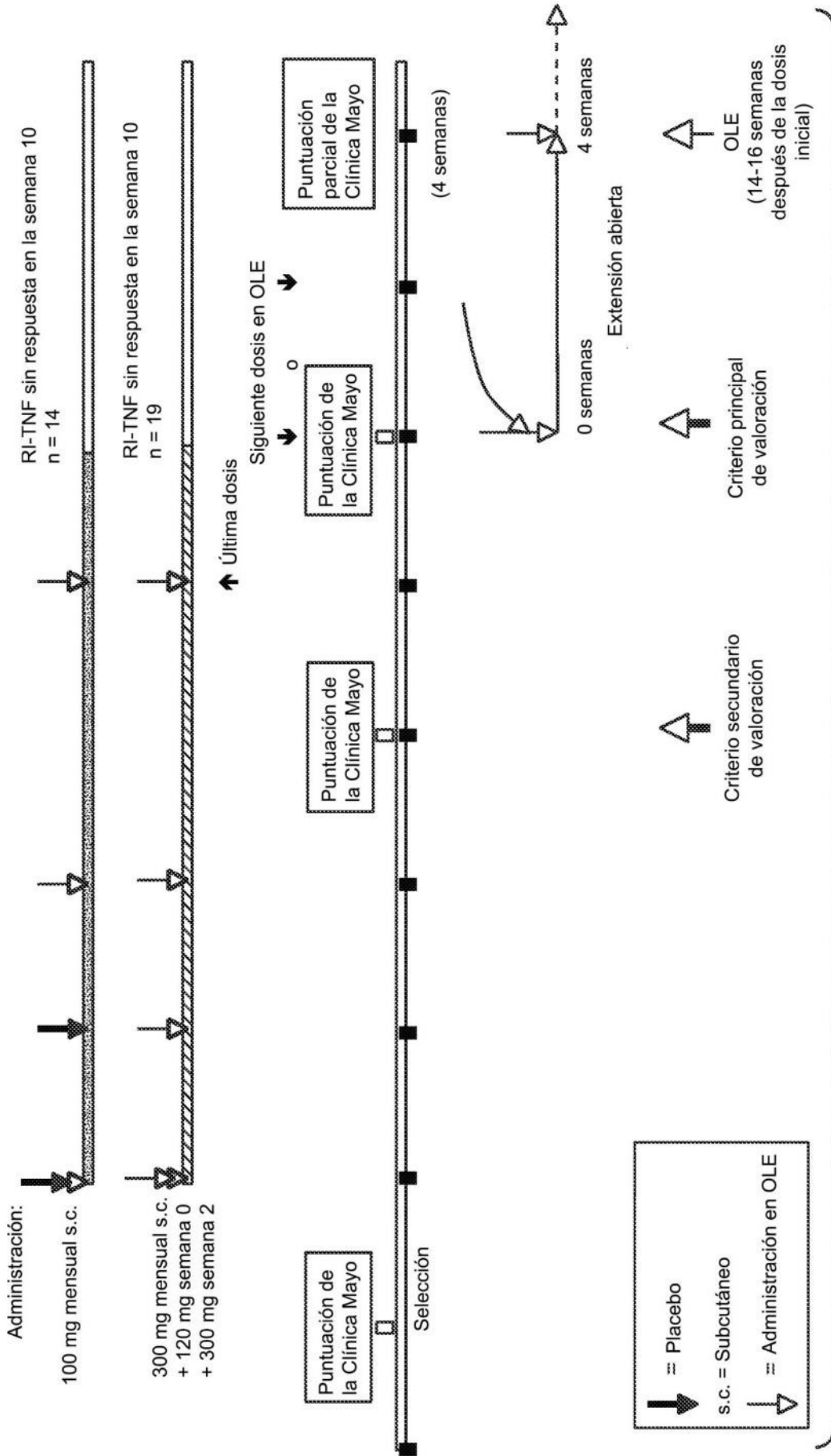


FIG. 12

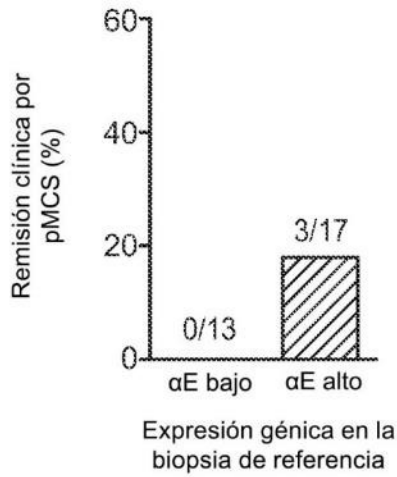


FIG. 13A

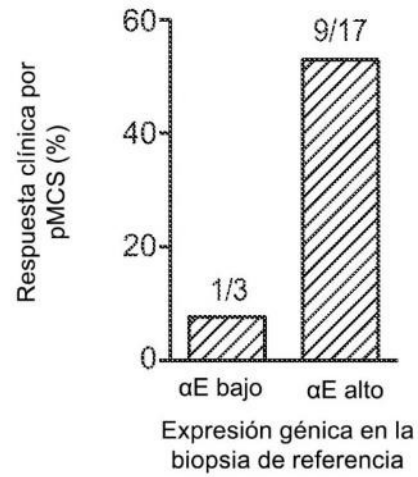


FIG. 13B

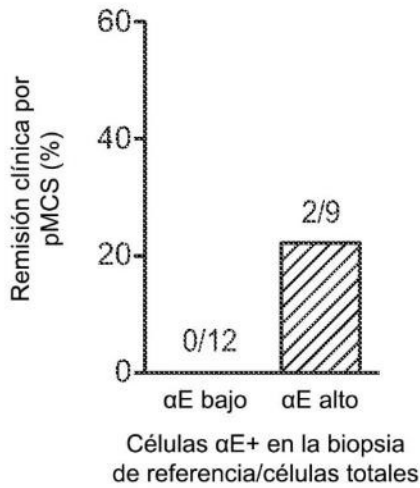


FIG. 13C

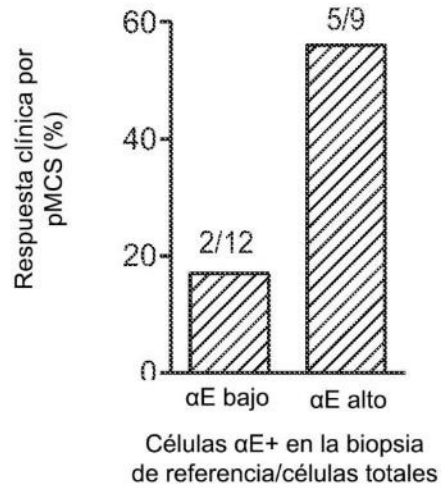


FIG. 13D

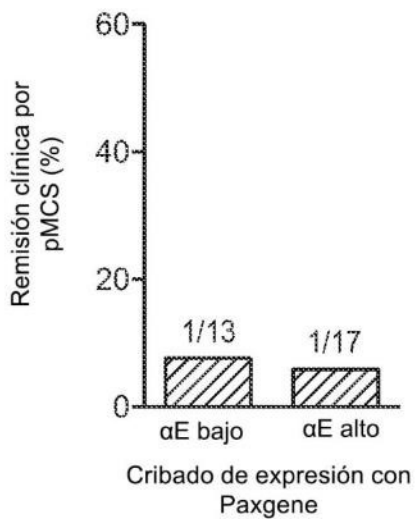


FIG. 13E

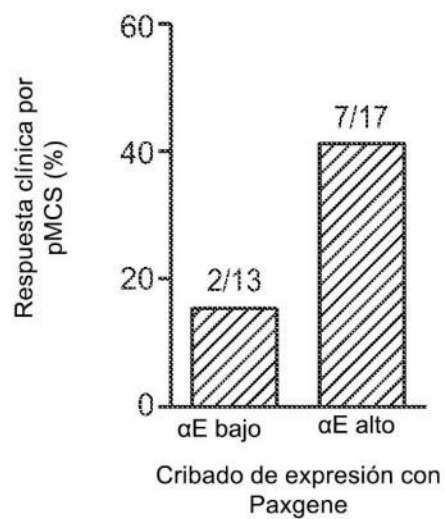


FIG. 13F