

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 066**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011** **E 17192860 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3326645**

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

30 Prioridad:

**25.10.2010 US 406365 P**

**25.10.2010 US 406358 P**

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

**23.12.2020**

73 Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (100.0%)**

**225 Binney Street**

**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CHACKERIAN, ALISSA, A.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 800 066 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 determinar diferencias en la actividad de la integrina alfa-4 mediante correlación de diferencias en niveles de sVCAM y/o sMAdCAM

5

### CAMPO

En esta invención se describe un procedimiento para monitorear un cambio en la actividad de la integrina alfa-4 en un individuo correlacionando la actividad con el nivel de una molécula soluble, donde la molécula soluble es una molécula de adhesión a células vasculares (sVCAM) y/o una molécula de adhesión a células de adhesina mucosa soluble (sMAdCAM).

10

### ANTECEDENTES

15 La respuesta inflamatoria de los tejidos vascularizados a infección o lesión se ve afectada por la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y su infiltración en los tejidos circundantes. En una respuesta inflamatoria normal, los leucocitos infiltrantes liberan mediadores tóxicos, fagocitan los desechos y las células muertas, y juegan un papel en la reparación del tejido y en la respuesta inmune. Sin embargo, en la inflamación patológica, los leucocitos infiltrantes son demasiado sensibles y pueden causar daños graves o fatales. Las integrinas pertenecen a una familia de glicoproteínas de la superficie celular involucradas en la adhesión celular, en la migración de células inmunes y en la activación. La integrina alfa-4 se expresa por los leucocitos circulantes y forma receptores heterodiméricos junto con la subunidad de la integrina beta-1 o beta-7. Tanto los dímeros alfa-4 beta-1 ( $\alpha 4\beta 1$  o antígeno-4 muy tardío (VLA-4)) como alfa-4 beta-7 ( $\alpha 4\beta 7$ ) desempeñan un papel en la migración de leucocitos a través del endotelio vascular y contribuyen a la activación y supervivencia celular dentro del parénquima.

20

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

30 Las moléculas de adhesión, como las integrinas alfa-4, son dianas potenciales para el tratamiento de inflamaciones patológicas y crónicas. Inhibidores de la integrina alfa-4 han sido probados por su potencial antiinflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. Los experimentos *in vitro* demuestran que los inhibidores de la integrina alfa-4 bloquean la unión de los linfocitos a células endoteliales activadas. Los experimentos que prueban el efecto de los inhibidores de la integrina alfa-4 en modelos animales que tienen una afección artificialmente inducida que simula

35 esclerosis múltiple (EM), encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), han demostrado que los inhibidores de la integrina anti-alfa-4 previenen la inflamación cerebral y la parálisis subsecuente en animales. Del mismo modo, se ha demostrado que los inhibidores de la integrina alfa-4 protegen contra la inflamación intestinal en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en animales. En conjunto, estos experimentos identifican los inhibidores de la integrina alfa-4 como agentes terapéuticos potencialmente útiles para enfermedades asociadas con inflamación

40 patológica y crónica, como la EM y la EII.

Sin embargo, no ha habido un procedimiento eficiente y confiable para estudiar la farmacocinética y farmacodinámica de los agentes que inhiben la integrina alfa-4. Los procedimientos disponibles actualmente típicamente implican (1) medir la saturación del receptor y la modulación negativa del receptor en muestras de sangre fresca mediante

45 citometría de flujo, o (2) enumerar linfocitos en muestras de sangre recién recogidas. Ambos procedimientos se basan en el análisis en el mismo día de muestras frescas, lo que puede ser inconveniente al analizar muestras clínicas. Además, estos procedimientos no se consideran medidas muy sensibles de la inhibición funcional de las integrinas alfa-4. Recientemente, Millonig y col., J. Neuroimmunol. 227: 190-194 (2010) observaron una disminución estadísticamente significativa de VCAM-1 (sVCAM) soluble en pacientes con EM 4 semanas después de administrar

50 Natalizumab. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la cadena  $\alpha$  de integrinas alfa-4. Del mismo modo, Opperman y col., J. Neurology 257:1-246, (2010), Resumen # P667, observó una disminución en los niveles séricos de sVCAM en pacientes con EM después de tres y doce meses de tratamiento con Natalizumab. Millonig y col. sugirió que el nivel de sVCAM alcanzó un nivel estable de inhibición cuatro semanas después de la primera aplicación de Natalizumab. Aunque Millonig y col. especularon que sVCAM podría ser una

55 herramienta de monitoreo de la eficacia del tratamiento, Millonig y col. admitieron que tanto la utilidad clínica de la correlación observada como su importancia biológica quedan por dilucidar.

En consecuencia, sigue existiendo la necesidad en el campo de desarrollar procedimientos más eficientes y precisos, por ejemplo, identificar y emplear un biomarcador confiable, para evaluar la farmacocinética y farmacodinámica de los

60 inhibidores de la integrina  $\alpha 4$ , que pueden aplicarse para tratar diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

### RESUMEN

La inhibición de la actividad de la integrina alfa-4, ya sea por anticuerpos o moléculas pequeñas, se correlaciona con

una disminución en el nivel de sVCAM y/o sMAdCAM en fluidos corporales. La disminución de los niveles de sVCAM y/o sMAdCAM depende de la dosis y puede observarse en días o incluso horas. Además, la correlación entre la inhibición de la integrina alfa-4 y la disminución de los niveles de sVCAM y/o sMAdCAM se ve en individuos sanos, así como en individuos enfermos, por lo tanto, es independiente del estado de la enfermedad. En consecuencia, sVCAM y/o sMAdCAM se pueden usar como un biomarcador farmacodinámico para la actividad biológica de un agente como un anticuerpo o fármaco que modula la actividad de la integrina alfa-4. Los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos de los moduladores de la integrina alfa-4 pueden así determinarse con respecto a la actividad biológica *in vivo* del modulador, sin interferencia potencial de metabolitos moduladores inactivos, por ejemplo. Una mejor caracterización de estos parámetros permitirá regímenes de dosificación de modulador de la integrina alfa-4 más precisos, por ejemplo, que pueden minimizar efectos secundarios potencialmente dañinos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar una diferencia en la actividad de la integrina alfa-4 en un individuo con una enfermedad o trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende:

a) medir una molécula soluble en una primera muestra biológica de fluido corporal seleccionada de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma y obtenida del individuo inmediatamente antes de la administración de un inhibidor de la integrina alfa-4;

b) medir la molécula soluble en una segunda muestra biológica, donde la segunda muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma y se ha obtenido del individuo dentro de los treinta y un días después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4;

c) determinar si hay una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica, donde la disminución se correlaciona con una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo y, por lo tanto, determinar si hay una diferencia en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 en comparación con antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4; y

d) determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo, donde ninguna disminución o una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica indica una respuesta ineficaz al inhibidor de la integrina alfa-4 requiriendo un ajuste del tratamiento del individuo,

donde la molécula soluble es sVCAM y/o sMAdCAM, y

donde el inhibidor de la integrina alfa-4 es un anticuerpo de la integrina anti-alfa-4.

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

El procedimiento puede comprender además detectar una disminución en los niveles de la molécula soluble en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica, y atribuir dicha disminución a una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 comparada con antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4. Opcionalmente, el procedimiento puede comprender además no detectar ninguna disminución, o detectar una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ), en el nivel de la molécula soluble en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica, y concluyendo que se requiere un ajuste de tratamiento del individuo. El ajuste del tratamiento puede comprender cambiar a un inhibidor de la integrina alfa-4 diferente o aumentar la dosis del inhibidor de la integrina alfa-4.

En un aspecto, la actividad de la integrina alfa-4 puede ser la actividad de la integrina alfa-4 beta-1, y la molécula soluble es sVCAM. En otro aspecto, la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-7, y donde la molécula soluble es sMAdCAM.

Según la invención, la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal. Como se describe en esta invención, el individuo que tiene la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 puede tener una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica. La enfermedad o trastorno puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en meningitis, encefalitis, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes juvenil aguda, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones de anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos. El inhibidor de la integrina alfa-4 es un anticuerpo o una molécula pequeña.

- Según la invención, la muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma. Como se describe en esta invención, la primera y/o la segunda muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tejido, una célula y un fluido corporal. La primera y/o la segunda muestra biológica puede estar en forma de plasma o suero congelado. Se puede seleccionar un líquido corporal de entre el grupo que consiste en sangre, linfa, suero, plasma, orina, semen, líquido sinovial, saliva, lágrimas, lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo. La molécula soluble en las muestras biológicas se puede medir mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIE), Western blot y ensayo de detección de proteínas a base de microperlas.
- 10 También se proporciona un uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM en un individuo tratado con un inhibidor de la integrina alfa-4 como un biomarcador farmacodinámico para la actividad de (i) integrina alfa-4 o (ii) el inhibidor de la integrina alfa-4, como se define en las reivindicaciones.
- 15 La actividad de la integrina alfa-4 puede ser la actividad de la integrina alfa-4 beta-1, y el biomarcador farmacodinámico puede ser sVCAM. La actividad de la integrina alfa-4 puede ser la actividad de la integrina alfa-4 beta-7, y el biomarcador farmacodinámico puede ser sMAdCAM. El inhibidor de la integrina alfa-4 es un anticuerpo de la integrina anti-alfa-4. El uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como un biomarcador farmacodinámico para la actividad puede ser útil en un individuo que recibe tratamiento con un modulador de la actividad de la integrina alfa-4. Según la invención, la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal. Como se describe en esta invención, el individuo puede tener una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica. La enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en meningitis, encefalitis, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes juvenil aguda, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones por anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.
- 20  
25

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 30 Los dibujos adjuntos se incorporan a la memoria descriptiva y proporcionan una ilustración no limitativa de diversas realizaciones. En los dibujos:
- La figura 1 representa ejemplos de inhibidores de la integrina alfa-4 (Compuestos A-D) utilizados en los Ejemplos.
- 35 La figura 2 representa niveles disminuidos de sVCAM en varios modelos de enfermedad de ratas tratadas con inhibidores de la integrina alfa-4 de moléculas pequeñas. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.
- La figura 3 representa niveles disminuidos de sVCAM en ratas normales tratadas con inhibidores de la integrina alfa-4 de moléculas pequeñas. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 2.
- 40 La figura 4 representa niveles disminuidos de sVCAM en ratones normales tratados con inhibidores de la integrina alfa-4 de moléculas pequeñas. El tratamiento de ratones normales con inhibidores de la integrina alfa-4 no parece afectar el nivel de molécula de adhesión intracelular soluble (sICAM). Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 3.
- 45 La figura 5 representa que el efecto de los inhibidores de la integrina alfa-4 en la regulación negativa de sVCAM depende de la dosis y se correlaciona con otros marcadores de la inhibición de la integrina alfa-4. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.
- 50 La figura 6 representa niveles disminuidos de sVCAM en ratones tratados con un inhibidor de anticuerpos de la integrina alfa-4. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 5.
- La figura 7 representa niveles disminuidos de sVCAM en ratones tratados con un inhibidor de molécula pequeña no pegilado de la integrina alfa-4. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 6.
- 55 La figura 8 representa que los efectos de la inhibición de la integrina alfa-4 en los niveles de sVCAM dependen de la dosis y desaparecen a medida que disminuyen los niveles plasmáticos del inhibidor de la integrina alfa-4. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 7.
- 60 La figura 9 representa que la inhibición de la integrina alfa-4 da como resultado una regulación negativa de sMAdCAM en varios modelos de colitis en ratones. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 8.
- La figura 10 representa que la inhibición de la integrina alfa-4 por un inhibidor de molécula pequeña da como resultado

una regulación negativa de sMAdCAM en ratones normales. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 9.

La figura 11 representa que la inhibición de la integrina alfa-4 por un inhibidor de anticuerpos da como resultado una regulación negativa de sMAdCAM en ratones normales. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.

La figura 12 representa que una regulación negativa de sMAdCAM por inhibidores de la integrina alfa-4 depende de la dosis, es reversible y se correlaciona con la selectividad in vitro del inhibidor de la integrina alfa-4 para el heterodímero de la integrina alfa-4 beta-7. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 11.

La figura 13 representa una regulación negativa selectiva de sVCAM por un inhibidor de la integrina alfa-4 que se une selectivamente al heterodímero de la integrina alfa-4 beta-1. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 11.

La figura 14 representa la correlación entre los niveles de sVCAM / sMAdCAM y los niveles de anticuerpos de la integrina alfa-4 en ratones. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 12.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 1. Definiciones

Un "individuo" como se usa en esta invención puede ser cualquiera de los animales mamíferos (*por ejemplo*, animales domesticados), incluidos humanos, perros, gatos, vacas, caballos, cabras, cerdos, porcinos, ovejas, monos, ratas y ratones. En otra realización, el individuo puede ser un humano.

El término "inflamación patológica y crónica" como se usa en esta invención, se refiere a una inflamación inapropiada asociada con trastornos que incluyen, entre otros, asma, aterosclerosis, demencia por SIDA, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple (especialmente en la EM que implica desmielinización adicional), *por ejemplo*, esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP), esclerosis múltiple progresiva secundaria (EMPS), esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR) y esclerosis múltiple recurrente progresiva (EMRP), metástasis tumorales, nefritis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones de anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos. Dicha inflamación se caracteriza por una mayor respuesta de las células inflamatorias, incluidos los leucocitos infiltrantes. Con el tiempo, tal inflamación patológica a menudo resulta en daño al tejido en la región de inflamación inapropiada.

El término "actividad de la integrina alfa-4", como se usa en esta invención, se refiere a la cantidad accesible de integrinas alfa-4, incluidos los dímeros alfa-4 beta-1 y alfa-4 beta-7, presentados en la superficie celular de los leucocitos. La actividad de la integrina alfa-4 se puede determinar usando cualquier técnica conocida en la técnica. *Por ejemplo*, la actividad de la integrina alfa-4 se puede evaluar directamente mediante citometría usando un anticuerpo marcado fluorescentemente específico para las integrinas alfa-4. *Ver, por ejemplo*, la Patente EE. UU. Número 7.807.167. Alternativamente, la actividad de la integrina alfa-4 se puede evaluar indirectamente midiendo la infiltración de leucocitos en muestras de tejido. *Ver, por ejemplo*, la patente EE. UU. Número 7.435.802; *ver también* Krumbholz y col., *Neurology* 71: 1350-1354 (2008).

El término "muestra biológica" como se usa en esta invención se refiere a un material biológico de un individuo. Una muestra biológica puede ser, como ejemplos no limitantes, un tejido, célula, sangre completa, suero, fluidos corporales, líquido plasmático, muestra de tejido autóptico (p. ej., cerebro, piel, ganglios linfáticos, médula espinal), células cultivadas o sobrenadantes de células cultivadas. La muestra biológica utilizada variará según el formato del ensayo, el procedimiento de detección y la naturaleza de la muestra a analizar. Los procedimientos para preparar muestras biológicas son bien conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para obtener una muestra biológica que sea compatible con el procedimiento utilizado.

El término "fluido corporal" usado en esta invención incluye fluidos que se encuentran en individuos. Incluyen fluidos que se excretan o secretan del cuerpo, así como fluidos que normalmente no se excretan ni secretan. Estos fluidos incluyen, como ejemplos no limitantes, humor acuoso, sangre, suero, fluido intersticial, linfa, moco, fluido pleural, saliva, plasma, orina, semen, lágrimas, fluido sinovial, fluido de heridas, y/o fluido cerebroespinal. En las presentes realizaciones se usa sangre, incluyendo suero sanguíneo y plasma sanguíneo.

Los términos "se une específicamente" o "específicamente se une" tal como se usan en esta invención significa que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión estadísticamente significativa a moléculas distintas de su pareja de unión específica. Una pareja de unión puede mostrar al menos 1000 veces la afinidad de unión (medida como una constante de asociación aparente) para su par de pareja de unión específica que una pareja

de unión no específica. Por ejemplo, anticuerpos que se unen a una integrina alfa-4 con una afinidad de unión de  $10^7$  moles/L o más, típicamente  $10^8$  moles/L o más, se dice que se unen específicamente a una integrina alfa-4.

El término "kit de diagnóstico" como se usa en esta invención incluye típicamente un sistema de detección con diferentes paquetes de anticuerpos y/o reactivos de diagnóstico que son necesarios para la evaluación cuantitativa y/o cualitativa de un biomarcador. Los kits generalmente incluyen instrucciones para usar los reactivos y/o anticuerpos de diagnóstico. Los anticuerpos, así como cualquier reactivo, se pueden proporcionar como un líquido, polvo, comprimido o suspensión. Los anticuerpos y/o los reactivos se pueden proporcionar en paquetes separados adecuados para aplicación por separado.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta invención tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia. Debe notarse que, como se usa en esta invención, las formas singulares "un/una", "y", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de tales anticuerpos y la referencia a "la dosificación" incluye referencia a una o más dosificaciones y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

## 2. Inhibidores de la integrina alfa-4

Se pueden usar varios tipos de inhibidores de la integrina alfa-4 que tienen la capacidad de unirse e inhibir la actividad de la integrina alfa-4 en la presente descripción. Muchos de estos inhibidores han sido identificados y caracterizados, y a continuación se describen ejemplos representativos. Dadas las enseñanzas descritas en esta invención, está dentro de la habilidad de un experto en la técnica identificar otros inhibidores de la integrina alfa-4 que puedan inhibir los dímeros de la integrina que comprenden alfa-4 de una manera que imita biológicamente o es similar a los inhibidores específicamente descritos. Las presentes realizaciones también incluyen la administración crónica de tales inhibidores y combinaciones de los mismos.

### 2.1. Anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos

Los inhibidores de la integrina alfa-4 son anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o un dímero que comprende alfa-4, como alfa-4 beta-1 o alfa-4 beta-7. Se conocen anticuerpos de la integrina alfa-4 representativos en la técnica, que incluyen, por ejemplo (1) Natalizumab, descrito en las Patentes EE. UU. Números 5.168.062, 5.385.839, 5.730.978, 5.840.299, 6.033.665 y 6.602.503; (2) los anticuerpos CD49d fabricados por Biologend (San Diego, CA); y (3) PS/2 que es un anticuerpo de la integrina alfa-4 anti-ratón de rata (el hibridoma PS/2 está disponible en el ATCC (Rockville, MD)). Ejemplos no limitantes de anticuerpos de la integrina alfa-4 incluyen los descritos en las Patentes EE. UU. Números 5.565.332, 5.733.743, 5.837.242, 5.858.657, 5.871.734, 5.871.907, 5.872.215, 5.885.793, 5.888.507, 5.932.214, 5.969.108, 6.140.471, 6.172.197, 6.180.336, 6.225.447 y 7.176.184.

En una realización, el inhibidor de la integrina alfa-4 puede ser un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo puede modificarse químicamente, *por ejemplo*, por pegilación. Además, se pueden identificar otros anticuerpos usando técnicas disponibles en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos capaces de unirse específicamente a la integrina alfa-4 se pueden producir utilizando la tecnología de presentación sobre fagos. Los fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o un dímero que comprende una integrina alfa-4 se pueden aislar a continuación. Procedimientos ejemplares para producir tales anticuerpos mediante presentación sobre fagos se describen en la Patente EE. UU. Número 6.225.447, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir usando los procedimientos de hibridoma convencionales. Estos procedimientos se han aplicado ampliamente para producir líneas celulares híbridas que secretan altos niveles de anticuerpos monoclonales contra muchos antígenos específicos, y también se pueden usar para producir anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a integrinas alfa-4. Por ejemplo, ratones (*por ejemplo*, ratones Balb/c) pueden inmunizarse con un epítipo de la integrina alfa-4 antigénico mediante inyección intraperitoneal. Después de que haya pasado suficiente tiempo para permitir una respuesta inmune, se sacrifican los ratones y se obtienen células del bazo y se fusionan con células de mieloma, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Las células fusionadas resultantes, los hibridomas, se hacen crecer en un medio selectivo, y las células sobrevivientes se hacen crecer en dicho medio usando condiciones de dilución limitantes. Después de clonación y reclonación, los hibridomas se pueden aislar para secretar anticuerpos (por ejemplo, de la clase IgG o IgM o la subclase IgG1) que se unen selectivamente a la diana, integrina alfa-4 o un dímero que comprende una integrina alfa-4. Para producir agentes específicos para uso humano, el monoclonal aislado se puede usar a continuación para producir anticuerpos quiméricos y humanizados.

Los anticuerpos que pueden usarse como inhibidores de la integrina alfa incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multispecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla (*p.ej.*, scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab,

anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (que incluyen, *p.ej.*, anticuerpos anti-Id a anticuerpos de las presentes realizaciones) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. Típicamente, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno humano, que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs vinculados a disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o junto con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen fragmentos de unión a antígeno que pueden comprender cualquier combinación de una o más regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal, incluidas aves y mamíferos. Típicamente, los anticuerpos son humanos, murinos (*p. ej.*, ratones y ratas), burros, ovejas, monos, conejos, cabras, cobayas, cerdos, camellos, caballos o pollos (u otras aves). Tal como se usa en esta invención, los anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente EE. UU. 5.939.598

15 Anticuerpos quiméricos y humanizados pueden producirse a partir de anticuerpos no humanos, y pueden tener la misma o similar afinidad de unión que el anticuerpo a partir del cual se producen. Técnicas para producir anticuerpos quiméricos (Morrison y col., 1984 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 6851; Neuberger y col., 1984 Nature 312: 604; Takeda y col., 1985 Nature 314: 452) incluyen unir los genes de, *por ejemplo*, una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una región variable (V) de un anticuerpo monoclonal de ratón puede unirse a un ácido nucleico que codifica una región constante (C) humana, *por ejemplo*, IgG1 o IgG4. El anticuerpo resultante es, por lo tanto, un híbrido de especies, generalmente con el dominio de unión al antígeno del anticuerpo no humano y el dominio C o efector de un anticuerpo humano o de primates.

25 Anticuerpos humanizados son anticuerpos con regiones variables que provienen principalmente de un anticuerpo humano (es decir, el anticuerpo aceptor), pero que tienen regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de un anticuerpo no humano (el anticuerpo donante). *Ver, p.ej.*, Queen y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989); WO 90/07861, Patentes EE. UU. Nos. 7.435.802, 6.054.297; 5.693.761; 5.585.089; 30 5.530.101; y 5.224.539. La región o regiones constantes de estos anticuerpos son generalmente también de un anticuerpo humano. Los dominios variables humanos se eligen típicamente de anticuerpos humanos que tienen secuencias que muestran una alta homología con los dominios de unión a la región variable no humanos deseados. Los residuos variables de la cadena pesada y ligera pueden derivarse del mismo anticuerpo o de un anticuerpo humano diferente. Además, las secuencias se pueden elegir como consenso de varios anticuerpos humanos, como se describe en WO 92/22653

Un "anticuerpo Primatized™" es un anticuerpo recombinante que contiene secuencias variables de primates o porciones de unión a antígeno y secuencias de dominio constante humano. *Ver, por ejemplo*, Newman, Bio/Technology, 1992, 10: 1455-60. La primatización de anticuerpos da como resultado la generación de anticuerpos que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. *Ver, por ejemplo*, la Patente EE. UU. Número 6.113.898. Esta técnica modifica los anticuerpos de modo que no sean rechazados tras la administración en humanos porque son antigénicos. Esta técnica se basa en la inmunización de monos cynomolgus con antígenos o receptores humanos. Esta técnica se desarrolló para crear anticuerpos monoclonales de alta afinidad dirigidos a antígenos de la superficie celular humana.

45 Aminoácidos específicos dentro de la región variable humana se seleccionan para sustitución basándose en la conformación predicha y las propiedades de unión al antígeno. Esto se puede determinar utilizando técnicas como el modelado por ordenador, la predicción del comportamiento y las propiedades de unión de aminoácidos en ciertos lugares dentro de la región variable y la observación de los efectos de la sustitución. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre una región variable no humana y una región variable humana, la región variable humana puede alterarse para reflejar la composición de aminoácidos de la región variable no humana. En una realización específica, los anticuerpos usados en el régimen de dosificación crónica son anticuerpos humanizados como se describe en la Patente EE. UU. N.º 5.840.299. En otra realización, ratones transgénicos que contienen genes de anticuerpos humanos pueden inmunizarse con una estructura de la integrina alfa-4 antigénica y la tecnología de hibridoma puede usarse para generar anticuerpos humanos que se unen selectivamente a la integrina alfa-4.

Anticuerpos quiméricos, humanos, primatizados, y/o humanizados pueden producirse usando expresión recombinante, *p.ej.*, expresión en hibridomas humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)), en células de mieloma, o en células de ovario de hámster chino (OHC). De manera alternativa, secuencias de codificación de anticuerpo se pueden incorporar en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y posterior expresión en la leche del animal transgénico. *Ver, p.ej.*, Patente EE. UU. No. 6.197.946 Transgenes adecuados incluyen transgenes que tienen un promotor y/o potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, por ejemplo, caseína o β-lactoglobulina.

## 2.2. Moléculas pequeñas

Moléculas pequeñas para uso como se describe en esta invención pueden abarcar compuestos que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 4.000 Daltons. Alternativamente, estos compuestos pueden tener cadenas poliméricas de polietilenglicol unidas covalentemente (es decir, pegilación) para mejorar diversas propiedades de los compuestos, por ejemplo, vida media prolongada, penetración mejorada en el tejido y solubilidad mejorada. Los conjugados pegilados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 40 kilodaltons (kDa). Inhibidores de la integrina alfa-4 comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y puede incluir un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, típicamente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los inhibidores de la integrina alfa-4 a menudo comprenden carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales descritos anteriormente. Inhibidores de la integrina alfa-4 pueden incluir, entre otros: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de inhibidores de la integrina alfa-4 se describen, por ejemplo, en las Patentes EE. UU. Nos., 5.998.447 (heterociclos), 6.034.238 (compuestos heterocíclicos), 6.331.552 (imidazolidina sustituida), 6.399.643 (derivados de espiroimidazolidina), 6.423.712 (derivados de imidazolidina 2,4-sustituidos), 6.514.952 (derivados de hidantoina), 6.521.654 (derivados de imidazolidina sustituidos), 6.667.331 (compuestos no peptidílicos), 6.667.334 (derivados de imidazolidina), 6.668.527 (compuestos no peptidílicos), 6.680.333 (derivados de imidazolidina), 6.756.378, 6.759.424 (derivados de imidazolidina), 6.838.439 (heterocitos), 6.903.128 (compuestos no peptidílicos), 6.962.937 (derivados de imidazolidina), 7.179.819 y 7.196.112. Varios inhibidores de la integrina alfa-4 de molécula pequeña representativos se muestran en la figura 1.

## 2.3. Péptidos de la integrina anti-alfa-4

La presente descripción también incluye cualquier péptido que sea capaz de unirse a una integrina alfa-4 o un dímero que comprende una subunidad alfa-4. Se incluyen péptidos que son sustancialmente homólogos a una región de la matriz extracelular o un ligando natural del receptor o receptores de la integrina alfa-4 específicos diana. Por ejemplo, para la inhibición crónica del receptor alfa-4 beta-1, se pueden usar péptidos que comprenden al menos una porción de la región de fibronectina IIICS (*por ejemplo*, péptidos que comprenden al menos una porción de la secuencia de péptidos CS-1 o una secuencia sustancialmente homóloga a la secuencia CS-1) puede usarse para unirse a un receptor e inhibir la actividad de la integrina que comprende alfa-4. *Ver, por ejemplo*, la Patente EE. UU. Número 7.238.668.

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

Inhibidores de la integrina alfa-4 pueden usarse para tratar diversas enfermedades asociadas con la inflamación patológica o crónica al bloquear las interacciones dependientes de alfa-4. La interacción dependiente de alfa-4 con el ligando VCAM-1 en las células endoteliales es un evento temprano en muchas respuestas inflamatorias, incluidas las del sistema nervioso central. Enfermedades y afecciones no deseadas que resultan de la inflamación y que tienen exacerbaciones clínicas agudas y/o crónicas incluyen esclerosis múltiple (Yednock y col., 1992 Nature 356: 63; Baron y col., 1993 J. Exp. Med. 177: 57), meningitis, encefalitis, accidente cerebrovascular, otros traumas cerebrales, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (EC) (Hamann y col., 1994 J. Immunol. 152: 3238; Podolsky y col., 1993 J. Clin. Invest. 92: 372), artritis reumatoide (van Dinther-Janssen y col., 1991 J. Immunol. 147: 4207; van Dinther-Janssen y col., 1993 Annals Rheumatic Diseases 52: 672; Elices y col., 1994 J. Clin. Invest. 93: 405; Postigo y col., 1992 J. Clin. Invest. 89: 1445), asma (Mulligan y col., 1993 J. Immunol. 150: 2407) y diabetes aguda de inicio juvenil (Tipo 1) (Yang y col., 1993 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 10494; Burkly y col., 1994 Diabetes 43: 529; Baron y col., 1994 J. Clin. Invest. 93: 1700), demencia inducida por SIDA (Sasseville y col., 1994 Am. J. Path. 144: 27); aterosclerosis (Cybulsky y col., 1991 Science 251: 788-91, Li y col., 1993 Arterioscler. Trombo 13: 197), nefritis (Rabb y col., 1995 Springer Semin. Immunopathol. 16: 417-25), retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones de anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos, como se produce en el síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

La enfermedad inflamatoria intestinal es un término colectivo para dos enfermedades similares denominadas enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa. La EC es una enfermedad inflamatoria ulceroconstrictora idiopática crónica caracterizada por una afectación agudamente delimitada y típicamente transmural de todas las capas de la pared intestinal por una reacción inflamatoria granulomatosa. Puede estar involucrado cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, aunque la enfermedad afecta más comúnmente al íleon terminal y/o colon. La colitis ulcerosa es una respuesta inflamatoria limitada en gran medida a la mucosa y submucosa del colon. Los linfocitos y los macrófagos son numerosos en las lesiones de la enfermedad inflamatoria intestinal y pueden contribuir a la lesión inflamatoria.

El asma es una enfermedad caracterizada por una mayor capacidad de respuesta del árbol traqueobronquial a diversos estímulos que potencian la constricción paroxística de las vías respiratorias bronquiales. Los estímulos

provocan la liberación de varios mediadores de la inflamación de los mastocitos recubiertos con IgE, incluidos los factores quimiotácticos eosinófilos y neutrófilos, leucotrienas, prostaglandinas y factor activador de plaquetas. La liberación de estos factores recluta basófilos, eosinófilos y neutrófilos, que causan lesiones inflamatorias.

5 La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias (*p.ej.*, coronaria, carótida, aorta e ilíaca). La lesión básica, el ateroma, consiste en una placa focal elevada dentro de la íntima, que tiene un núcleo de lípidos y una tapa fibrosa de cobertura. Los ateromas comprometen el flujo sanguíneo arterial y debilitan las arterias afectadas. Infartos de miocardio y cerebrales son una consecuencia importante de esta enfermedad. Macrófagos y leucocitos se reclutan para los ateromas y contribuyen a la lesión inflamatoria.

10

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente que causa principalmente deterioro y destrucción de las articulaciones. La artritis reumatoide generalmente afecta primero las pequeñas articulaciones de las manos y los pies, pero a continuación puede afectar las muñecas, los codos, los tobillos y las rodillas. La artritis resulta de la interacción de las células sinoviales con los leucocitos que se infiltran desde la circulación hacia el revestimiento sinovial de las articulaciones. *Ver, por ejemplo*, Paul, Immunology 3a ed., Raven Press, 1993.

15

Inhibidores de la integrina alfa-4 pueden usarse en el tratamiento del rechazo de órganos o injertos. En los últimos años, ha habido una mejora considerable en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para trasplantar tejidos y órganos, como piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás el principal problema pendiente es la falta de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor al aloinjerto u órgano trasplantado. Cuando las células u órganos alogénicos se trasplantan a un huésped (es decir, el donante y el receptor son individuos diferentes de la misma especie), es probable que el sistema inmunitario del huésped genere una respuesta inmune a los antígenos extraños en el trasplante (enfermedad huésped contra injerto) que conduce a la destrucción del tejido trasplantado. Células CD8+, células CD4+ y monocitos están involucrados en el rechazo de tejidos de trasplantes.

20

Anticuerpos dirigidos a la integrina alfa-4 son útiles, *entre otras cosas*, para bloquear las respuestas inmunes inducidas por aloantígenos en el receptor, impidiendo así que dichas células participen en la destrucción del tejido u órgano trasplantado. *Ver, por ejemplo*, Paul y col., 1996 Transplant International 9: 420-425; Georczynski y col., 1996 Immunol. 87: 573-580; Georczynski y col., 1995 Transplant. Immunol 3: 55-61; Yang y col., 1995 Transplantation 60: 71-76; y Anderson y col., 1994 APMIS 102: 23-27. Un uso relacionado para los inhibidores de la integrina alfa-4 es la modulación de la respuesta inmune involucrada en la enfermedad "injerto contra huésped" (EICH). *Ver, p.ej.*, Schlegel y col., J. Immunol. 155: 3856-3865 (1995). La EICH es una enfermedad potencialmente mortal que se produce cuando células inmunológicamente competentes se transfieren a un receptor alogénico. En esta situación, las células inmunocompetentes del donante pueden atacar tejidos en el receptor. Los tejidos de la piel, los epitelios intestinales y el hígado son dianas frecuentes y pueden destruirse durante el curso de la EICH. La enfermedad presenta un problema especialmente grave cuando se trasplanta tejido inmune, como en el trasplante de médula ósea; pero también se ha informado de EICH menos grave en otros casos, incluidos trasplantes de corazón e hígado. Inhibidores de la integrina alfa-4 se utilizan, *entre otras cosas*, para bloquear la activación de las células T del donante, lo que interfiere con su capacidad para destruir las células diana en el huésped.

30

35

Inhibidores de la integrina alfa-4 pueden ser útiles para inhibir la metástasis tumoral. Se ha informado que varias células tumorales expresan la integrina alfa-4 y se ha informado que los anticuerpos contra la integrina alfa-4 bloquean la adhesión de dichas células a las células endoteliales. *Ver, p.ej.*, Steinback y col., 1995 Urol. Res. 23: 175-83; Orosz y col., 1995 Int. J. Cancer 60: 867-71; Freedman y col., 1994 Leuk Lymphoma 13: 47-52; y Okahara y col., 1994 Cancer Res. 54: 3233-6.

40

Inhibidores de la integrina alfa-4 pueden ser útiles en el tratamiento de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica progresiva autoinmune que afecta a unas 250.000 a 350.000 personas en los Estados Unidos. Se cree que la esclerosis múltiple es el resultado de una reacción autoinmune específica en la que ciertos leucocitos atacan e inician la destrucción de la mielina, la vaina aislante que cubre las fibras nerviosas. En un modelo animal para la esclerosis múltiple, se ha demostrado que anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra la integrina alfa-4 beta-1 bloquean la adhesión de los leucocitos al endotelio y, por lo tanto, impiden la inflamación del sistema nervioso central y la posterior parálisis en los animales. El inicio de la EM puede ser dramático o tan leve como para no hacer que un paciente busque atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad en una o más extremidades, visión borrosa debido a neuritis óptica, trastornos sensoriales, diplopía y ataxia. El curso de la enfermedad se puede estratificar en tres categorías generales: (1) EM recurrente, (2) EM progresiva crónica y (3) EM inactiva. La EM recurrente se caracteriza por ataques recurrentes de disfunción neurológica. Los ataques de EM generalmente evolucionan durante días o semanas y pueden ser seguidos por una recuperación completa, parcial o nula. La recuperación de los ataques generalmente se produce dentro de semanas a varios meses desde el pico de los síntomas, aunque raramente alguna recuperación puede continuar durante 2 o más años. La EM crónica progresiva provoca un empeoramiento progresivo gradual sin períodos de estabilización o remisión. Esta forma se desarrolla en pacientes con antecedentes de EM recurrente, aunque en el 20% de los pacientes no se pueden recordar recaídas. Recaídas agudas también pueden producirse durante el curso progresivo. Una tercera forma es la EM inactiva. La EM inactiva se caracteriza por déficits neurológicos fijos de magnitud variable. La mayoría de los pacientes con EM inactiva tienen antecedentes de EM recurrente. El curso de la EM también depende de la edad del paciente. Por ejemplo,

50

55

60

factores pronósticos favorables incluyen el inicio temprano (excluyendo la infancia), un curso recurrente y poca discapacidad residual 5 años después del inicio. Por el contrario, el mal pronóstico se asocia con una edad de inicio tardía (es decir, 40 años o más) y un curso progresivo. Estas variables son interdependientes, ya que la EM crónica progresiva tiende a comenzar a una edad posterior a la EM recurrente. La discapacidad de la EM crónica progresiva generalmente se debe a paraplejía progresiva o tetraplejía en pacientes individuales.

Inhibidores de la integrina alfa-4 pueden usarse con cantidades efectivas de otros agentes terapéuticos contra la inflamación aguda y crónica. Dichos agentes incluyen otros antagonistas de moléculas de adhesión (*por ejemplo*, otras integrinas, selectinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig)). *Ver, por ejemplo*, Springer, 1990 Nature 346: 425-433; Osborn, 1990 Cell 62: 3; Hynes, 1992 Cell 9: 11. Otros agentes antiinflamatorios que pueden usarse en combinación con inhibidores de la integrina alfa-4 incluyen anticuerpos y otros antagonistas de las citocinas, como las interleucinas IL-1 a IL-13, factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ , interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), factor estimulante de colonias (CSF) y factor estimulante de colonias de monocitos de granulocitos (GM-CSF). Otros agentes antiinflamatorios también pueden incluir anticuerpos y otros antagonistas de quimiocinas como MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, exotaxina e IL-8. Otros agentes antiinflamatorios pueden incluir además FAINE (fármacos antiinflamatorios no esteroides), esteroides y otros inhibidores de la inflamación de moléculas pequeñas.

#### 4. Uso de inhibidores de la integrina alfa-4 para tratar enfermedades autoinmunes

20 Inhibidores de la integrina alfa-4 también se pueden usar para tratar diversas enfermedades autoinmunes. Una enfermedad autoinmune en esta invención es una enfermedad o trastorno que surge y se dirige contra los propios tejidos de un individuo o un cosegregado o manifestación de los mismos o la condición resultante de los mismos. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, entre otros, artritis (artritis reumatoide, como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, gota o artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral y artritis reumatoide de inicio juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica, artritis reactiva y espondilitis anquilosante), enfermedades inflamatorias hiperproliferativas de la piel, psoriasis como psoriasis en placas, psoriasis gutate, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, atopia que incluye enfermedades atópicas como fiebre del heno y síndrome de Job, dermatitis que incluye dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis alérgica contacto, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis inespecífica, dermatitis de contacto irritante primaria y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligada a x, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria como urticaria alérgica crónica y la urticaria crónica idiopática, incluida la urticaria crónica autoinmune, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, 35 necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluida la esclerodermia sistémica), esclerosis como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM), como EM espinóptica, EM progresiva primaria (EMPP) y EM recidivante remitente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales autoinmunes, colitis como colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colágena, 40 colitis poliposa, enterocolitis necrotizante y colitis transmural y enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nudoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de dificultad respiratoria, incluido el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, daño del nervio craneal como en la meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, 45 prurito escroto, falla autoinmune prematura ovárica, pérdida auditiva repentina debida a una afección autoinmune, enfermedades mediadas por IgE como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis como la encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveítis, como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, como la glomerulonefritis crónica o aguda, como GN primaria, GN 50 inmunomediada, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membranoproliferativa o membranosa proliferativa (GNMP), incluidos los tipos I y II, y GN rápidamente progresiva, nefritis proliferativa, falla endocrina poliglandular autoinmune, balanitis que incluye balanitis circumscripción plasmacelularis, balanopostitis, erythema annulare centrifugum, erythema dyschromicum perstans, erythema multiforme, granuloma annulare, lichen nitidus, lichen sclerosus et atrophicus, lichen simplex chronicus, lichen spinulosus, lichen planus, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenoso, afecciones y respuestas alérgicas, reacción alérgica, eccema que incluye eccema alérgico o atópico, eccema asteatótico, eczema dishidrótico y eczema palmoplantar vesicular, asma como asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmune, afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes contra antígenos extraños como grupos sanguíneos ABO fetales durante el embarazo, 60 enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus, incluyendo nefritis lupus, cerebritis lupus, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extrarenal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, alopecia lupus, lupus eritematoso sistémico (LES) como LES cutáneo o LES cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (LEN) y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluida diabetes mellitus pediátrica dependiente de insulina (DMID), diabetes mellitus de inicio en adultos (diabetes Tipo II),

diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, trastorno diabético de grandes arterias, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis, vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluida la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa) poliarteritis microscópica, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizante como la vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada a ANCA, como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS) y vasculitis de vasos pequeños asociada a ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs , anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune que incluye anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), enfermedad de Addison, anemia o aplasia eritrocitaria pura (PRCA), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión de múltiples órganos, como los secundarios a septicemia, trauma o hemorragia, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, síndrome como penfigoide ampollosa y penfigoide de la piel, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo de la membrana mucosa y pénfigo eritematoso), las poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica, preeclampsia, un trastorno del complejo inmune como la nefritis del complejo inmune, la nefritis mediada por anticuerpos, polineuropatías, neuropatía crónica como polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como la desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluida la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), la púrpura postransfusión (PTP), la trombocitopenia inducida por heparina y la trombocitopenia autoinmune o inmunomediada, como la trombocitopenia idiopática púrpura (ITP), incluida la ITP crónica o aguda, escleritis como ceratoescleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune de testículo y ovario, incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunes, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes, incluyendo tiroiditis como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos como el síndrome miasténico de Eaton-Lambert o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de hombre rígido o persona rígida, encefalomiелitis como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia gravis como miastenia gravis asociada a timoma, degeneración cerebelosa, neuromiotonía, síndrome de opsoclono u opsoclono mioclono (OMS) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoidea, hepatitis de células gigantes, crónica hepatitis activa o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis intersticial linfoide (LIP), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), nefropatía IgA idiopática, dermatosis IgA lineal, dermatosis neutrofílica aguda febril, dermatosis pustulosa subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y pneumocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad de Celiac o celiaca, esprúe celiaco (gluten enteropatía), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA); enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad del oído autoinmune como la enfermedad del oído interno autoinmune (EOIA), pérdida auditiva autoinmune, policondritis como la policondritis refractaria o recaída o recurrente, proteinosis pulmonar alveolar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sífilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado al zoster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis monoclonal de células B (p. ej., gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de importancia indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis segmentaria focal o segmentaria o focal (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes como enfermedades desmielinizantes autoinmunes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, Síndrome de Dressier, alopecia areata, alopecia total, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, *por ejemplo*, debido a anticuerpos antispermatozoicos, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de aves fancier, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias como leishmaniasis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, faciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica) o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) , infección por ecovirus, sepsis, endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus,

infección por el virus de la rubéola, síndromes post-vacunación, infección por rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, falla gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis post-estreptocócica, tromboangitis obliterans, tirototoxicosis, tabes dorsalis, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis por hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis sicca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico

5 idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión por reperfusión isquémica y familiar benigna, reperfusión de órganos trasplantados, autoinmunidad retiniana, inflamación articular, bronquitis, enfermedad de las vías respiratorias/pulmonar obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos, aspermiogénesis, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nudoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga

10 crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida de audición sensorineural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regionalis, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia espéncia adquirida, timoma no maligno, vitiligo, síndrome de shock tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que involucran infiltración de células T, deficiencia de adhesión leucocitaria,

15 respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión de múltiples órganos, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, oftalmia simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome nefrótico, insulinitis, falla poliendocrina,

20 síndrome poliglandular autoinmune Tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto (AOIH), cardiomiopatía como cardiomiopatía dilatada, epidermolisis bullosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis maxilar aguda, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar o esfenoidal, un trastorno relacionado con eosinófilos como eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffler, neumonía

25 eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis broncopneumónica, aspergiloma o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxia, espondiloartritis seronegativa, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclera, epiesclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectasis, trastornos autoinmunes asociados con la enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, linfadenitis, reducción

30 de la respuesta de la presión arterial, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastorno por reperfusión isquémica, lesión por reperfusión del miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatorias, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia orgánica múltiple, enfermedades ampollosas, necrosis cortical renal, meningitis

35 purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citoquinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis.

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

Inhibidores de la integrina alfa-4 también se pueden usar para tratar cáncer. Ver, *p.ej.*, la Solicitud de Patente Publicada en EE. UU. No. 20090312353. El término cáncer abarca una colección de tumores malignos con cada cáncer de cada órgano que consiste en numerosos subconjuntos. Típicamente, en el momento del diagnóstico del cáncer, "el cáncer"

45 consiste en múltiples subpoblaciones de células con diversas características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y biológicas.

Los tipos de cánceres a tratar con un inhibidor de la integrina alfa-4 pueden ser aquellos que exhiben integrinas alfa-4 o sus ligandos (por ejemplo, los ligandos de las integrinas alfa-4 incluyen VCAM-1 y/o MAdCAM-1). Los cánceres

50 representativos incluyen, entre otros, tumores malignos hematológicos, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC) y mieloma múltiple (MM). Las leucemias pueden ser linfoblásticas o mielógenas. La leucemia linfoblástica (o linfocítica) afecta a los linfocitos. La leucemia mielógena afecta a los mielocitos.

55 Las enfermedades neoplásicas linfocíticas pueden caracterizarse por una expansión masiva de un solo clon de células B, detectable midiendo los anticuerpos excesivamente producidos, medidos en una prueba de electroforesis de proteínas séricas o citometría de flujo sanguíneo periférico. Dicha expansión se dice que es "monoclonal", y los anticuerpos monoclonales producidos por dicho grupo de células B pueden causar enfermedades como la amiloidosis y el lupus, o pueden ser indicativos de una neoplasia maligna subyacente. El concepto de clonalidad está estrechamente asociado con malignidad, por ejemplo, en el diagnóstico de lesiones cutáneas linfomatoideas. La

60 expansión de un clon particular de células B inmunes generalmente es interpretada por los médicos como evidencia de crecimiento celular irrestricto, el sello distintivo del cáncer. La leucemia linfoide (o leucemia linfocítica) es un tipo de leucemia que afecta el tejido linfoide. Estas leucemias se dividen comúnmente por la etapa de maduración en la que la población linfoide clonal (neoplásica) dejó de madurar (es decir, leucemia linfoblástica aguda o leucemia

linfoblástica crónica).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), también conocida como leucemia linfocítica aguda, es una forma de leucemia de los glóbulos blancos. Los glóbulos blancos malignos e inmaduros se multiplican continuamente y se producen en exceso en la médula ósea. Como resultado, las células normales se desplazan fuera de la médula ósea y se metastizan en otros órganos. "Agudo" se refiere al estado inmaduro indiferenciado de los linfocitos circulantes, y al rápido avance de la enfermedad, que puede ser fatal en semanas o meses si no se trata.

La leucemia linfática crónica (LLC; también conocida como leucemia linfoide crónica), afecta a las células B. Las células B normalmente se originan en la médula ósea y se desarrollan en los ganglios linfáticos. En la LLC, el ADN de las células B está dañado, por lo que las células ya no luchan contra las infecciones. Sin embargo, las células B continúan creciendo y desplazan a las células sanguíneas sanas. Por lo tanto, la LLC se caracteriza por una proliferación neoplásica anormal de células B.

La mayoría de las personas son diagnosticadas sin síntomas como resultado de un análisis de sangre de rutina que arroja un conteo alto de glóbulos blancos. Sin embargo, a medida que avanza, la LLC causa inflamación de los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado, y eventualmente anemia e infecciones. La LLC temprana no se trata, y la LLC tardía se trata con quimioterapia y anticuerpos monoclonales. La supervivencia varía de 5 años a más de 25 años.

La leucemia mielógena aguda (LMA), también conocida como leucemia mielóide aguda, es un cáncer de la línea mielóide de glóbulos blancos, que se caracteriza por la rápida proliferación de células anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. Los síntomas de la LMA son causados por el reemplazo de la médula ósea normal con células leucémicas, lo que resulta en una disminución de los glóbulos rojos, las plaquetas y los glóbulos blancos normales. Estos síntomas incluyen fatiga, dificultad para respirar, hematomas y sangrado fáciles y un mayor riesgo de infección. Como una leucemia aguda, la LMA progresa rápidamente y generalmente es fatal en semanas o meses si no se trata.

La leucemia mielógena aguda (LMA) es una enfermedad potencialmente curable; pero generalmente solo una minoría de pacientes se cura con la terapia actual. La LMA se puede tratar inicialmente con quimioterapia dirigida a inducir una remisión. Algunos pacientes pueden recibir un trasplante de células madre hematopoyéticas.

La leucemia mielógena crónica (LMC) es una forma de leucemia caracterizada por el crecimiento aumentado y no regulado de células predominantemente mieloides en la médula ósea y la acumulación de estas células en la sangre. La LMC es un trastorno clonal de células madre de médula ósea que causa la proliferación de granulocitos maduros (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y sus precursores. Históricamente, se ha tratado con quimioterapia, interferón y trasplante de médula ósea.

El mieloma múltiple (MM) es una proliferación maligna de células plasmáticas que generalmente se origina en la médula ósea e involucra el esqueleto. MM presenta características clínicas atribuibles a los sitios particulares de participación y anomalías en la formación de proteínas plasmáticas. La afección generalmente se caracteriza por numerosos focos difusos o acumulaciones nodulares de células plasmáticas anormales o malignas en la médula de varios huesos (especialmente el cráneo), que causan inflamaciones palpables de los huesos y ocasionalmente en sitios extraesqueléticos. Tras el examen radiológico, las lesiones óseas pueden tener un aspecto característico "perforado".

Las células involucradas en el mieloma típicamente producen proteínas anormales y/o niveles anormales de proteínas en el suero y la orina. MM generalmente se desarrolla desde gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS) a mieloma múltiple latente (SMM) hasta mieloma múltiple (MM). Los síntomas de estas afecciones pueden incluir hipercalcemia, insuficiencia renal, fatiga, anemia, dolor óseo, fracturas espontáneas, aumento de la frecuencia o duración de la infección u olor o color anormal de la orina. Un "pico M" se refiere a un pico monoclonal que generalmente se visualiza como una banda estrecha en gel electroforético, o un arco anormal en la inmunoelectroforesis. Representa una proliferación de inmunoglobulina homogénea producida por células clónicas que se originan a partir de una sola célula común, *por ejemplo*, una inmunoglobulina monoclonal caracterizada por una cadena pesada de una sola clase y subclase, y una cadena ligera de un solo tipo (también denominada proteína M, una proteína monoclonal, y más ampliamente como una paraproteína).

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

Las enfermedades mediadas por VCAM incluyen todas las enfermedades mediadas por VCAM. *Ver, p.ej.*, WO 2010/053316. Ejemplos no limitantes de enfermedades mediadas por VCAM incluyen cánceres, respuestas alérgicas, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedad por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana, SIDA), artritis, neumonía, hipercolesterolemia, sepsis, dermatitis, psoriasis, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, rechazo tardío y crónico postrasplante de órganos sólidos, rechazo de trasplante de células o islotes, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, enfermedad trombótica, enfermedades inflamatorias intestinales,

diabetes autoinmune, retinopatía diabética, rinitis, lesión por isquemia-reperusión, restenosis post-angioplastia, osteomielitis, resfriado, enfermedad del virus de la gripe, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), glomerulonefritis, enfermedad de Graves, alergias gastrointestinales, enfermedad de células falciformes y conjuntivitis.

- 5 Además, niveles de sVCAM elevados en diversas enfermedades y trastornos. *Ver, p.ej.*, WO 2009/141786. Ejemplos no limitantes de estas enfermedades y trastornos que tienen niveles elevados de sVCAM incluyen la enfermedad de células falciformes (SCD), mieloma múltiple, enfermedad cardiovascular (aterosclerosis), infarto de miocardio, cáncer colorrectal, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de las arterias coronarias, aterosclerosis o enfermedad torácica, cáncer de mama, infección por el virus del dengue, fiebre hemorrágica, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, función renal en pacientes con enfermedad de células falciformes (albuminuria), preeclampsia, eclampsia, dermatitis alérgica de contacto, mieloma, linfoma no-Hodgkin, linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, vitreoretinopatía proliferativa, retinopatía diabética, endometriosis, lupus eritematoso sistémico (LES), leucemia mieloide aguda, hipertrigliceridemia, trasplante de corazón, sarcoidosis pulmonar, accidente cerebrovascular, enfermedad de las arterias coronarias, aterosclerosis, diabetes tipo 10 II derivación cardiopulmonar, sepsis, insuficiencia renal crónica, aloinjerto renal, enfermedad de Graves, trombosis venosa profunda y rinoconjuntivitis alérgica (rinitis alérgica).

### 7. MAdCAM como diana para tratar enfermedades inflamatorias

- 20 La molécula de adhesión a células de adreína mucosa (MAdCAM) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas de receptores de adhesión celular. Si bien MAdCAM desempeña un papel fisiológico en la vigilancia inmune intestinal, parece facilitar la extravasación linfocítica excesiva en la enfermedad inflamatoria intestinal en condiciones de inflamación crónica del tracto gastrointestinal. Se ha demostrado que los anticuerpos que inhiben la unión de los linfocitos  $\alpha 4\beta 7$  positivos a MAdCAM reducen el reclutamiento de linfocitos, la extravasación de tejidos, la inflamación y la gravedad de la enfermedad en modelos animales. Se ha sugerido que los anticuerpos anti-MAdCAM o la composición que los contiene son útiles para tratar diversas enfermedades inflamatorias. *Ver, p.ej.*, la Solicitud de Patente Publicada en EE. UU. No. 2009/0238820. Enfermedades inflamatorias no limitantes que pueden tratarse con un anticuerpo anti-MAdCAM incluyen la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad diverticular, gastritis, enfermedad hepática, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, peritonitis, apendicitis, enfermedad del tracto 25 biliar, mielitis transversa aguda, alérgica dermatitis (*p.ej.*, piel alérgica, eccema alérgico, atopía de la piel, eczema atópico, dermatitis atópica, inflamación cutánea, eczema inflamatorio, dermatitis inflamatoria, piel de pulgas, dermatitis militar, eczema militar, piel de ácaros del polvo doméstico, espondilitis anquilosante (síndrome de Reiters), asma, inflamación de las vías respiratorias, aterosclerosis, arteriosclerosis, atresia biliar, inflamación de la vejiga, cáncer de mama, inflamación cardiovascular (*p.ej.*, vasculitis, infartos reumatoides de pliegue ungueal, úlceras en las piernas, 30 polimiositis, inflamación vascular crónica, pericarditis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), pancreatitis crónica, inflamación perineural, colitis (incluida la colitis amebiana, colitis infecciosa, colitis bacteriana, colitis de Crohn, colitis isquémica, colitis ulcerosa, proctocolitis idiopática, enfermedad inflamatoria intestinal, psudomembranosocolitis), trastornos vasculares del colágeno (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica progresiva, enfermedad mixta del tejido conectivo, diabetes mellitus), enfermedad de Crohn (enteritis regional, ileitis 35 granulomatosa, ileocolitis, inflamación del sistema digestivo), enfermedad desmielinizante (incluida mielitis, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, encefalomielitis diseminada aguda, desmielinización perivenosa, deficiencia de vitamina B12, síndrome de Guillain-Barré, retrovirus asociado a la EM), dermatomiositis, diverticulitis, diarreas exudativas, gastritis, hepatitis granulomatosa, inflamación granulomatosa, inflamación granular, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedades inflamatorias del hígado (fibrosis hepática, cirrosis biliar primaria, hepatitis, 40 colangitis esclerosante), inflamación pulmonar (fibrosis pulmonar idiopática, granuloma eosinofílico del pulmón, histiocitosis X pulmonar, inflamación peribronquiolar, bronquitis aguda), linfogranuloma venéreo, melanoma maligno, enfermedad bucal/dental (incluyendo gingivitis, enfermedad periodontal), mucositis, inflamación del sistema musculoesquelético (miositis), esteatohepatitis no alcohólica (enfermedad del hígado graso no alcohólico), inflamación ocular y orbital (incluyendo uveítis, neuritis óptica, ulceración reumatoide periférica), inflamación periférica de la 45 córnea), osteoartritis, osteomielitis, inflamación faríngea, poliartritis, proctitis, psoriasis, lesiones por radiación, sarcoidosis, neuropatía drepanocítica, tromboflebitis superficiales, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, turoiditis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra huésped, lesión por quemaduras agudas, síndrome de Behcet y síndrome de Sjogrens.

### 55 8. Detección de sVCAM y/o sMAdCAM

- sVCAM y/o sMAdCAM se puede detectar en muestras biológicas. *Ver, p.ej.*, Leung y col., *Immunol. Cell Biol.* 82:400-409 (2004). La muestra biológica puede ser típicamente fluido corporal de un individuo, por ejemplo, sangre, suero, semen, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva. En algunas realizaciones, el fluido puede ser una muestra libre de células; sin embargo, la inclusión de células en una muestra de fluido corporal no impide la detección y/o cuantificación de sVCAM y/o sMAdCAM. En ejemplos particulares, el fluido puede ser suero o plasma. sVCAM y/o sMAdCAM se puede detectar utilizando un kit de diagnóstico, por ejemplo.

Se conocen muchas técnicas que emplean técnicas inmunológicas para la detección y cuantificación de una proteína

o fragmentos de proteínas. Se describen ejemplos de procedimientos para la detección de antígenos proteicos en muestras biológicas, incluidos los procedimientos que emplean tiras de inmersión u otros dispositivos de ensayo inmovilizados, por ejemplo en las siguientes patentes: Patentes EE. UU. Nos. 5.965.356 (seroensayo para tipo de virus del herpes simple); 6.114.179 (procedimiento y kit de prueba para la detección de antígenos y/o anticuerpos); y 6.057.097 (marcador para patologías que comprenden una reacción autoinmune y/o enfermedad inflamatoria). Estos procedimientos podrían adaptarse fácilmente para la detección de sVCAM y/o sMAdCAM.

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

Alternativamente, se puede usar un ensayo ELISA sandwich para detectar y cuantificar la sVCAM y/o sMAdCAM. Un formato ELISA tipo sándwich típico implica un anticuerpo de captura inmovilizado específico, una muestra, un anticuerpo de detección marcado, cromógenos y una solución de parada. El antígeno se unirá al anticuerpo de captura inmovilizado y, por lo tanto, puede detectarse con uno o más anticuerpos. La técnica de detección de anticuerpos utilizada con un ELISA puede ser directa o indirecta. Para la visualización directa de anticuerpos de la proteína sVCAM o sMAdCAM, el anticuerpo anti-sVCAM o anti-sMAdCAM se une a un sustrato, el sustrato se incuba con una muestra de fluido corporal, y el sustrato a continuación se incuba con otro anticuerpo anti-sVCAM o anti-sMAdCAM que ha sido conjugado con enzimas, por ejemplo, un anticuerpo anti-sVCAM o un anticuerpo anti-sMAdCAM conjugado con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Para la visualización indirecta de anticuerpos de la proteína sVCAM o sMAdCAM, se une un anticuerpo anti-sVCAM o anticuerpo anti-sMAdCAM al sustrato, y el sustrato se incuba con una muestra de fluido corporal. El sustrato se incuba a continuación con un anticuerpo no conjugado específico de sVCAM o específico de sMAdCAM (anticuerpo primario), a continuación, con un anticuerpo conjugado a enzima (anticuerpo secundario) que reconoce el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios para la detección indirecta de anticuerpos primarios a menudo se conjugan con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. A continuación, se agrega una solución de sustrato, que actúa sobre la enzima y produce un cambio de color. La intensidad del cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra original. Los anticuerpos primarios y secundarios también se pueden acoplar a etiquetas radiactivas o fluorescentes. La intensidad del marcado radiactivo o fluorescente es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra original.

Opcionalmente, se puede usar un análisis de detección de proteínas basado en microperlas (también llamado análisis de microesferas o análisis de perlas basado en flujo) para detectar sVCAM y/o sMAdCAM en muestras biológicas, como una muestra de suero de un individuo. Esta tecnología, representada por los sistemas desarrollados por Luminex Corporation (Austin, TX) y otros sistemas desarrollados por Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ), permite procesar una cantidad muy pequeña de muestra, típicamente 20 µl, para detectar una proteína, como sVCAM y/o sMAdCAM.

Un aspecto de este ensayo se basa en el acoplamiento de un anticuerpo de captura a microesferas que contienen cantidades específicas de, por ejemplo, un colorante rojo y un colorante infrarrojo. Después de la incubación de las microesferas con la muestra, un anticuerpo de detección secundario junto con biotina y estreptavidina junto con ficoeritrina, las perlas se analizan con un citómetro de flujo u otros sistemas de detección de fluorescencia basados en flujo. Un láser detecta las cuentas y un segundo detecta la intensidad de la ficoeritrina unida a esas cuentas (las notas técnicas están disponibles en Luminex Corp., por ejemplo, en su sitio web o en su catálogo).

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones representativas y aspectos de la presente divulgación y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

### Materiales y Procedimientos

#### *Inhibidores de la integrina alfa-4*

Inhibidores ejemplares de la integrina alfa-4 (Compuestos A-D) se muestran en la figura 1)

#### *Cuantificación de la concentración plasmática del Compuesto A*

El Compuesto A se midió usando un procedimiento LC/EM/MS. Tras la adición de un patrón interno, se extrajeron muestras de plasma (anticoagulante: heparina de litio) utilizando precipitación de proteínas (acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%). Después de la evaporación del sobrenadante filtrado a sequedad, y la reconstitución, los extractos se analizaron por LC-API/EM/EM. Las transiciones MRM (monitoreo de reacción múltiple) para el Compuesto A y el IS fueron m/z 257/114 y 270/91, respectivamente. El límite inferior de cuantificación fue 20 ng/mL.

#### **Conteo de linfocitos sanguíneos**

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

#### **Detección / cuantificación de la expresión de la integrina alfa-4**

Se recogió sangre completa en tubos que contenían la heparina de litio anticoagulante. Las muestras se tiñeron con el anticuerpo CD49d (alfa-4 integrina) anti-ratón marcado con AlexaFluor647 (Biolegend, San Diego, CA) durante 30 minutos. Los glóbulos rojos se lisaron (solución de lisis FACS, BD Biosciences, San José, CA) y las muestras se lavaron dos veces en PBS que contenía 5% suero bovino fetal. Las células teñidas se analizaron para detectar cambios en la intensidad de fluorescencia media geométrica usando un citómetro de flujo BD FACScan.

#### **20 Ejemplo 1 - sVCAM se reguló negativamente durante la inhibición de la integrina alfa-4 en varios modelos de enfermedad de ratas (con inhibidores de molécula pequeña)**

La inhibición de la integrina alfa-4 dio como resultado una regulación negativa de sVCAM en tres modelos de enfermedad inflamatoria en ratas. Los compuestos A y C son inhibidores de moléculas pequeñas pegiladas de la integrina alfa-4. El compuesto B es un inhibidor de molécula pequeña no pegilado de la integrina alfa-4. Todas las muestras de suero fueron analizadas por Rules Based Medicine, Inc (Austin, TX) con el ensayo RodentMAP, un inmunoensayo multiplexado a base de microesferas en un instrumento Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX) para determinar las cantidades de sVCAM en suero de rata. Las estadísticas se realizaron con ANOVA unidireccional.

30 **[0072]** Los resultados se presentan en la figura 2. Como se muestra en la figura 2A, las ratas Lewis fueron inyectadas intradérmicamente con médula espinal de cobaya y homogeneizado de materia blanca cerebral en adyuvante completo de Freund y tratadas por vía subcutánea con ciclosporina A (2 mg/kg cada dos días) durante 20 días para inducir encefalomiелitis autoinmune experimental crónica. El día 30 después de la inducción, las ratas se trataron con vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) o 10 mg/kg Compuesto C cada 3 días. El día 40 después de la inducción, se recogieron muestras de suero y se analizaron para determinar el contenido de sVCAM.

40 Como se muestra en la figura 2B, las ratas Sprague-Dawley fueron instiladas intrarrectalmente con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) para inducir colitis o etanol solo como control. En los días 1 y 4 después de la instilación de TNBS, las ratas se dosificaron por vía subcutánea con 10 mg/kg de Compuesto C. El día 5, se recogieron muestras de suero y se analizaron para determinar el contenido de sVCAM.

45 Como se muestra en la figura 2C y 2D, las ratas que portan un transgén HLA.B27 humano desarrollan espontáneamente síntomas de enfermedad inflamatoria intestinal a medida que envejecen. Las ratas transgénicas HLA.B27 se trataron por vía subcutánea con el Compuesto C (10 mg/kg cada 3 días), Compuesto A (10 mg/kg cada 5 días), Compuesto B (100 mg/kg dos veces al día), o vehículo (PBS) a las 16-20 semanas de edad. Se tomaron muestras de suero después de 20 (figura 2C) o 5 (figura 2D) días de tratamiento, y se evaluaron los niveles de sVCAM. La inhibición de la integrina alfa-4 en cada modelo de enfermedad inflamatoria probado resultó en una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de sVCAM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### **50 Ejemplo 2 - La inhibición de la integrina alfa-4 produce una reducción de sVCAM en ratas normales (con inhibidores de molécula pequeña)**

Para probar si la inhibición de la integrina alfa-4 regula los niveles de sVCAM en ausencia de enfermedad, se inyectó a las ratas normales (es decir, no enfermas) inhibidores de alfa-4 y se midieron los niveles de sVCAM. Las ratas Sprague Dawley se inyectaron por vía subcutánea con una sola dosis de 10 mg/kg del Compuesto A (figura 3A), una sola dosis de 10 mg/kg del Compuesto C (figura 3B), o una dosis de 100 mg/kg del Compuesto B dos veces al día durante cuatro días (figura 3C). Como se muestra en la figura 3A y 3B, se recogieron muestras de suero a los 2 y 11 días después de la inyección. Como se muestra en la figura 3C, se recogieron muestras de suero a las 2 horas, 12 horas y 11 días después de la inyección. Todas las muestras de suero se analizaron mediante un inmunoensayo RodentMAP basado en microesferas multiplexado en un instrumento Luminex para determinar las cantidades de sVCAM en suero de rata. Las estadísticas se realizaron con ANOVA unidireccional. Los tres inhibidores de la integrina alfa-4 regularon negativamente la sVCAM en ratas normales (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### **Ejemplo 3 - La inhibición de la integrina alfa-4 produce específicamente una reducción de sVCAM en ratones**

#### normales (con inhibidores de molécula pequeña)

Para determinar si la inhibición de la integrina alfa-4 resultó en la regulación negativa específica de la forma soluble de su ligando (es decir, sVCAM), y no la forma soluble de una molécula de adhesión que no es un ligando de la integrina alfa-4 (es decir, ICAM-1), ratones normales se probaron para la modulación de ambas moléculas de adhesión después del tratamiento con un inhibidor de la integrina alfa-4. A ratones Balb/c se les administró una única inyección subcutánea del Compuesto A (1 mg/kg o 10 mg/kg) o vehículo (PBS). Se tomaron muestras de plasma a las 8 horas, 2 días, 4 días y 8 días después de la dosis. Las muestras de plasma se analizaron por ELISA para detectar VCAM-1 soluble e ICAM-1 soluble utilizando kits disponibles comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN) (n = 4 ratón/grupo/punto en el tiempo). Como se muestra en la figura 4, el efecto de la inhibición de la integrina alfa-4 parecía ser específico de la forma soluble de su ligando (sVCAM) y no de la forma soluble de una molécula de adhesión que no es un ligando para la integrina alfa-4 (sICAM).

#### **Ejemplo 4 - El efecto de los inhibidores de la integrina alfa-4 en la regulación negativa de sVCAM depende de la dosis y se correlaciona con otros marcadores de inhibición de la integrina alfa-4**

La inhibición de la integrina alfa-4 da como resultado un aumento en el número de linfocitos circulantes y una regulación negativa de la integrina alfa-4 en la superficie de los leucocitos circulantes. Fue probada la correlación de los niveles de sVCAM con la expresión de la integrina alfa-4 y el conteo de linfocitos sanguíneos del inhibidor de la integrina alfa-4, así como la dependencia de la dosis de cada parámetro. Como se muestra en la figura 5A-C, los ratones Balb/c fueron dosificados por vía subcutánea con 0,1, 1 o 10 mg/kg de Compuesto A o vehículo (PBS). Dos días después de la dosificación, los animales fueron sacrificados y se extrajo sangre para analizar los niveles de sVCAM, la expresión de la integrina alfa-4 en la superficie de los leucocitos y la cantidad de linfocitos en la sangre. Muestras de plasma se analizaron para determinar el contenido de sVCAM usando ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) (figura 5A). A partir de los mismos animales, se tiñó una alícuota de sangre completa con anticuerpo anti-ratón CD49d (integrina alfa-4) marcada con AlexaFluor647 (Biolegend, San Diego, CA), se lisaron glóbulos rojos (solución de lisis FACS, BD Biosciences, San Jose, CA), y se analizaron los cambios en la intensidad de fluorescencia media usando un citómetro de flujo BD FACScan (figura 5B). De los mismos animales, se analizaron muestras de sangre completa para determinar el número de linfocitos usando un analizador Cell Dyn Hematology (Abbott Diagnostics, Illinois) (figura 5C). Se utilizó ANOVA unidireccional para determinar la significación estadística. Como se muestra en las figuras 5D-F, los ratones C57BL/6 fueron dosificados por vía subcutánea con 0,5, 1 o 3 mg/kg de Compuesto C o vehículo. Se extrajo sangre a las 4 horas y 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 y 21 días después de la dosis. Los niveles de VCAM soluble en plasma (figura 5D) y la expresión de la integrina alfa-4 en leucocitos sanguíneos (figura 5E) se analizaron como se describió anteriormente. Los niveles respectivos en animales tratados con vehículo (PBS) muestreados el día 2 después de la dosis se indican mediante líneas de puntos. La figura 5F muestra la correlación entre sVCAM y la expresión de la integrina alfa-4 por animal desde el día 1-21 puntos en el tiempo (n=4 ratones/grupo/punto en el tiempo). La regulación negativa de sVCAM por parte de los inhibidores de la integrina alfa-4 demostró ser dependiente de la dosis y se correlacionó bien tanto con la expresión de la integrina alfa-4 en la superficie de los leucocitos como con los conteos de linfocitos sanguíneos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### **Ejemplo 5 - La VCAM soluble también se reduce usando un inhibidor de anticuerpos de la integrina alfa-4**

Para demostrar que el efecto de la inhibición de la integrina alfa-4 en los niveles de sVCAM no es exclusivo de los inhibidores de molécula pequeña de la integrina alfa-4, se probó un inhibidor de anticuerpos de la integrina alfa-4 por su capacidad para modular los niveles de sVCAM. Como se muestra en la figura 6A, los ratones Balb/c recibieron una sola dosis intraperitoneal de 10 mg/kg de un anticuerpo de la integrina alfa-4 anti-ratón de rata (clon PS/2) o un anticuerpo de control de isotipo IgG2b de rata. Se tomaron muestras de sangre antes de la dosificación (sin tratamiento previo) y en los días 2, 4 y 7 posteriores a la dosis, y se analizó la VCAM soluble por ELISA. Una dosis de 10 mg/kg de PS/2, pero no el control de isotipo, provocó una regulación negativa sostenida de sVCAM en plasma. Como se muestra en la figura 6B, se realizó un estudio de seguimiento para evaluar la dosis y la dependencia del tiempo de la regulación negativa de sVCAM por un inhibidor de anticuerpos de la integrina alfa-4. Ratones C57BL/6 fueron tratados por vía intraperitoneal con dosis de 0,5, 1, 3 o 10 mg/kg de PS/2 o una dosis de 10 mg/kg de un anticuerpo de control de isotipo IgG2b de rata. Se recogieron muestras de plasma a las 4 horas y 1, 2, 4, 7, 10, 14 y 21 días después de la dosis y se analizaron los niveles de sVCAM. Los datos como se muestran en la figura 6 indican que la regulación negativa de sVCAM depende de la dosis de PS/2, y los niveles de sVCAM se recuperan con el tiempo. Las líneas punteadas indican niveles individuales de sVCAM en el día 2 en ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo (n=4 ratones/grupo/punto en el tiempo).

#### **Ejemplo 6 - Los niveles de sVCAM se regulan negativamente mediante un inhibidor de molécula pequeña no pegilado de la integrina alfa-4. Los niveles de sVCAM no se ven afectados solo por PEG**

Para demostrar el efecto de la inhibición de la integrina alfa-4 en los niveles de sVCAM no se limita a los inhibidores de moléculas pequeñas pegiladas, ni se produce por el propio PEG, los ratones normales se dosificaron con el Compuesto D (un inhibidor de la integrina alfa-4 no pegilada) y la línea principal de PEG en la que se construye el

Compuesto A. A los ratones Balb/c se les administró una dosis subcutánea única de vehículo (PBS), una dosis subcutánea única de Compuesto A (10 mg/kg), una dosis subcutánea única de la línea principal de PEG en la que se construye el Compuesto A (10 mg/kg), o 5 dosis subcutáneas del Compuesto D (50 mg/kg) cada 12 horas. Dos días después de la inyección del Compuesto A y PEG, y 4 horas después de la inyección final del Compuesto D, se tomaron 5 muestras de sangre. La sVCAM se midió por ELISA (R&D Systems) (figura 7A) y los linfocitos sanguíneos se cuantificaron usando un analizador de hematología Cell-Dyn (Abbott Diagnostics) (figura 7B). Las estadísticas se realizaron utilizando ANOVA unidireccional y se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los animales tratados con vehículo. Tanto el Compuesto A como el Compuesto D, pero no el PEG, pudieron provocar un aumento de los linfocitos sanguíneos y regular negativamente la sVCAM en plasma (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Ejemplo 7 - Los efectos de la inhibición de la integrina alfa-4 en los niveles de VCAM soluble dependen de la dosis y desaparecen a medida que disminuyen los niveles plasmáticos del inhibidor de la integrina alfa-4.**

15 Para determinar si la regulación de sVCAM por los inhibidores de la integrina alfa-4 está relacionada con el nivel de fármaco circulante, y si el efecto sobre sVCAM es reversible, estos parámetros se midieron durante un período de tres semanas después de la dosificación de ratones normales. Ratones C57BL/6 fueron dosificados por vía subcutánea con una sola dosis de 0,5, 1 o 3 mg/kg del Compuesto A o vehículo (PBS). Se tomaron muestras de sangre a las cuatro horas y 1, 2, 3, 4, 10, 14 y 21 días después de la dosis y se analizaron los niveles de sVCAM en plasma 20 mediante ELISA (las líneas punteadas indican los niveles de control del vehículo en el día 2) (figura 8A) y los niveles de Compuesto A en plasma usando un procedimiento LC/EM/EM (figura 8B). El límite de detección para el Compuesto A usando este procedimiento es 10 ng/ml. Los niveles de sVCAM y Compuesto A de los días 1-21 se representaron gráficamente por ratón para demostrar la correlación (figura 8C). En muestras donde el Compuesto A era indetectable, un valor de 10 ng/ml fue asignado ( $n=4$  ratones/grupo/punto en el tiempo). Los niveles de sVCAM se correlacionaron 25 bien con el nivel de fármaco circulante y volvieron a la línea base a medida que los niveles de fármaco se volvieron indetectables en plasma (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Ejemplo 8 - sMAdCAM se regula negativamente cuando se inhibe la integrina alfa-4 en modelos de colitis en ratones**

30 El Compuesto C es un inhibidor de molécula pequeña pegilada tanto de la integrina alfa-4 beta-1 como de la integrina alfa-4 beta-7. PS/2 es un anticuerpo de bloqueo de la integrina alfa-4 anti-ratón de rata. Ambos inhibidores de la integrina alfa-4 se administraron a ratones con formas inducidas de colitis. Muestras de suero se analizaron para determinar los niveles de sMAdCAM mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). En el primer modelo de colitis 35 en ratones, se aislaron células CD45RBhi CD4+ de bazo de Balb/c mediante la clasificación de células activadas por perlas magnéticas para células CD4+ (kit de aislamiento de células CD4+ sin tocar, Miltenyi Biotec) seguido de clasificación de células activadas por fluorescencia para células CD45RBhi. Se inyectaron células CD4+ CD45RBhi por vía intraperitoneal en ratones SCID. Los síntomas de colitis comenzaron a aparecer una semana después de la transferencia celular. Ocho semanas después de la transferencia, los animales fueron tratados con vehículo (PBS) o 40 Compuesto C (10mg/kg) cada 3 días por un período de 15 días. En este momento, se sacrificaron animales y se analizaron muestras de suero para determinar la sMAdCAM. Los resultados se muestran en la figura 9A. Las estadísticas que se muestran son en comparación con la transferencia CD45RBhi + grupo de vehículos. La transferencia de células aumentó significativamente la cantidad de sMAdCAM circulante. Los datos mostrados en la figura 9A indican que el tratamiento con el Compuesto C redujo estadísticamente de manera significativa los niveles 45 de sMAdCAM.

En un segundo modelo de ratón, se indujo colitis crónica en ratones Balb/c a través de la administración de 4% de Dextrano Sulfato de Sodio (DSS) en su agua potable durante 7 días, seguido de 7 días de agua corriente. Este ciclo se repitió cuatro veces. Los ratones mostraron síntomas de colitis durante cada ciclo DSS. En el día 56, los ratones 50 entraron en un estado de enfermedad crónica y comenzaron el tratamiento con vehículo (PBS) o Compuesto C (10 mg/kg) cada 3 días por 15 días. En este momento, se sacrificaron animales y se analizaron muestras de suero para determinar la sMAdCAM. Los resultados se muestran en la figura 9B. Las estadísticas que se muestran están en comparación con los niveles de sMAdCAM en ratones sin tratar. Los datos mostrados en la figura 9B indican que (1) DSS indujo un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de sMAdCAM en el suero, y (2) el tratamiento 55 con Compuesto C redujo estadísticamente de manera significativa los niveles de sMAdCAM.

En un tercer modelo de ratón, ratones Balb/c fueron administrados 3% de DSS en su agua potable durante 5 días para inducir colitis aguda. El día 6, el agua se cambió a agua corriente y los animales se dosificaron con el Compuesto C (10 mg/kg cada 3 días) o PS/2 (10mg/kg cada 5 días). El suero se recogió el día 14 y las muestras se analizaron para 60 determinar sMAdCAM. Los resultados se muestran en la figura 9C. En ambos grupos de tratamiento, el nivel de sMAdCAM estaba por debajo del límite de cuantificación (BQL) del ensayo (figura 9C). Estos experimentos demuestran que la inhibición de la integrina alfa-4 en modelos de colitis en ratones da como resultado una regulación negativa estadísticamente significativa de los niveles de sMAdCAM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Ejemplo 9 - sMAdCAM se regula negativamente cuando se inhibe la integrina alfa-4 en ratones normales con un inhibidor de molécula pequeña**

El compuesto D es un inhibidor de molécula pequeña de la integrina alfa-4 y se probó su capacidad para regular negativamente sMAdCAM en el plasma de ratones normales. A ratones Balb/c fueron administrados por vía subcutánea 50 mg/kg de Compuesto D o vehículo (PBS) cada 12 horas. Cuatro horas después de la 5a dosis, se tomó una muestra de plasma y se analizó la sMAdCAM por ELISA. Los resultados como se muestran en la figura 10 indican que el tratamiento con el Compuesto D da como resultado una regulación negativa estadísticamente significativa de sMAdCAM en plasma (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

**Ejemplo 10 - Un inhibidor de anticuerpos de las integrinas alfa-4 también da como resultado una modulación negativa de sMAdCAM en ratones normales**

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

**Ejemplo 11 - La regulación negativa de sMAdCAM por los inhibidores de la integrina alfa-4 depende de la dosis, es reversible y se correlaciona con la selectividad in vitro del inhibidor de la integrina alfa-4 para el heterodímero de integrina  $\alpha 4\beta 7$**

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

La figura 12A representa la selectividad in vitro de estos compuestos para  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$ . La inducción de epítomos específicos de  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  por los compuestos se midió usando el siguiente ensayo. Los linfocitos aislados de la sangre humana por gradiente de Ficoll se incubaron con una valoración del Compuesto A o Compuesto C en PBS con 5% de FBS y 10 mg/ml de 2G3 (anticuerpo anti-beta-7 inducido por ligando) o 15/7 (anticuerpo anti-beta-1 inducido por ligando). Después de la incubación con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con PE, la inducción del epítomo se midió por citometría de flujo. Los datos se expresan como % de unión. Los datos como se muestran en la figura 12A indican que (1) el Compuesto C se une tanto a la integrina  $\alpha 4\beta 1$  como a la  $\alpha 4\beta 7$  con igual potencia; y (2) el Compuesto A es 100 veces más selectivo en la unión a  $\alpha 4\beta 1$  sobre  $\alpha 4\beta 7$ .

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

Para medir la relación dosis/tiempo de la regulación negativa de sMAdCAM por inhibición de  $\alpha 4\beta 7$ , tanto el Compuesto A (figura 12C) como el Compuesto C (figura 12D) se dosificaron por vía subcutánea para C57BL/6 ratones a 0.5, 1 y 3 mg/kg, y se recogió plasma a las 4 horas y 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 y 21 días después de la dosis. Las líneas punteadas indican los niveles de sMAdCAM en animales tratados con vehículo en el día 2 (n=4 ratones/grupo/punto en el tiempo). Como se muestra en la figura 12D, Compuesto C, el inhibidor de la integrina pan-alfa-4, sMAdCAM regulado negativamente en mayor medida que el Compuesto A que es un inhibidor selectivo de  $\alpha 4\beta 1$ . Esto sugiere que la inhibición de  $\alpha 4\beta 7$  es necesaria para evocar la regulación negativa de sMAdCAM. Además, los niveles de MAdCAM se recuperan a niveles de referencia con el tiempo.

Como se muestra en las figuras 12E y 12F, se midió sVCAM en muestras tomadas de los mismos animales que anteriormente mediante ELISA (R&D Systems). Las líneas punteadas indican los niveles de sVCAM en animales tratados con vehículo en el día 2 (n=4 ratones/grupo/punto en el tiempo). Tanto el Compuesto A como el Compuesto

C fueron igualmente potentes en la regulación negativa de sVCAM en muestras de plasma, evocando la selectividad similar de estos compuestos para  $\alpha 4\beta 1$ , el ligando VCAM. En general, estos datos indican que la selectividad *in vitro* para  $\alpha 4\beta 7$  o  $\alpha 4\beta 1$  se refleja *in vivo* mediante regulación negativa de sMAdCAM o sVCAM, respectivamente.

- 5 La selectividad del Compuesto A como se discutió anteriormente se verificó adicionalmente en sujetos humanos. Para esto, se administraron cuarenta y un individuos por vía oral con el Compuesto A a 0,5 mg/kg. Se recogió sangre completa en varios puntos en el tiempo después de la dosis (hasta 28 días después de la dosis). Los niveles de sVCAM y sMAdCAM se cuantificaron por ELISA como se describió anteriormente. Se sabía que el compuesto A bloqueaba la unión de 9F10 a las integrinas alfa-4. Los niveles de expresión de  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  se determinaron midiendo la intensidad
- 10 media de fluorocromo (MFI) de los glóbulos blancos incubados con un 9F10 marcado con fluorescencia (un anticuerpo de la integrina alfa-4 antihumana de ratón). También se sabía que el Compuesto A, al unirse a los receptores de integrina, induce la expresión de epítomos específicos del sitio de unión inducido por ligando en las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 7$ , que son reconocida por los anticuerpos monoclonales de ratón 15/7 y 2G3 (como se describió anteriormente). Los niveles de saturación de  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  se determinaron utilizando fluorescencia etiquetada 15/7 y anticuerpos 2G3, y
- 15 calculados como sigue:

$$\% \text{saturación} = \frac{\text{MFI}_{\text{muestra de prueba}} - \text{MFI}_{\text{de fondo}}}{\text{MFI}_{\text{de control saturado}} - \text{MFI}_{\text{de fondo}}}$$

- Los datos se presentan en la figura 13. La figura 13A indica que administrar el Compuesto A en sujetos humanos da como resultado una disminución marcada de los niveles de expresión de  $\alpha 4\beta 1$  desde 1 día después de la dosis hasta al menos 14 días después de la dosis. Los niveles de  $\alpha 4\beta 1$  vuelven al nivel base aproximadamente 7 días después de la dosis. La figura 13B muestra que  $\alpha 4\beta 1$  se satura unos dos días después de administrar el Compuesto A, y la saturación dura al menos otros 13 días (15 días después de la dosis). Los niveles de saturación de  $\alpha 4\beta 7$ , sin embargo, disminuyen significativamente 8 días después de la administración. Como se muestra en la figura 13C, los niveles de
- 25 sVCAM disminuyen significativamente 1 día después de la administración y comienzan a regresar a la línea base (antes de la administración) 14 días después de la administración. Los niveles de sMAdCAM, sin embargo, permanecen cerca del nivel base incluso 28 días después de la administración. Estos datos son consistentes con la observación *in vitro* anterior de que el Compuesto A es más selectivo en la unión a  $\alpha 4\beta 1$  sobre  $\alpha 4\beta 7$ .

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

- Treinta y ocho (38) ratones (C57BL/6) fueron administrados intraperitonealmente con varias cantidades de PS/2 (un anticuerpo de la integrina anti-alfa-4). Se recogieron muestras de plasma en varios puntos en el tiempo después de la
- 35 dosis. Los niveles de sVCAM, los niveles de sMAdCAM y los niveles de PS/2 en las muestras de plasma se analizaron por procedimientos ELISA como se describió en los ejemplos anteriores. Los niveles de sVCAM y sMAdCAM (% vehículo promedio) se grafican contra las concentraciones de PS/2, como se muestra en la figura 14. Los resultados indican fuertes correlaciones lineales negativas para ambos sVCAM ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,0001$ ) y sMAdCAM ( $r = -0,42$ ;  $p < 0,0041$ ), a saber, la concentración más alta del anticuerpo de la integrina anti-alfa-4 (correspondiente a un mayor
- 40 nivel de inhibición de las integrinas alfa-4), el nivel más bajo de sVCAM o sMAdCAM.

Varias modificaciones y variaciones de los procedimientos y el sistema descritos de la descripción serán evidentes para los expertos en la materia. Aunque la descripción se ha descrito en relación con realizaciones representativas específicas, debe entenderse que el tema como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones

45 específicas.

Las realizaciones de la presente descripción describen un procedimiento para monitorear el cambio de las actividades de la integrina alfa-4 en un individuo correlacionando con los niveles de moléculas de adhesión a células vasculares solubles (sVCAM) y/o de moléculas de adhesión a células de adhesina mucosa soluble (sMAdCAM).

- 50 Por ejemplo, las realizaciones de la presente descripción (1) proporcionan un procedimiento *in vitro* para determinar una diferencia en la actividad de la integrina alfa-4 en un individuo, que comprende: a) medir una molécula soluble en una primera muestra biológica obtenida del individuo inmediatamente antes de la administración de un inhibidor de la integrina alfa-4; b) medir la molécula soluble en una segunda muestra biológica, donde la segunda muestra biológica
- 55 se obtuvo del individuo dentro de los treinta y un días después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4; y c) determinar si hay una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica, donde la disminución se correlaciona con una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo, y así determinar si hay una diferencia en actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 en comparación con antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4, y
- 60 donde la molécula soluble es sVCAM y/o sMAdCAM..

- (2) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento del (1) anterior, que comprende además detectar una disminución en los niveles de la molécula soluble en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica, y atribuir dicha disminución a una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 en comparación con  
5 antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4.
- (3) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de los (1) o (2) anteriores, donde la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-1, y donde la molécula soluble es  
10 sVCAM.
- (4) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de los (1) o (2) anteriores, donde la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-7, y donde la molécula soluble es  
sMAdCAM.
- (5) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de cualquiera de los (1)-(4)  
15 anteriores, donde el individuo tiene una enfermedad o trastorno asociado con una inflamación patológica o crónica.
- (6) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento del (5) anterior, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple (EM), meningitis, encefalitis,  
20 enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide (AR), asma, diabetes juvenil aguda, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones por anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos.
- (7) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de cualquiera de los (1)-(6)  
25 anteriores, donde el inhibidor de la integrina alfa-4 es un anticuerpo.
- (8) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un procedimiento de cualquiera de los (1)-(7)  
anteriores, donde la primera y/o la segunda muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en un  
30 tejido, una célula y un fluido corporal.
- (9) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento del (8) anterior, donde la primera y/o la segunda muestra biológica es un fluido corporal seleccionado de entre el grupo que consiste en sangre, linfa, suero, plasma, orina, semen, fluido sinovial, saliva, lágrimas, lavado broncoalveolar y fluido cefalorraquídeo.
- (10) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un procedimiento del (8) anterior, donde la  
35 primera y/o la segunda muestra biológica está en forma de plasma o suero congelado.
- (11) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de cualquiera de los (1)-(10)  
anteriores, donde la segunda muestra biológica se obtiene del individuo un día después de la administración del  
40 inhibidor de la integrina alfa-4.
- (12) Las realizaciones de la presente divulgación también proporcionan un procedimiento de cualquiera de los (1)-(11)  
anteriores, donde la molécula soluble se mide mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste  
45 en ensayos de inmunosorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), Western blot y ensayo de detección de proteínas basado en microperlas.
- (13) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de cualquiera de los (1)-(12)  
anteriores, que comprende además determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo, donde no hay  
50 disminución o hay una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica que indican una respuesta ineficaz al inhibidor de la integrina alfa-4, requiriendo un ajuste del tratamiento del individuo.
- (14) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento del (13) anterior, que  
55 comprende además no detectar ninguna disminución, o detectar una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ), en el nivel de la molécula soluble en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica, y concluyendo que se requiere un ajuste del tratamiento del individuo.
- (15) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un procedimiento de los (13) o (14) anteriores,  
60 donde el ajuste del tratamiento comprende cambiar a un inhibidor de la integrina alfa-4 diferente o aumentar la dosis del inhibidor de la integrina alfa-4.
- (16) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como un biomarcador farmacodinámico para la actividad de (i) la integrina alfa-4 o (ii) un modulador de la actividad de la integrina alfa-4.

(17) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un uso del (16) anterior, que comprende el uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM como biomarcador farmacodinámico para dicha actividad en un individuo que recibe tratamiento con un modulador de la actividad de la integrina alfa-4.

5

(18) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un uso del (17) anterior, donde el modulador es un inhibidor de la integrina alfa-4.

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

10  
15

(20) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un uso de cualquiera de los (16)-(19) anteriores, donde la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-1, y donde el biomarcador farmacodinámico es sVCAM.

(21) Las realizaciones de la presente descripción también proporcionan un uso de cualquiera de los (16)-(19) anteriores, donde la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-7, y donde el biomarcador farmacodinámico es sMAdCAM.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para determinar una diferencia en la actividad de la integrina alfa-4 en un individuo con una enfermedad o trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende:
- 5
- a) medir una molécula soluble en una primera muestra biológica de fluido corporal seleccionada de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma y obtenida del individuo inmediatamente antes de la administración de un inhibidor de la integrina alfa-4;
- 10
- b) medir la molécula soluble en una segunda muestra biológica, donde la segunda muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma y se ha obtenido del individuo dentro de los treinta y un días después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4;
- 15
- c) determinar si hay una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica, donde la disminución se correlaciona con una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo y, por lo tanto, determinar si hay una diferencia en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 en comparación con antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4; y
- 20
- d) determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo,
- donde ninguna disminución o una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica indica una respuesta ineficaz al inhibidor de la integrina alfa-4 que requiere un ajuste del tratamiento del individuo,
- 25
- donde la molécula soluble es sVCAM y/o sMAdCAM, y
- donde el inhibidor de la integrina alfa-4 es un anticuerpo de la integrina anti-alfa-4.
- 30
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además detectar una disminución en los niveles de la molécula soluble en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica y atribuir dicha disminución a una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 comparada con antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4.
- 35
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-7 y donde la molécula soluble es sMAdCAM.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente y esclerosis múltiple progresiva crónica, preferiblemente donde la enfermedad o trastorno es esclerosis múltiple recurrente.
- 40
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo de la integrina anti-alfa-4 es natalizumab.
- 45
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la primera y/o la segunda muestra biológica está en forma de plasma o suero congelado.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la segunda muestra biológica se obtiene del individuo un día después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4.
- 50
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula soluble se mide mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en ensayos de inmunosorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), Western blot y ensayo de detección de proteínas basado en microperlas.
- 55
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende no detectar ninguna disminución o detectar una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ) en los niveles de la molécula soluble en la primera muestra biológica en comparación con la segunda muestra biológica y determinar que se requiere un ajuste del tratamiento del individuo.
- 60
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ajuste del tratamiento comprende cambiar a un inhibidor de la integrina alfa-4 diferente o aumentar la dosis del inhibidor de la integrina alfa-4.

11. El uso *in vitro* de sVCAM y/o sMAdCAM en un individuo tratado con un inhibidor de la integrina alfa-4 como un biomarcador farmacodinámico para la actividad de (i) la integrina alfa-4 o (ii) el inhibidor de la integrina alfa-4, teniendo dicho individuo una enfermedad o trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste de esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal, donde el uso comprende:

5

a) medir sVCAM y/o sMAdCAM en una primera muestra biológica seleccionada de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma y obtenida de un fluido corporal del individuo inmediatamente antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4;

10

b) medir sVCAM y/o sMAdCAM en una segunda muestra biológica seleccionada de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma y obtenida de un fluido corporal del individuo dentro de los treinta y un días después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4;

15

c) determinar si hay una disminución en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica, donde la disminución se correlaciona con una disminución en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo y, por lo tanto, determinar si hay una diferencia en la actividad de la integrina alfa-4 en el individuo después de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4 en comparación con antes de la administración del inhibidor de la integrina alfa-4; y

20

d) determinar si se requiere un ajuste en el tratamiento del individuo,

donde ninguna disminución o una disminución estadísticamente insignificante ( $p > 0,05$ ) en los niveles de la molécula soluble entre la primera y la segunda muestra biológica indica una respuesta ineficaz al inhibidor de la integrina alfa-4 que requiere un ajuste del tratamiento del individuo,

25

donde el inhibidor de la integrina alfa-4 es un anticuerpo de la integrina anti-alfa-4.

12. Uso según la reivindicación 11, donde el individuo tiene una enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple recurrente y esclerosis múltiple progresiva crónica, preferiblemente donde el individuo tiene esclerosis múltiple recurrente.

30

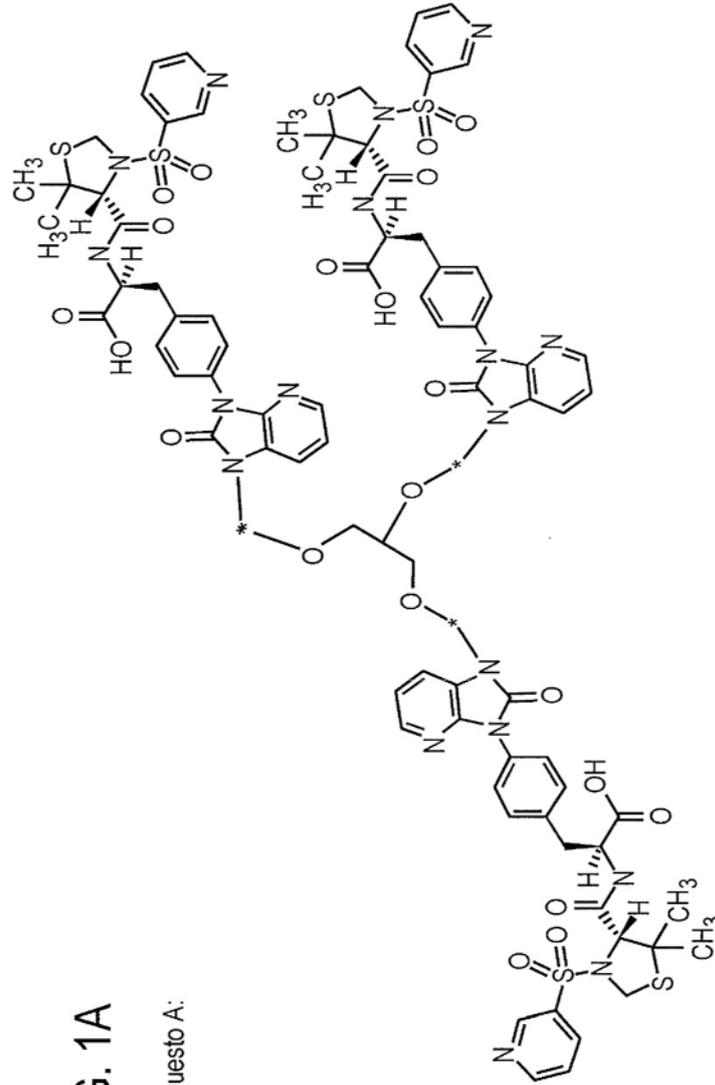
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, donde la actividad de la integrina alfa-4 es la actividad de la integrina alfa-4 beta-7 y donde el biomarcador farmacodinámico es sMAdCAM.

35

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el anticuerpo de la integrina anti-alfa-4 es natalizumab.

FIG. 1A

Compuesto A:



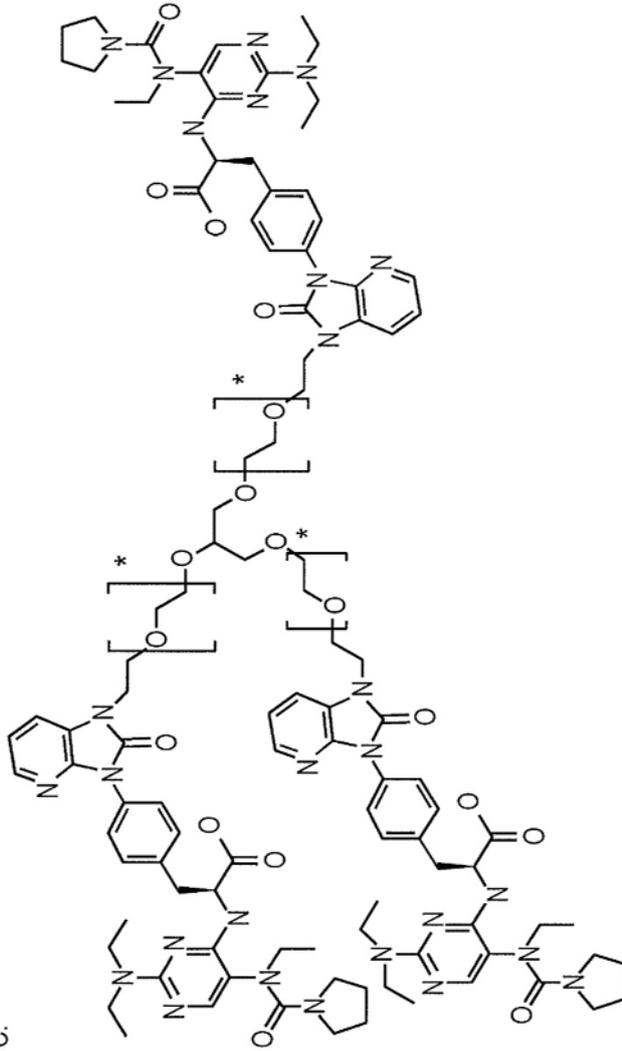
"\*\*" representa conjuntos repetitivos de etilenglicol que proporcionan un peso molecular total de aproximadamente 40 kDa distribuido entre los tres brazos de PEG

Compuesto B:

(S)-2-(2-(diethylamino)-5-(N-isopropylmethylsulfonamido)pyrimidin-4-ylamino)-3-(4-(pirrolidina 1-carboxiloxi)fenil)ácido propanoico

FIG. 1B

Compuesto C:



Compuesto D:

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

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

FIG. 2A

Encefalomiелitis Autoimmune  
Experimental

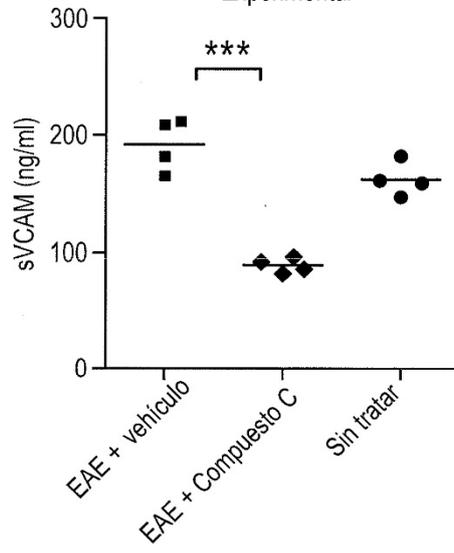
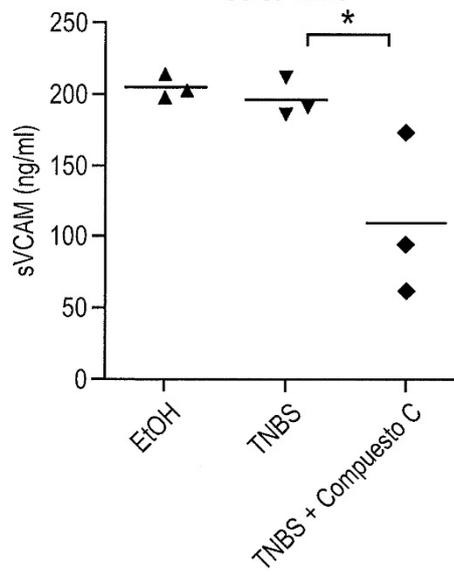
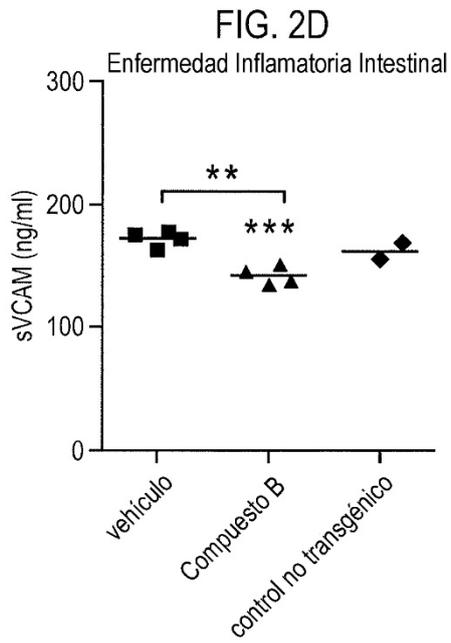
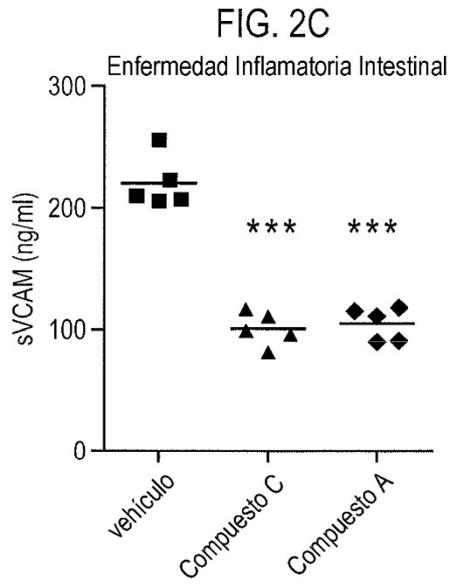
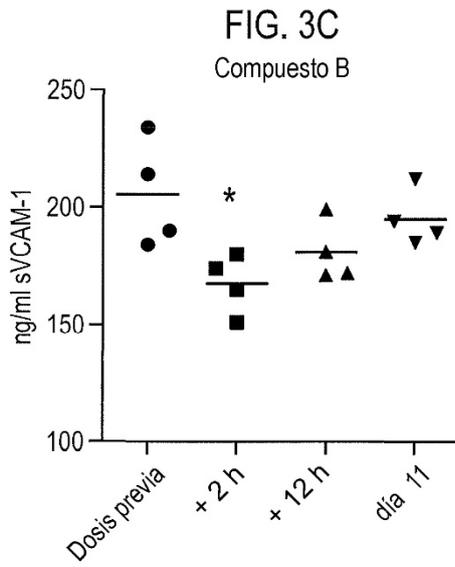
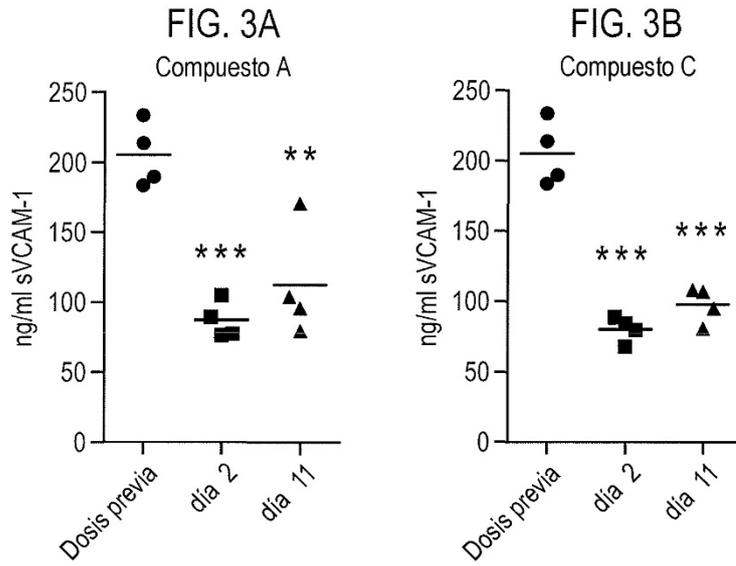


FIG. 2B

Colitis TNBS







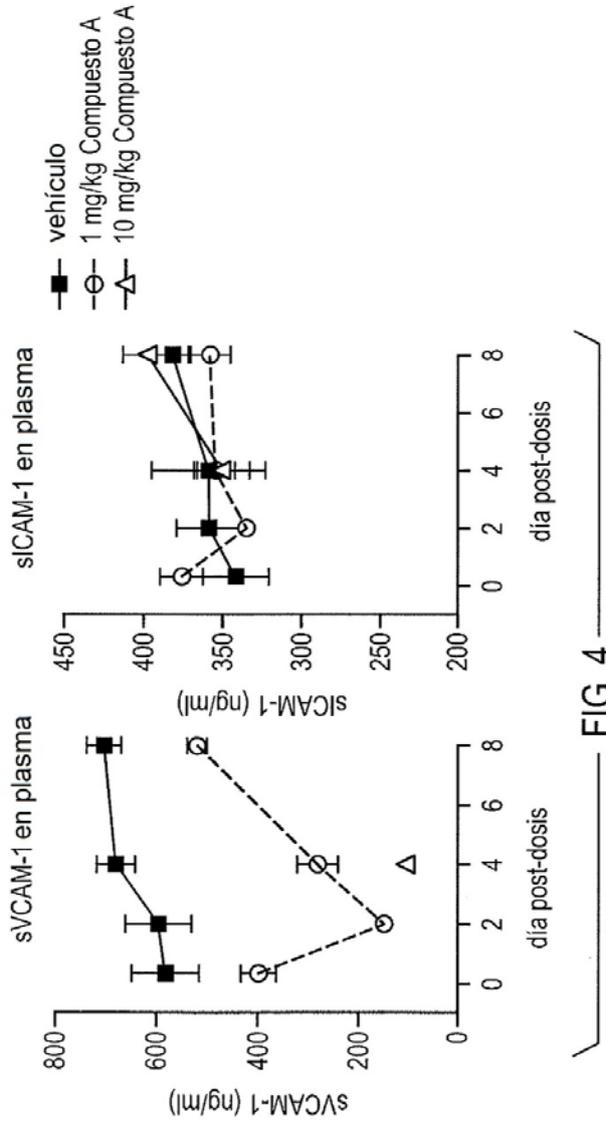


FIG. 4

FIG. 5A

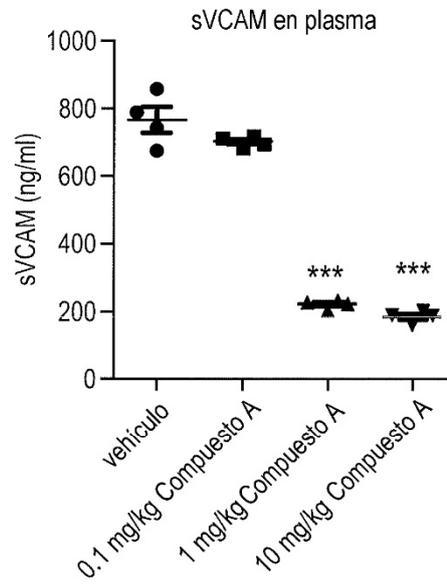
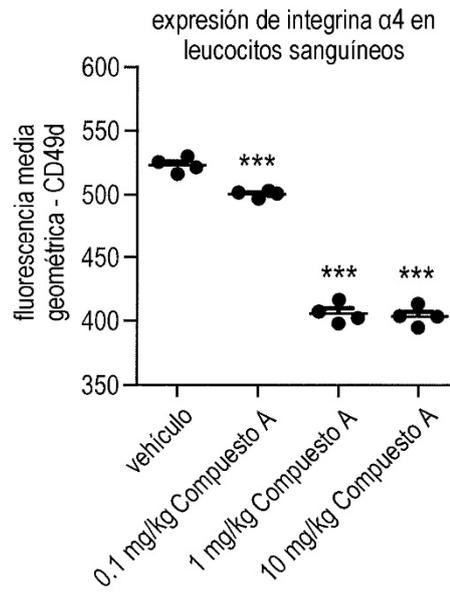


FIG. 5B



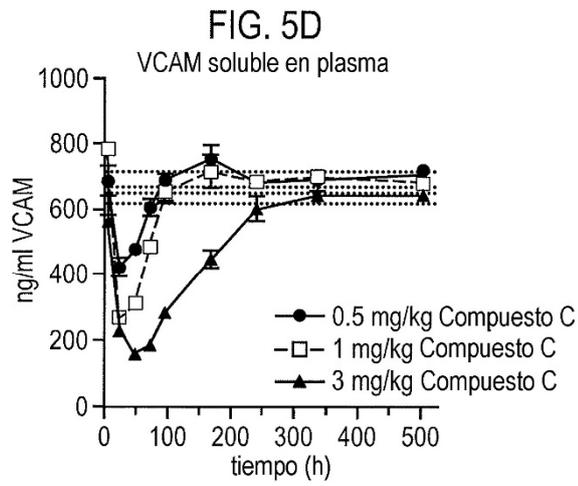
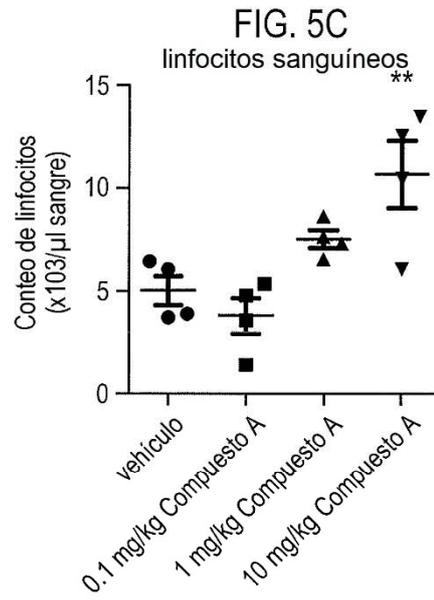


FIG. 5E

expresión de  $\alpha 4$  en leucocitos sanguíneos

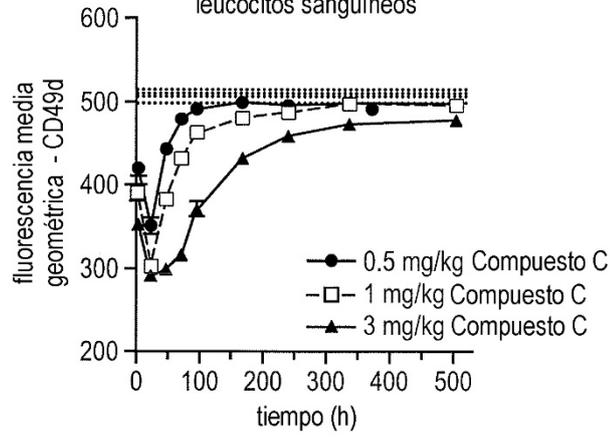
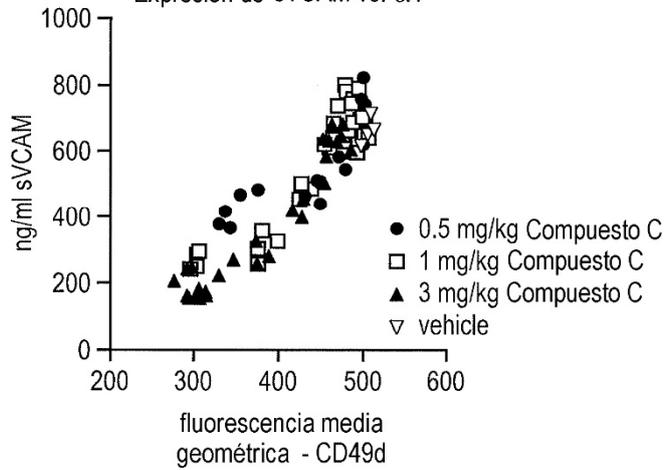
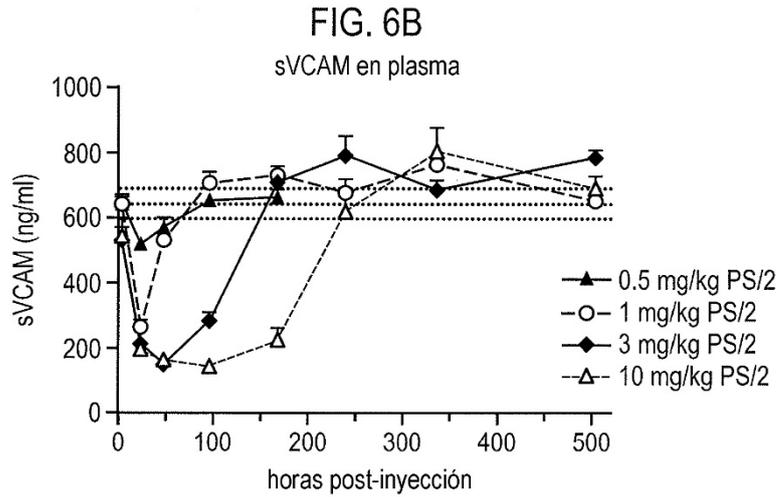
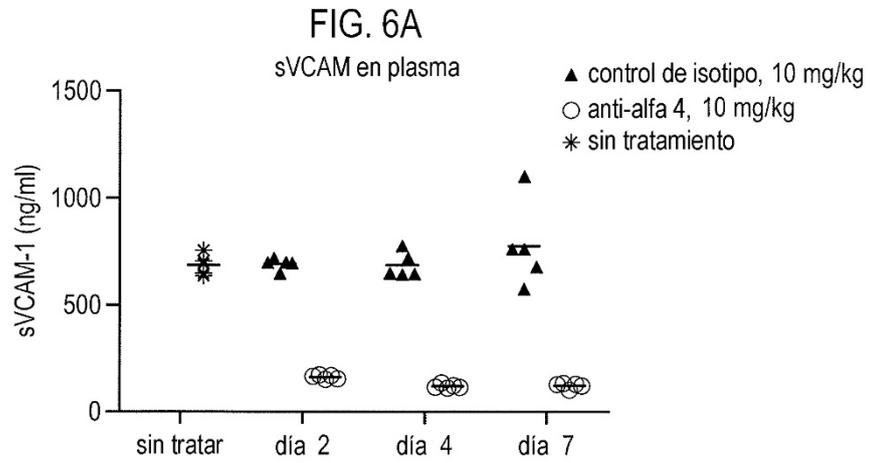


FIG. 5F

Expresión de sVCAM vs.  $\alpha 4$





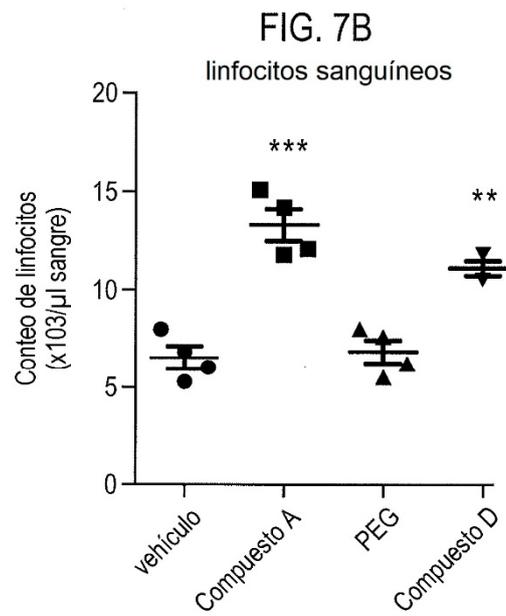
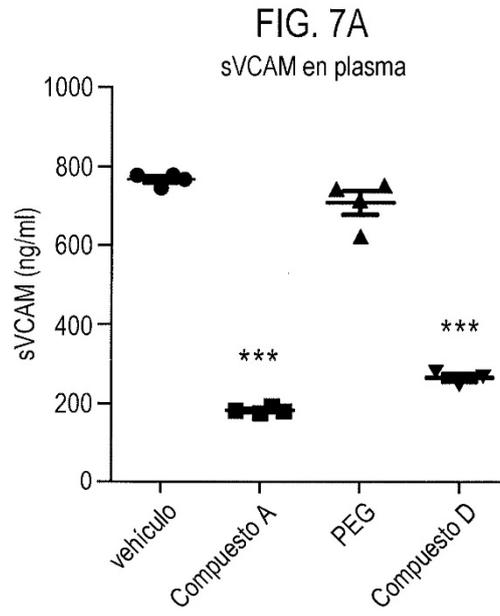


FIG. 8A

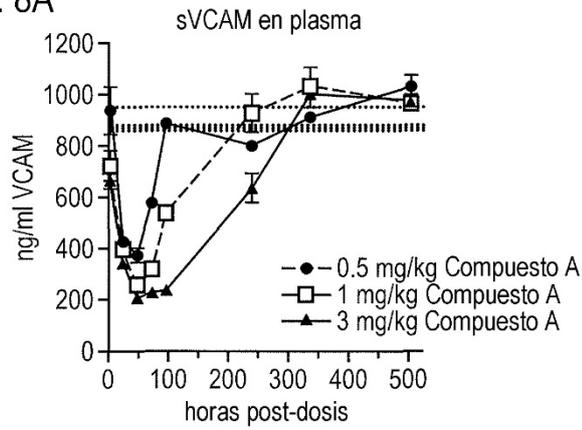


FIG. 8B

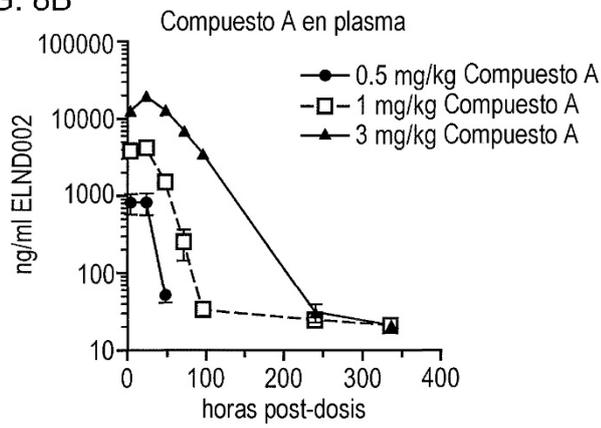
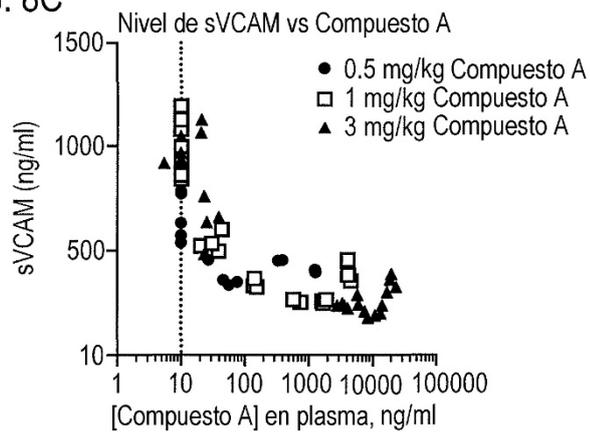


FIG. 8C



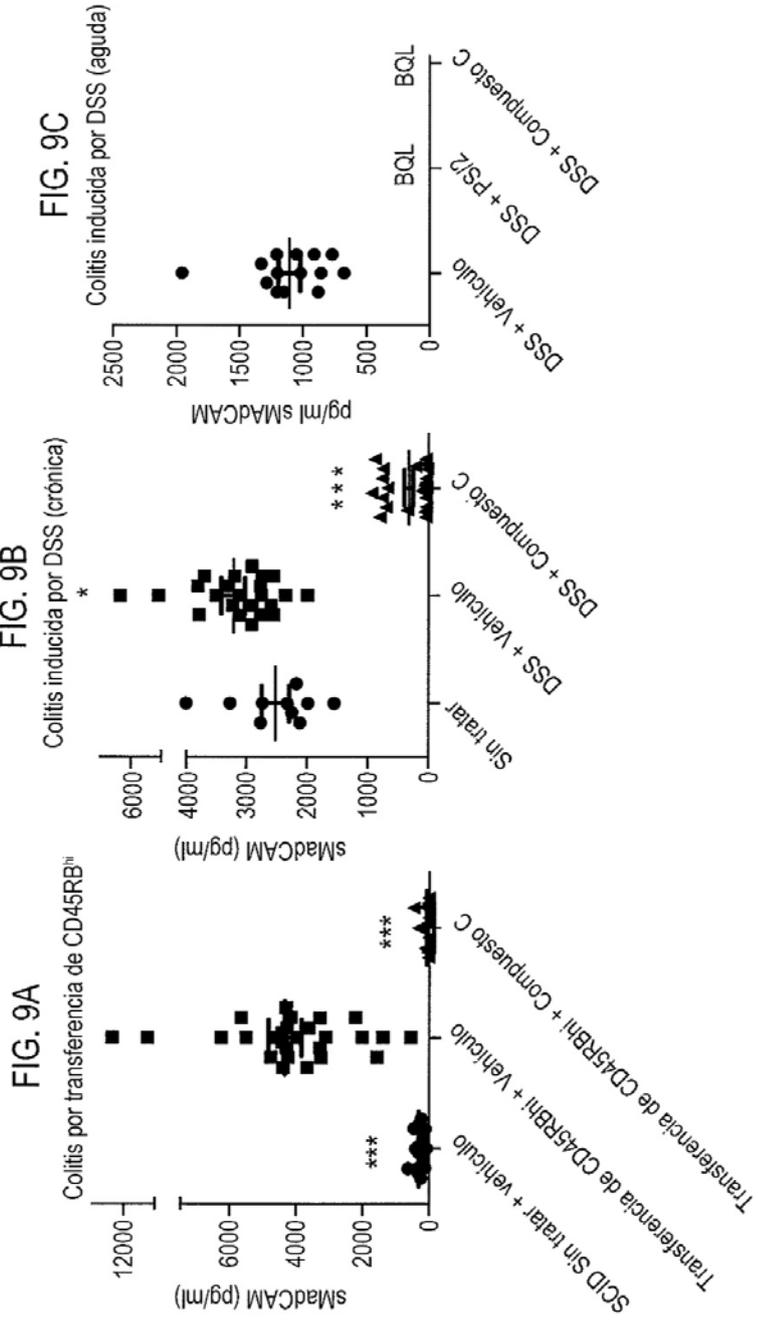


FIG. 10

sMAdCAM en plasma

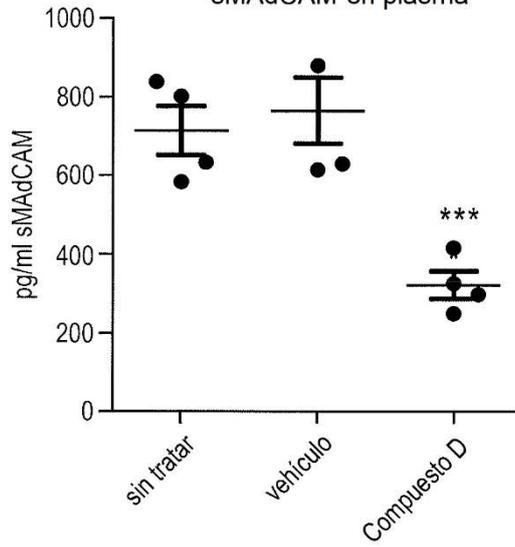


FIG. 11

sMAdCAM en plasma

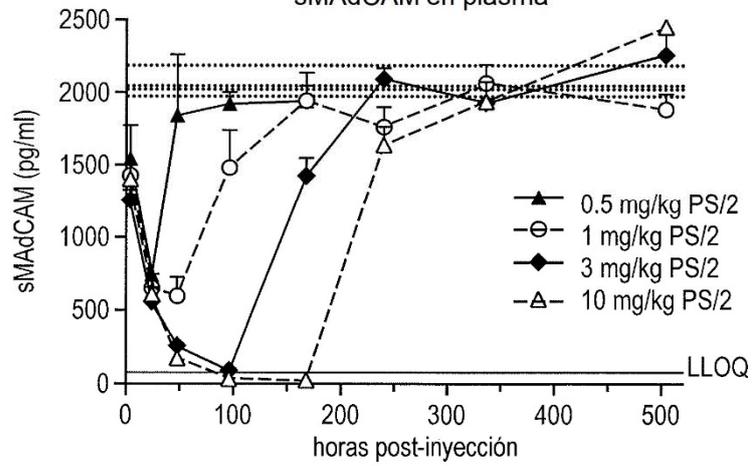


FIG. 12A

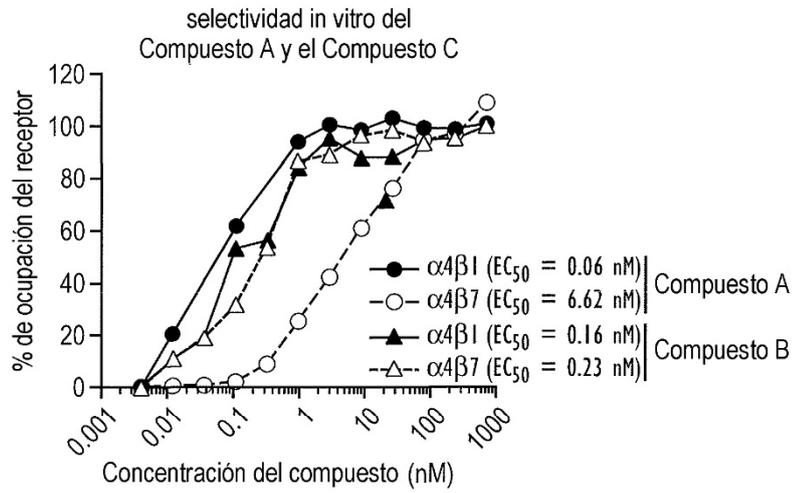


FIG. 12B

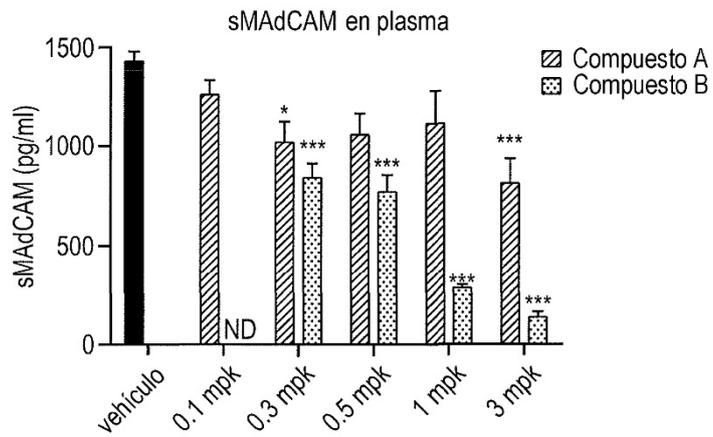


FIG. 12C

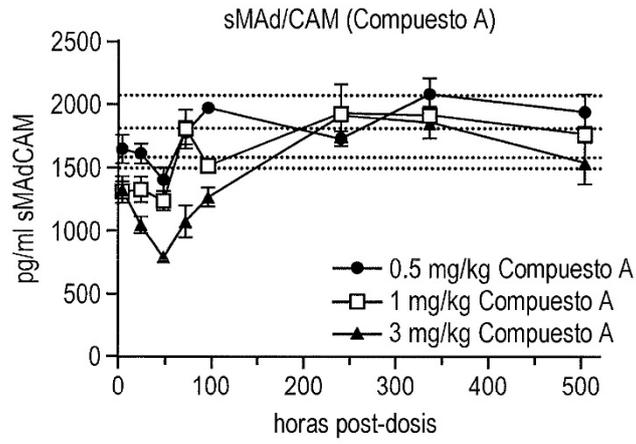


FIG. 12D

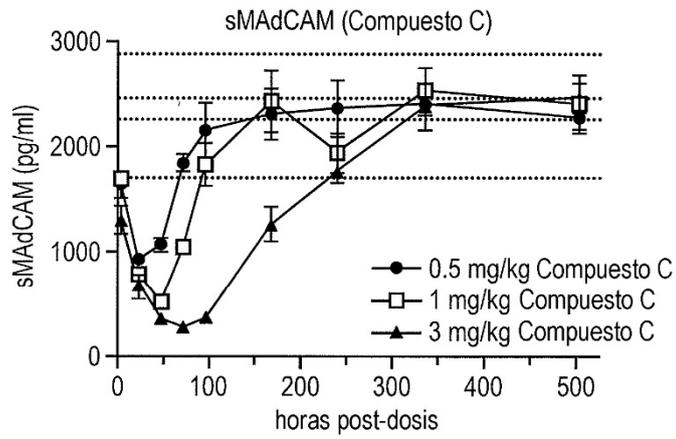


FIG. 12E

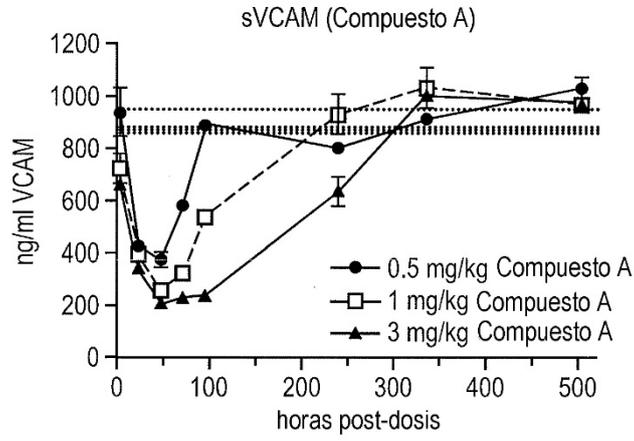


FIG. 12F

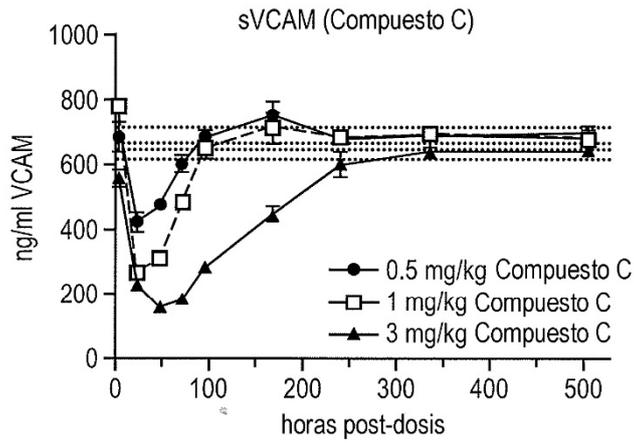


FIG. 13A

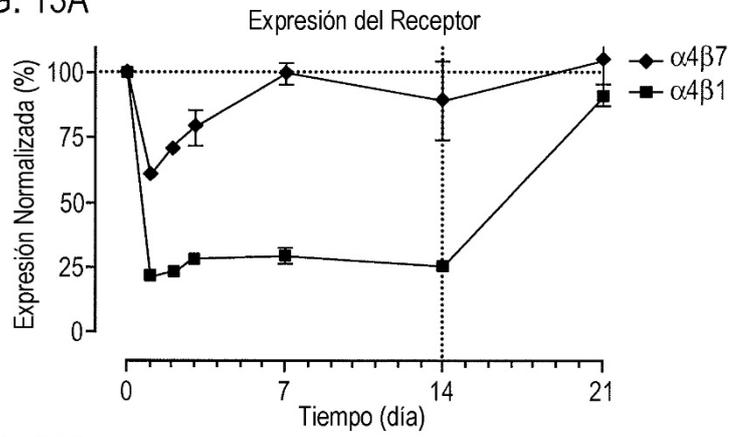


FIG. 13B

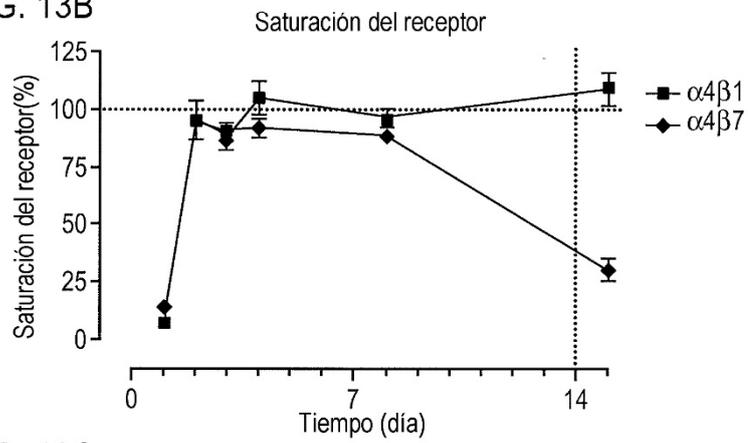
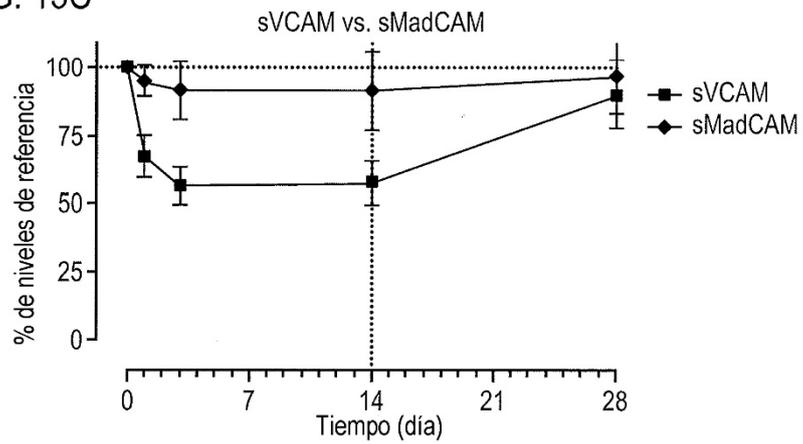


FIG. 13C



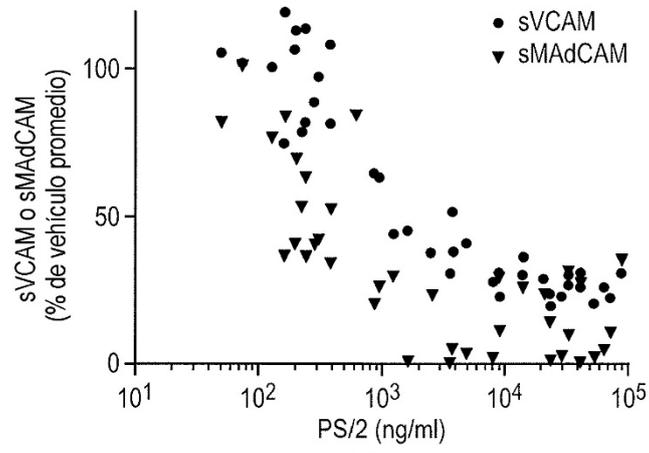


FIG. 14