

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-95478

54. TITULO Administración de agentes para
el tratamiento de inflamación.

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE Elan Pharmaceuticals, Inc.

DOMICILIO South San Francisco, California, Estados Unidos

74. APODERADO Dilia Maria Rodriguez D'Alencar

22. BOGOTA, D.C., Sept. 24, 2004

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: ELAN PHARMACEUTICALS, INC. Dirección: 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 USA Nacionalidad o domicilio: San Francisco, California, USA Lugar de constitución: San Francisco, California, USA		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO Cual _____
	Teléfono: Fax: E. Mail:		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Santafé de Bogotá D.C. Teléfono: 6350835 Fax: 6350824 E. Mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. TAYLOR, Julie; 2. YEDNOCK, Ted, A. Dirección: 1. 1506 7th Avenue, San Francisco, CA 94122, USA; 2. 184 Arroyo Road, Forest Knolls, CA 94933 USA Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, Estadounidenses		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US03/05421 Fecha: Febrero 25, 2003 Publicación Internacional No. WO 03/072040 A2 Fecha: Sept. 4, 2003			
6) Título (54) ADMINISTRACIÓN DE AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE INFLAMACIÓN			
7) Clasificación Internacional: A64K A61P 29/00			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	Estados Unidos	Febrero 25, 2002	60/360,134
	Estados Unidos	Abril 23, 2002	60/374,501
SI ☒ NO ☐			
9) Comprobante de pago N°. 04-73,002 Fecha: Septiembre 13, 2004			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04035470 00000000 Folios: 304
Fecha (AMB): 2004-09-24 17:23:36
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FISE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 73,002
FECHA : SEPTIEMBRE 13 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE TIPO PAGO BANCO CUENTA No. PAGO FECHA PAGO Vr. PAGO

CLARKE NODET Y CO. COLOMBCONSIGNACION BANCO POPULAR 050-00110-6 31534149 13/09/2004 1,368,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 30003-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2678

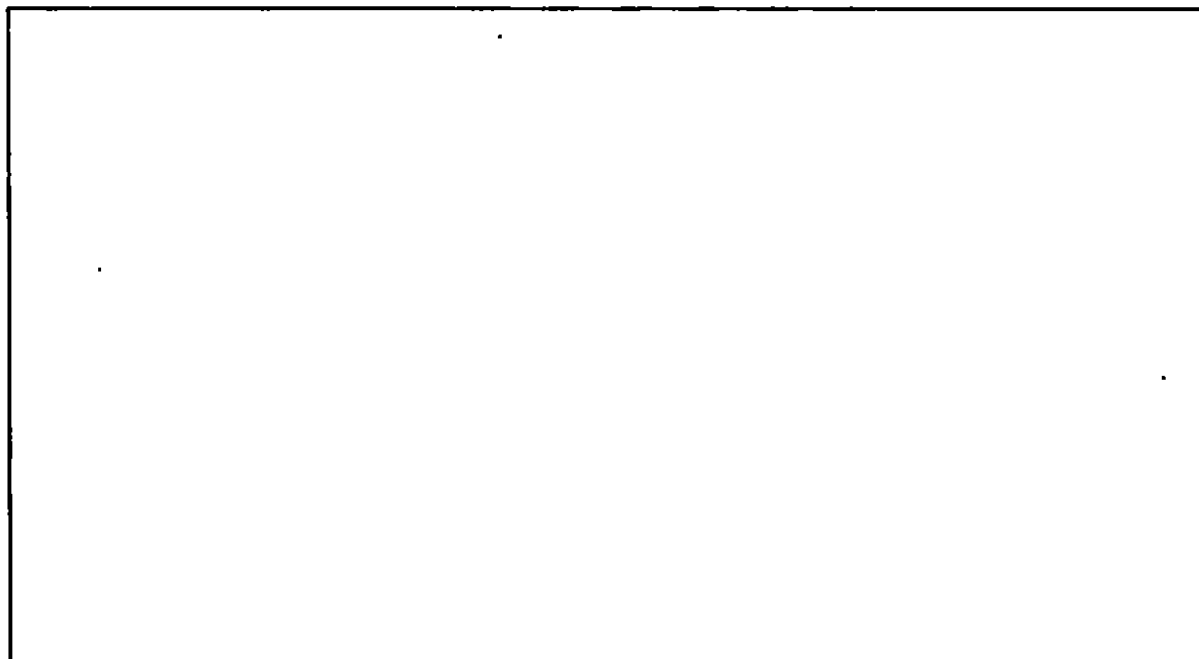
3

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros
 1. Reporte Internacional de búsqueda
 2. Notificación de países designados
 3. Notificación de la transmisión de la prioridad
 4. Notificación del recibo de la copia

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/072040 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K
- (21) International Application Number: PCT/US03/05421
- (22) International Filing Date: 25 February 2003 (25.02.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/360,134 25 February 2002 (25.02.2002) US
60/374,501 23 April 2002 (23.04.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): ELAN PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

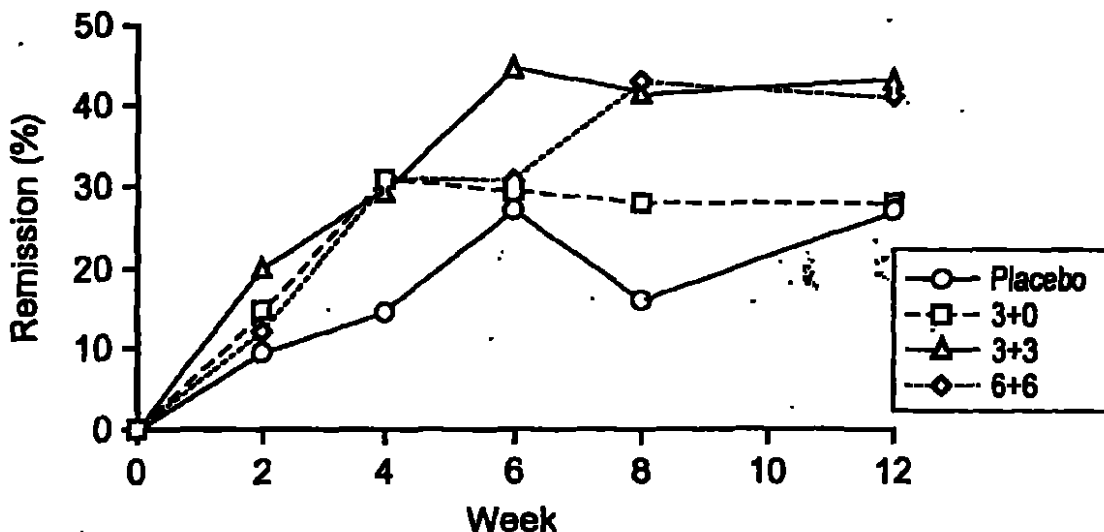
Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. ARIPO patents (GH, GM, KE, LS,

[Continued on next page]

(54) Title: ADMINISTRATION OF AGENTS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATION

Remission in the CD Study



(57) Abstract: A method of chronically reducing a patient's pathological inflammation via the administration of an agent that specifically binds to an alpha-4 integrin or a dimer comprising an alpha-4 integrin is disclosed. The agent provided must have a binding affinity such that administration is sufficient to suppress pathological inflammation, and the agent is administered chronically to provide long-term suppression of pathological inflammation.



MT, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

ADMINISTRATION OF AGENTS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATION

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates generally to agents that specifically bind to and inhibit an
5 integrin receptor comprising an alpha-4 ($\alpha 4$) subunit, and therapeutic uses of the same.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Inflammation is a response of vascularized tissues to infection or injury and is
affected by adhesion of leukocytes to the endothelial cells of blood vessels and their
10 infiltration into the surrounding tissues. In normal inflammation, the infiltrating leukocytes
release toxic mediators to kill invading organisms, phagocytize debris and dead cells, and
play a role in tissue repair and the immune response. However, in pathological inflammation,
infiltrating leukocytes are over-responsive and can cause serious or fatal damage. See, e.g.,
Hickey, *Psychoneuroimmunology II* (Academic Press 1990).

15 The integrins are a family of cell-surface glycoproteins involved in cell-adhesion,
immune cell migration and activation. Alpha-4 integrin is expressed by all circulating
leukocytes except neutrophils, and forms heterodimeric receptors in conjunction with either
the beta1 or beta7 integrin subunits; both alpha-4 beta-1 ($\alpha 4 \beta 1$) and alpha-4 beta-7 ($\alpha 4 \beta 7$)
dimers play a role in the migration of leukocytes across the vascular endothelium (Springer *et al.*,
20 *1994 Cell* 76: 301-14; and Butcher *et al.*, 1996 *Science* 272: 60-6) and contribute to cell
activation and survival within the parenchyma (Damle *et al.*, 1993 *J. Immunol.* 151: 2368-79;
Koopman *et al.*, 1994 *J. Immunol.* 152: 3760-7; and Leussink *et al.*, 2002 *Acta Neuropathol.*
103:131-136).

Specifically, alpha-4 beta-1 (also known as very late antigen-4 [VLA-4]), binds to
25 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Lobb *et al.*, 1994 *J. Clin. Invest.* 94:1722-8),
which is expressed by the vascular endothelium at many sites of chronic inflammation
(Bevilacqua *et al.*, 1993 *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767-804; and Postigo *et al.*, 1993 *Res.*
Immunol. 144:723-35). The alpha-4 beta-7 dimer interacts with mucosal addressin cell
adhesion molecule (MAdCAM-1), and mediates homing of lymphocytes to the gut (Farstad
30 *et al.*, 1997 *Am. J. Pathol.* 150: 187-99; and Issekutz *et al.*, 1991 *J. Immunol.* 147: 4178-84).
Expression of MAdCAM-1 on the vascular endothelium is also increased at sites of
inflammation in the intestinal tract of patients with inflammatory bowel disease (IBD)
(Briskin *et al.*, 1997 *Am. J. Pathol.* 151: 97-110).

7

Adhesion molecules such as alpha-4 integrins are potential targets for therapeutic agents. For instance, the VLA-4 receptor, of which alpha-4 integrin is a subunit, is an important target because of its interaction with a ligand residing on brain endothelial cells. Diseases and conditions resulting from brain inflammation have particularly severe consequences. In another example, the alpha-4 beta-7 integrin dimer is an important target due to its involvement in lymphocyte homing and pathological inflammation in the gastrointestinal tract.

Alpha-4 beta-1 integrin is expressed on the extracellular surface of activated lymphocytes and monocytes, which have been implicated in the pathogenesis of acute inflammatory brain lesions and blood brain barrier (BBB) breakdown associated with multiple sclerosis (MS) (Coles *et al.*, 1999 *Ann. Neurol.* 46(3): 296-304). Agents against alpha-4 integrin have been tested for their anti-inflammatory potential both *in vitro* and *in vivo* in animal models. See Yednock *et al.*, 1992 *Nature* 356: 63-66; U.S. Patent No. 5,840,299 issued to Bendig, *et al.* on November 24, 1998, and U.S. Patent No. 6,001,809 issued to Thorsett *et al.* on December 14, 1999. The *in vitro* experiments demonstrate that alpha-4 integrin antibodies block attachment of lymphocytes to brain endothelial cells. Experiments testing the effect of alpha-4 integrin antibodies on animals having an artificially induced condition simulating multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), have demonstrated that administration of anti-alpha-4 integrin antibodies prevents inflammation of the brain and subsequent paralysis in the animals. Collectively, these experiments identify anti-alpha-4 integrin antibodies as potentially useful therapeutic agents for treating multiple sclerosis and other inflammatory diseases and disorders.

In another specific example of pathological inflammation involving alpha-4 integrins, Crohn's disease (CD) is a chronic, incurable, relapsing, transmural inflammation of the intestinal tract. The disease is characterized by inappropriate immune cell migration and activation in the intestinal mucosa involving T cells, macrophages and neutrophils (Schreiber *et al.*, 1991 *Gastroenterology* 101: 1020-30). First-line medical therapies for Crohn's disease include 5-aminosalicylates (5-ASAs), which have low efficacy, and corticosteroids, which have various short- and long-term side effects (Munkholm *et al.*, 1994 *Gut* 35: 360-2). Patients refractory to first-line therapies are treated with immunosuppressive agents such as azathioprine, 6-mercaptopurine, and methotrexate, but these agents have a slow onset of action and potentially serious side effects (Stein *et al.*, 2001 *Surg. Clin. North Am.* 81: 71-101, viii). More recently, biologic agents with a faster onset of action have been introduced

for use in treating Crohn's disease, but such agents are similarly plagued by issues such as long-term efficacy and side effects.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 The present invention provides methods of chronically reducing pathological inflammation in a patient via the chronic administration of an agent that selectively binds to alpha-4 integrin. The chronic dosage regime of an alpha-4 agent is designed such that (1) the agent specifically binds to alpha-4 integrin or an integrin, dimer comprising alpha-4 integrin, and (2) the agent is administered repeatedly to maintain alpha-4 integrin receptor saturation at
10 a sufficient level to suppress pathological inflammation. The agent of the invention can be useful in the suppression of inflammation via binding and inhibition of all integrin dimers comprising the alpha-4 subunit, or it can be designed to bind to a specific dimer, *e.g.*, alpha-4 beta-1.

15 In one embodiment, the efficacy of a chronic dosage regime can be determined by the measurement of saturation of a specific integrin dimer. In a particular example, it is believed that alpha-4 beta-1 integrin dimer is involved in multiple sclerosis, and thus the level of saturation required for an efficacious chronic administration regime can be measured via measurement of the saturation of the alpha-4 beta-1 dimer receptor.

20 In another embodiment, where multiple integrin dimers are believed to be involved in a pathological inflammation, saturation of a combination of dimer receptors can be measured to determine the efficacy of a chronic administration regime. In a specific example, both the alpha-4 beta-1 and the alpha-4 beta-7 dimers are believed to have involvement in pathological inflammation associated with inflammatory bowel disease. Thus, measurement of both alpha-4 beta-1 and alpha-4 beta-7 saturation levels may be beneficial in determining
25 the efficacy of a particular chronic administration regime.

30 In one embodiment, the success of a chronic dosage regime can be determined by assessing a physiological marker of the pathological inflammation. For example, in a chronic dosage regime administered for MS, the success of the dosage regime can be confirmed by detection of the levels of brain lesions using an imaging technique, *e.g.*, magnetic resonance imaging (MRI). In another example, in a chronic dosage regime administered for CD, the success of the dosage regime can be confirmed by detection of the levels of serum C-reactive protein levels in a patient. In yet another example, the success of the dosage regime can be

7
determined using a set group of criteria associated with wellness, e.g., reduction in CDAI in a CD patient.

Another embodiment of the invention contemplates the treatment of an inflammatory disease of the gastrointestinal tract (e.g., Crohn's disease, ulcerative colitis and inflammatory
5 bowel disease) of a subject comprising administering a therapeutically effective amount of a composition comprising natalizumab sufficient to treat or ameliorate said inflammatory disease of the gastrointestinal tract in said subject.

In a specific embodiment, the invention features a dosage regime wherein repeated administration of an agent is provided to provide a level of alpha-4 integrin receptor
10 saturation of 65-100% in a patient, thereby providing chronic suppression of pathological inflammation in the patient. In another specific embodiment, the agent is repeatedly administered to provide levels of at least about 75-100% in a patient. In yet another specific embodiment, the agent is repeatedly administered to provide levels of at least about 80-100% in a patient.

15 A feature of the invention is that undesirable effects of pathological inflammation can be suppressed long-term in a patient, e.g., over a period of six months, one year, two years, or more.

An aspect of the method of the invention is that sufficient levels of an anti-alpha-4 integrin agent are maintained over long periods to suppress pathological inflammation over
20 those periods.

A feature of the invention is that the dosage form provides lower levels of pathological inflammation over longer periods as compared to a single dose.

An advantage of the invention is that agents used in the methods of the invention are well tolerated and have low toxicity.

25 These and other objects, advantages, and features of the invention will become apparent to those persons skilled in the art upon reading the details of the methods and formulations as more fully described below.

BRIEF DESCRIPTIONS OF THE DRAWINGS

30 Fig. 1 is a line graph illustrating the cumulative mean number of new Gd-enhancing lesions in MS patients following dosing with natalizumab.

Fig. 2 shows the percentage of active scans at each time point during the natalizumab MS study. Active scans are those containing one or more new Gd-enhancing lesions.

Figs. 3A-C and 4A-C show the serum concentrations of natalizumab following the dosage regime time points in an MS study. Figs. 3A-C show the levels for the 3-mg/kg study; Figs. 4A-C show the levels for the 6-mg/kg study.

Figs. 5A-F illustrates the levels of receptor saturation maintained in the MS study.

5 Levels shown are percentage values.

Figs. 6 and 7 show the percentage of Patients Achieving Predefined Criteria of Clinical Response (Fig. 6) or Remission (Fig. 7) following dosing in the CD study.

Fig. 8 illustrates mean changes in serum C-reactive protein in a subset of patients who had elevated C-reactive protein at base-line in the CD study. Base-line values were (in mg/l):
10 Placebo, 38.44 (N=26); 3+0 mg/kg Group, 32.35 (N=38); 3+3 mg/kg Group, 41.16 (N=33);
and 6+6 mg/kg Group, 333 (N=26).

Figs. 9 A-B demonstrate respectively the effects of natalizumab on circulating eosinophils in patients with active Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Fig. 9A demonstrates that natalizumab significantly increased circulating eosinophil counts in
15 Crohn's disease (n=18) and ulcerative colitis patients (n=12) after 3 mg/kg natalizumab infusion. Fig. 9B shows that administration of natalizumab significantly increased monocyte counts in active Crohn's disease and ulcerative colitis patients after 3 mg/kg natalizumab infusion.

Figs. 10 A-D demonstrate the impact of natalizumab administration on TCR $\alpha\beta^+$ cells
20 expressing activation antigen. Panel A demonstrates the effect of natalizumab in patients with active Crohn's disease, *i.e.*, a significant increase of TCR $\alpha\beta^+$ cells expressing CD26, HLA-DR, CD8CR and CD8 CD28 to at least four weeks post 3 mg/kg natalizumab infusion. Panel B demonstrates the effects of natalizumab on TCR $\alpha\beta^+$ cells expressing activation
antigens in patients with activated ulcerative colitis, *i.e.*, significant increase in TCR $\alpha\beta^+$ cells
25 expressing CD26, HLA-DR, CD8DR and CD8CD28 to at least four weeks post 3 mg/kg natalizumab in fusion. Panel C demonstrates the effects of natalizumab administration on TCR $\alpha\beta^+$ cells expressing activation antigens and memory and naïve markers in patients with active Crohn's disease, *i.e.*, significant increase of memory (CD45RO) and naïve (CD45RA) TCR $\alpha\beta^+$ cells to at least four weeks post-natalizumab infusion. Panel B shows the effects of
30 natalizumab on TCR $\alpha\beta^+$ cells expressing activation antigens, memory and naïve markers in patients with active ulcerative colitis, *i.e.*, significant increase of memory (CD45RO), naïve (CD45RA), CD69 and CD38 TCR $\alpha\beta^+$ cells at one week post natalizumab administration.

11
Figs. 11 A-B demonstrate the effect of natalizumab on circulating TCR $\alpha\beta^+$ and NK-type cells in patients with active Crohn's disease and with ulcerative colitis respectively.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 Before the present methods and therapeutic agents are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods and therapeutic agents described, as such may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

10 Where a range of values is provided, it is understood that each intervening value, to the tenth of the unit of the lower limit unless the context clearly dictates otherwise, between the upper and lower limit of that range and any other stated or intervening value in that stated range is encompassed within the invention. The upper and lower limits of these smaller ranges may independently be included in the smaller, subject to any specifically excluded limit in the stated range. Where the stated range includes one or both of the limits, ranges
15 excluding either both of those included limits are also included in the invention.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and
20 materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference to disclose and describe the methods and/or materials in connection with which the publications are cited.

25 It must be noted that as used herein, the singular forms "a", "and", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "an antibody" includes a plurality of such antibodies and reference to "the dosage" includes reference to one or more dosages and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

30 The publications discussed herein are provided solely for their disclosure prior to the filing date of the present application. Nothing herein is to be construed as an admission that the present invention is not entitled to antedate such publication by virtue of prior invention. Further, the dates of publication provided may be different from the actual publication dates which may need to be independently confirmed.

DEFINITIONS

The term "anti-alpha-4 agent" as used herein refers to any agent, which binds specifically to an integrin comprising an alpha-4 subunit and inhibits activity of the integrin. This includes agents that specifically bind to alpha-4 integrin, as well as agents that bind to an integrin dimer that comprises the alpha-4 integrin, *e.g.*, alpha-4 beta-1 ($\alpha 4 \beta 1$) or alpha-4 beta-7 ($\alpha 4 \beta 7$). The term "agents" is meant to include synthetic and recombinant molecules (*e.g.*, antibodies, small molecules, peptides, or other synthetically produced molecules or compounds, as well as recombinantly produced gene products) as well as naturally-occurring compounds (*e.g.*, polypeptides, antibodies, and the like).

10 The term "efficacy" as used herein in the context of a chronic dosage regime refers to the effectiveness of a particular treatment regime. Efficacy can be measured based on change the course of the disease in response to an agent of the present invention. For example, in the treatment of MS, efficacy can be measured by the frequency of relapses in relapsing-remitting MS, and by the presence or absence of new lesions in the central nervous system as
15 detected using methods such as MRI.

The term "success" as used herein in the context of chronic treatment regimes refers to the effectiveness of a particular treatment regime. This includes a balance of efficacy, toxicity (*e.g.*, side effects and patient tolerance of a formulation or dosage unit), patient compliance, and the like. For a chronic administration regime to be considered "successful" it must balance different aspects of patient care and efficacy to produce the most favorable patient outcome.

The terms "specifically binds" or "binds specifically" as used herein refer to the situation in which one member of a specific binding pair will not show any significant binding to molecules other than its specific binding partner (*e.g.*, an affinity of about 1,000x or more for its binding partner). In the present invention, the anti-alpha-4 integrin agent will not show significant binding to any polypeptide other than an alpha-4 integrin or a receptor comprising an alpha-4 integrin. For example, antibodies used in the methods of the invention that bind to an alpha-4 integrin with a binding affinity of 10^7 mole/l or more, preferably 10^8 mole/liters or more, are said to bind specifically to an alpha-4 integrin.

30 The term "substantially homologous" as used herein is intended to mean any polypeptide that has an alteration in the sequence such that a functionally equivalent amino acid is substituted for one or more amino acids in the polypeptide, thus producing a change that has no or relatively little effect on the binding properties of the polypeptide. For

13

example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity.

The terms "elicits an immune response" and "elicits a host immune response" as used herein refer to the production of an immunological response to a receptor comprising an alpha-4 integrin in a subject upon introduction of an agent of the invention to the subject. An immune response in the subject can be characterized by serum reactivity with an alpha-4 integrin receptor that is at least twice that of an untreated subject, more preferably three times the reactivity of an untreated subject, and even more preferably at least four times the reactivity of an untreated subject, with serum immunoreactivity measured using a serum dilution of approximately 1:100.

The term "excipient material" is intended to mean any compound forming a part of the formulation that is intended to act merely as a carrier, *i.e.* not intended to have biological activity itself.

The term "adjuvant" as used herein refers to a composition additive that augments the immune response to an agent of the invention but which will not on its own elicit an immune response. Adjuvants may augment the immune response using a variety of biological mechanisms, including but not limited to lymphocytic recruitment, T cell stimulation, B cell stimulation, and macrophage stimulation.

The terms "treating", and "treatment" and the like are used herein to generally mean obtaining a desired pharmacological and physiological effect. The effect may be prophylactic in terms of preventing or partially preventing a disease, symptom or condition thereof and/or may be therapeutic in terms of a partial or complete cure of a disease, condition, symptom or adverse effect attributed to the disease. The term "treatment" as used herein covers any treatment of a disease in a mammal, particularly a human, and includes: (a) preventing the disease from occurring in a subject which may be predisposed to the disease but has not yet been diagnosed as having it; (b) inhibiting the disease, *i.e.*, arresting its development; or (c) relieving the disease, *i.e.*, causing regression of the disease and/or its symptoms or conditions. The invention is directed towards treating a patient's suffering from disease related to pathological inflammation. The present invention is involved in preventing, inhibiting, or relieving adverse effects attributed to pathological inflammation over long periods of time and/or are such caused by the physiological responses to inappropriate inflammation present in a biological system over long periods of time.

14

The term "pathological inflammation" as used herein refers to an inappropriate and chronic inflammation associated with disorders including, but not limited to, asthma, atherosclerosis, AIDS dementia, diabetes, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, transplant rejection, graft versus host disease, multiple sclerosis (especially to inhibit further demyelination), tumor metastasis, nephritis, atopic dermatitis, psoriasis, myocardial ischemia, chronic prostatitis, complications from sickle cell anemia, lupus erythematosus, and acute leukocyte mediated lung injury. Such inflammation is characterized by a heightened response of inflammatory cells, including infiltrating leukocytes. Over time, such pathological inflammation often results in damage to tissue in the region of inappropriate inflammation.

By "Antegren®" is meant to include the antibody also known as AN100226 (antibody code number) or natalizumab (USAN name). Antegren® is a recombinant, humanized anti-alpha-4 integrin antibody. Preferably the disease or condition being treated in the mammal is one which is modulated when a therapeutically effective dose of Antegren® is administered.

GENERAL ASPECTS OF THE INVENTION

The present invention is based on the surprising result that chronic administration of an emerging class of new compounds known as selective adhesion molecule inhibitors (SAMIs) is sufficient to provide the maintenance of chronic suppression of inflammation in disorders involving integrin dimers. Upon cessation of the repeated dosage regime, the suppression of the inflammation is reversed (*see, e.g., Fig. 2*). Previous treatments of inflammatory inhibitors have approached the dosage regimes quite differently, in the belief that the administration of an inflammatory inhibitor would cause a reaction of the body's own response system, which would in turn lead to a recognition of the inflammation as pathological and a resulting chronic relief of the pathological inflammation. What the inventors have shown herein is that a chronic dosage regime is not only more effective than a short-term dosage regime, but in fact it is required to maintain the suppression of pathological inflammation. Thus, in order to realize some of the more important advantages of the invention, the levels of an anti-alpha-4 integrin agent need to be maintained over a number of months or even years.

The present invention is based on the results of a large, randomized, placebo-controlled trial of an anti-alpha-4 integrin antibody, natalizumab, in patients with relapsing MS or with moderate to severely active CD. Natalizumab is a recombinant, humanized,

monoclonal antibody antagonist against alpha-4 integrin. Results from these two trials have shown that treatment with natalizumab improved the signs and symptoms of patients with MS and CD. The invention is also intended to include other chimeric antibodies, including primatized™ antibodies.

5 In a general sense the method of the invention does not involve any particular mode of administration, since the mode of administration is dependent upon the form of the active agent and the formulation developed to administer the active agent(s). However, the specific examples described here were obtained using parenteral administration of natalizumab.

10 Although the present invention is described using an antibody that specifically binds to alpha-4 integrin, it is also intended to include chronic administration of, for example, bivalent or multivalent antibodies that recognize both partners of an integrin dimer, provided the dimer comprises an alpha-4 integrin.

The general concept of the invention relates to introducing relatively constant amounts of an active agent to a patient's circulatory system over a period of months or years. 15 This chronic introduction of an agent that selectively binds to alpha-4 integrin or a dimer comprising alpha-4 integrin results in suppression of pathological inflammation being maintained at a constant level over a period of time. By maintaining therapeutic levels of an active agent for a period of time, pathological inflammation can be chronically suppressed in the patient.

20 In a very specific sense, the invention involves obtaining and maintaining a receptor saturation level in a human patient of a dimer comprising alpha-4 integrin in a range of from about 65% to about 100%, more preferably between about 75% to about 100%, and even more preferably between about 80% to about 100%. These receptor saturation levels are maintained at these levels chronically (e.g., over a period of 6 months or so) to allow for 25 continued suppression of pathological inflammation.

AGENTS THAT SELECTIVELY BIND TO ALPHA-4 INTEGRINS

Various types of agents with the ability to bind to and inhibit alpha-4 integrin activity can be used in the practice of the invention. Many such agents have been identified and 30 characterized, and specific agents are described below. Given the teachings disclosed herein, it is well within the skill of one in the art to identify other agents that will be able to inhibit the alpha-4-comprising integrin dimers in a manner that biologically mimics or is similar to

the specifically described agents, and the present invention is intended to include the chronic administration of such agents and combinations of such agents.

Antibodies

5 In one specific embodiment, the agents of the invention are antibodies or immunologically active fragments thereof that selectively bind to an alpha-4 integrin or a dimer comprising alpha-4, such as alpha-4 beta-1 or alpha-4 beta-7.

When the agent of the invention is an antibody, a monoclonal antibody is preferred. In contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies
10 directed against different epitopes, each monoclonal antibody is directed against a single epitope on the antigen. A second advantage of monoclonal antibodies is that they are synthesized by means that are uncontaminated by other immunoglobulins, e.g., by phage display or isolation from a hybridoma. Although the present invention intends to encompass both polyclonal and monoclonal antibodies as agents of the invention, monoclonal antibodies
15 are preferred as they are highly specific, and the invention is thus discussed primarily in terms of monoclonal antibodies.

In addition, other antibodies can be identified using techniques available in the art. For example, monoclonal antibodies of the present invention can be produced using phage display technology. Antibody fragments that selectively bind to an alpha-4 integrin or a
20 dimer comprising an alpha-4 integrin are then isolated. Exemplary preferred methods for producing such antibodies via phage display are disclosed in U.S. Patent Nos. 6,225,447; 6,180,336; 6,172,197; 6,140,471; 5,969,108; 5,885,793; 5,872,215; 5,871,907; 5,858,657; 5,837,242; 5,733,743; and 5,565,332.

Monoclonal antibodies can also be produced using the conventional hybridoma
25 methods. These methods have been widely applied to produce hybrid cell lines that secrete high levels of monoclonal antibodies against many specific antigens, and can also be used to produce monoclonal antibodies of the present invention. For example, mice (e.g., Balb/c mice) can be immunized with an antigenic alpha-4 integrin epitope by intraperitoneal injection. After sufficient time has passed to allow for an immune response, the mice are
30 sacrificed, and the spleen cells obtained and fused with myeloma cells, using techniques well known in the art. The resulting fused cells, hybridomas, are then grown in a selective medium, and the surviving cells grown in such medium using limiting dilution conditions. After cloning and recloning, hybridomas can be isolated that secrete antibodies (for example,

17

of the IgG or IgM class or IgG1 subclass) that selectively bind to the target, alpha-4 integrin or a dimer comprising an alpha-4 integrin. To produce agents specific for human use, the isolated monoclonal can then be used to produce chimeric and humanized antibodies.

Antibodies of the invention include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, multispecific, human, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies (e.g., scFv), Fab fragments, F(ab') fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies (including, e.g., anti-Id antibodies to antibodies of the invention), and epitope-binding fragments of any of the above. Most preferably the antibodies are human antigen-binding antibody fragments of the present invention and include, but are not limited to, Fab, Fab' and F(ab')₂, Fd, single-chain Fvs (scFv), single-chain antibodies, disulfide-linked Fvs (sdFv) and fragments comprising either a VL or VH domain. Antigen-binding antibody fragments, including single-chain antibodies, may comprise the variable region(s) alone or in combination with the entirety or a portion of the following: hinge region, CH1, CH2, and CH3 domains. Also included in the invention are antigen-binding fragments that can comprise any combination of variable region(s) with a hinge region, CH1, CH2, and CH3 domains. The antibodies of the invention may be from any animal origin including birds and mammals. Preferably, the antibodies are human, murine (e.g., mouse and rat), donkey, sheep, monkey, rabbit, goat, guinea pig, pig, camel, horse, or chicken (or other avian). As used herein, "human" antibodies include antibodies having the amino acid sequence of a human immunoglobulin and include antibodies isolated from human immunoglobulin libraries or from animals transgenic for one or more human immunoglobulins and that do not express endogenous immunoglobulins, as described *infra* and, for example in, U.S. Pat. No. 5,939,598 by Kucherlapati *et al.*

Chimeric and humanized antibodies can be produced from non-human antibodies, and can have the same or similar binding affinity as the antibody from which they are produced. Techniques for producing chimeric antibodies (Morrison *et al.*, 1984 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851; Neuberger *et al.*, 1984 *Nature* 312: 604; Takeda *et al.*, 1985 *Nature* 314: 452) include splicing the genes from, e.g., a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity; such antibodies are within the scope of this invention. For example, a nucleic acid encoding a variable (V) region of a mouse monoclonal antibody can be joined to a nucleic acid encoding a human constant (C) region, e.g., IgG1 or IgG4. The resulting antibody is

thus a species hybrid, generally with the antigen binding domain from the non-human antibody and the C or effector domain from a human or primate antibody.

Humanized antibodies are antibodies with variable regions that are primarily from a human antibody (*i.e.*, the acceptor antibody), but which have complementarity determining regions substantially from a non-human antibody (the donor antibody). See, *e.g.*, Queen *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* 86: 10029-10033 (1989); WO 90/07861, U.S. Patent Nos. 6,054,297; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101; and 5,224,539. The constant region or regions of these antibodies are generally also from a human antibody. The human variable domains are typically chosen from human antibodies having sequences displaying a high homology with the desired non-human variable region binding domains. The heavy and light chain variable residues can be derived from the same antibody, or a different human antibody. In addition, the sequences can be chosen as a consensus of several human antibodies, such as described in WO 92/22653.

A "primatizedTM antibody" is a recombinant antibody containing primate variable sequences or antigen binding portions, and human constant domain sequences. See Newman, *Biotechnology*, 1992, 10: 1455-60. Primatization of antibodies results in the generation of antibodies that contain monkey variable domains and human constant sequences. For more details see U.S. Patent No. 6,113,898. This technique modifies antibodies such that they are not rejected upon administration in humans because they are antigenic. This technique relies on immunization of cynomolgus monkeys with human antigens or receptors. This technique was developed to create high affinity monoclonal antibodies directed to human cell surface antigens.

Specific amino acids within the human variable region are selected for substitution based on the predicted conformation and antigen binding properties. This can be determined using techniques such as computer modeling, prediction of the behavior and binding properties of amino acids at certain locations within the variable region, and observation of effects of substitution. For example, when an amino acid differs between a non-human variable region and a human variable region, the human variable region can be altered to reflect the amino acid composition of the non-human variable region.

In a specific embodiment, the antibodies used in the chronic dosage regime of the present invention are humanized antibodies as disclosed in U.S. Patent No. 5,840,299, which is incorporated herein by reference.

In another embodiment, transgenic mice containing human antibody genes can be immunized with an antigenic alpha-4 integrin structure and hybridoma technology can be used to generate human antibodies that selectively bind to alpha-4 integrin.

Chimeric, human and/or humanized antibodies can be produced by using recombinant expression, e.g., expression in human hybridomas (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)), in myeloma cells or in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Alternatively, antibody coding sequences can be incorporated into transgenes for introduction into the genome of a transgenic animal and subsequent expression in the milk of the transgenic animal. See e.g., U.S. Patent Nos. 6,197,946; 5,849,992; 5,565,362; 5,336,894; and 5,304,489. Suitable transgenes include transgenes having a promoter and/or enhancer from a mammary gland specific gene, for example casein or β -lactoglobulin.

Small Molecules

Small molecules for use in the present invention encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 50 and less than about 4,000 Daltons. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including, but not limited to: peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof.

The small molecules can be obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides and oligopeptides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means, and may be used to produce combinatorial libraries. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, *etc.* to produce structural analogs.

-20

Anti-alpha-4 Integrin Peptides

The methods of the invention can be performed with any peptide that is capable of binding to an alpha-4 integrin or a dimer comprising an alpha-4 subunit. Included in the methods of the invention are peptides that are substantially homologous to a region of the extracellular matrix or a natural ligand of the specific alpha-4 integrin receptor or receptors targeted. For example, for the chronic inhibition of alpha-4 beta-1 receptor, peptides can be used that comprise at least a portion of the fibronectin III/CS region (*e.g.*, peptides comprising at least a portion of the CS-1 peptide sequence or a sequence substantially homologous to the CS-1 sequence) can be used to bind to a receptor and inhibit the activity of the alpha-4 comprising integrin. See for example USSN 08/452,098, which is incorporated by reference in its entirety.

Agents that Elicit an Immune Response

In a specific embodiment, the agents of the invention are peptides or peptidomimetics that comprise an immunogenic fragment of an alpha-4 integrin. An immunogenic fragment is any fragment that comprises an epitope of alpha-4, and generally has at least 3, 5, 7, 10, 15, 17 or 20 contiguous amino acids from a naturally occurring mammalian alpha-4 protein. The peptide sequence of both human and murine alpha-4 is accessible from GenBank (Accession Nos. AA59613 and NP_034706). One skilled in the art can readily design a peptide agent of the invention based on the amino acid sequence of alpha-4 or using the wild-type nucleotides that encode them (*e.g.*, GenBank Accession Nos. L12002 and NM_01056, respectively). Once an appropriate peptide is designed, it can be initially screened against antibodies known to have the desired immunogenic activity, *e.g.*, antibodies that selectively bind to an alpha-4 structure and are characterized by the ability to inhibit the activity of an integrin comprising alpha-4.

The immunogenic fragment may also be designed to have amino acid analogs or other structural elements that will enhance the immunogenic response. In particular, peptide fragments may have altered C- or N-terminal ends that enhance overall immunogenicity of the molecules while not impeding their ability to elicit an immune response. Examples of such analogs include, but are not limited to: alpha, alpha-disubstituted amino acids, N-alkyl amino acids, lactic acid, 4-hydroxyproline, gamma-carboxyglutamate, gamma-N,N,N,-trimethyllysine, gamma-N-acetyllysine, O-phosphoserine, N-acetylserine, N-

21

formylmethionine, 3-methylhistidine, and 5-hydroxylysine. Other useful analogs can be found in Sigma, *Biochemicals and Reagents*, Sigma-Aldrich (2001). The fragment may also be detectably labeled to allow for tracking of the molecule within a subject following administration to a subject.

5 Peptides, analog structures, peptidomimetics and the like can be isolated from natural sources, and then optionally processed (e.g., via peptide cleavage) or alternatively synthesized by conventional techniques known in the art such as solid phase synthesis or recombinant expression. See, e.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, New York, 2nd edition 1989). Automatic peptide
10 synthesis can be performed using a commercially available apparatus from manufacturers such as Applied Biosystems (Foster City, California), and methods of doing so are well established. Recombinant production of the proteins may be in prokaryotic, such as phage or bacterial cells or eukaryotic systems, such as yeast, insect, or mammalian cells. Alternatively, proteins can be produced using cell-free *in vitro* systems known in the art.

15 In another example, phage peptide display libraries can be used to express large numbers of peptides that can be screened *in vitro* to identify peptides that specifically bind to alpha-4 or a dimer comprising an alpha-4 integrin. Phage display technology provides a means for expressing a diverse population of random or selectively randomized peptides. Various methods of phage display and methods for producing diverse populations of peptides
20 are well known in the art. For example, Ladner *et al.* (U.S. Pat. No. 5,223,409), describes methods for preparing diverse populations of binding domains on the surface of a phage. Ladner *et al.* describe phage vectors useful for producing a phage display library, as well as methods for selecting potential binding domains and producing randomly or selectively mutated binding domains. Screening of a phage display library generally involves *in vitro*
25 panning of the library using a purified target molecule. Phage that bind the target molecule can be recovered; individual phage can be cloned, and the peptide expressed by a cloned phage can be determined.

30 Similarly, Smith and Scott (*Meth. Enzymol.* 217: 228-257 (1993) and *Science* 249: 386-390 (1990)) describe methods of producing phage peptide display libraries, including vectors and methods of diversifying the population of peptides that are expressed (see, also, Huse, WO 91/07141 and WO 91/07149). Phage display technology can be particularly powerful when used, for example, with a codon based mutagenesis method, which can be used to produce random peptides or desirably biased peptides (see, e.g., U.S. Pat. No.

12

5,264,563). These and other well known methods can be used to produce a phage display library, which can be subjected to the *in vivo* panning method of the invention in order to identify a peptide that homes to one or a few selected organs.

The molecules of a peptide phage display library also can be present as a conjugate, which can facilitate recovery or identification of the peptide of interest. As used herein, the term "conjugate" means a peptide or peptidomimetic of the library linked to a physical, chemical or biological moiety such as but not limited to a solid substrate, a plastic microbead, an oligonucleotide or a bacteriophage, and the like. The moiety can provide a means to identify or recover an agent.

Some agents used to elicit an immune response mimic the appropriate epitope for inducing an immune response against alpha-4 integrin but are too small to be immunogenic on their own. In this situation, a peptide agent can be linked to a suitable carrier to facilitate an immune response. Suitable carriers include serum albumins, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, tetanus toxoid, or a toxoid from other pathogenic bacteria, such as diphtheria, *E. coli*, cholera, or *H. pylori*, or an attenuated toxin derivative. Other carriers include T-cell epitopes that bind to multiple MHC alleles, *e.g.*, at least 75% of all human MHC alleles. Such carriers are sometimes known in the art as "universal T-cell epitopes." Examples of universal T-cell epitopes include:

Influenza Hemagglutinin: HA₃₀₇₋₃₁₉
PADRE

PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 2)
AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 3),
where X is preferably cyclohexylalanine,
tyrosine, or phenylalanine

Malaria CS: T3 epitope

EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 4)

Hepatitis B surface antigen: HBsAg₁₉₋₂₈

FFLLTRILTI (SEQ ID NO: 5)

Heat Shock Protein 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁

DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID
NO: 6)

bacille Calmette-Guerin

QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 7)

Tetanus toxoid: TT₂₃₀₋₂₄₄

QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 8)

Tetanus toxoid: TT₉₄₇₋₉₆₇

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID
NO: 9)

HIV gp120 T1

KQIINMWQEVGKAMYA. (SEQ ID NO:
10)

23

Other carriers for stimulating or enhancing an immune response include cytokines such as IL-1, IL-1 α and β peptides, IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF, and chemokines, such as macrophage inflammatory protein (MIP)1 α and β and RANTES (*i.e.*, regulation upon activation normal T cell expressed and secreted). Immunogenic agents can also be linked to peptides that enhance transport across tissues, as described in WO 97/17613 and WO 97/17614.

Immunogenic agents can be linked to carriers by chemical cross-linking. Techniques for linking an agent to a carrier include but are not limited to the formation of disulfide linkages using N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionate (SPDP) and succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (if the peptide lacks a sulfhydryl group, this can be provided by addition of a cysteine residue). These reagents create a disulfide linkage between themselves and a peptide cysteine that resides on one protein and an amide linkage through the ϵ -amino on a lysine, or other free amino group in other amino acids. A variety of such disulfide/amide-forming agents are described in *Immun. Rev.* 62: 185 (1982). Other bifunctional coupling agents form a thioether rather than a disulfide linkage. Many of these thio-ether-forming agents are commercially available and include reactive esters of 6-maleimidocaproic acid, 2-bromoacetic acid, 2-iodoacetic acid, and 4-(N-maleimido-methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid. The carboxyl groups can be activated by combining them with succinimide or 1-hydroxyl-2-nitro-4-sulfonic acid sodium salt.

Peptide agents can also be expressed as fusion proteins with carriers (*i.e.*, heterologous peptides). The peptide agent can be linked at its amino terminus, its carboxyl terminus, or both to a carrier. Optionally, multiple repeats of the immunogenic peptide can be present in the fusion protein. Optionally, an immunogenic peptide can be linked to multiple copies of a heterologous peptide, for example, at both the N- and C- termini of the peptide. Some carrier peptides serve to induce a helper T-cell response against the carrier peptide. The induced helper T-cells in turn induce a B-cell response against the immunogenic peptide linked to the carrier peptide.

Whether the agent is an antibody, polypeptide, peptide, small molecule or other pharmaceutically useful compound according to the present invention that is to be given to an individual, administration is via a chronic dosage regime. The actual amount administered, and rate and time-course of administration, will depend on the nature and severity of what is being treated. Prescription of treatment, *e.g.*, decisions on dosage *etc.*, is within the

221

responsibility of general practitioners and other medical doctors, and typically takes account of the disorder to be treated, the condition of the individual patient, the site of delivery, the method of administration and other factors known to practitioners. Examples of the techniques and protocols mentioned above can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, Osol, A. (ed.), 1990.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also provides pharmaceutical compositions for the reduction of chronic pathological inflammation in a subject susceptible to such and/or suffering from a disorder associated with pathological inflammation.

Pharmaceutical formulations of the invention preferably contain an agent in a concentration from about 0.1 to about 10% of the formulation. They may also be used in appropriate association with other pharmaceutically active compounds. The following methods and excipients are merely exemplary and are in no way meant to be limiting.

For oral preparations, the agents can be used alone or in combination with appropriate additives to make tablets, powders, granules or capsules, for example, with conventional additives, such as lactose, mannitol, corn starch or potato starch; with binders, such as crystalline cellulose, cellulose derivatives, acacia, corn starch or gelatins; with disintegrators, such as corn starch, potato starch or sodium carboxymethylcellulose; with lubricants, such as talc or magnesium stearate; and if desired, with diluents, buffering agents, moistening agents, preservatives and flavoring agents.

When the agent is an antibody, the formulation is preferably administered in a parenteral dosage form. The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. The compositions can also include, depending on the formulation desired, pharmaceutically acceptable, non-toxic carriers or diluents, which are defined as vehicles commonly used to formulate pharmaceutical compositions for animal or human administration. The diluent is selected so as not to affect the biological activity of the combination. Examples of such diluents are distilled water, physiological phosphate-buffered saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and Hank's solution. In addition, the pharmaceutical composition or formulation may also include other carriers, adjuvants, or nontoxic, nontherapeutic, non-immunogenic stabilizers and the like. Also included may be carrier molecules such as proteoglycans. Specific examples of such carrier molecules include, but are not limited to, glycosaminoglycans such as heparin sulfate, hyaluronic acid,

25

keratan-sulfate, chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate, heparan sulfate and dermatin sulfate, perlecan, and pentopolysulfate.

Antibodies of the invention can be administered as injectionable dosages of a solution or as a suspension of the substance in a physiologically acceptable diluent with a pharmaceutical carrier that can be a sterile liquid such as water and oils with or without the addition of a surfactant. Other pharmaceutically preparations are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, and mineral oil. In general, glycols such as propylene glycol or polyethylene glycol are preferred liquid carriers, particularly for injectable solutions. The agents of this invention can be administered in a sustained release form, for example a depot injection, implant preparation, or osmotic pump, which can be formulated in such a manner as to permit a sustained release of the active ingredient.

In addition, agents of the invention that are antibodies may be provided by administering a polynucleotide encoding a whole or partial antibody (e.g., a single chain Fv) to a subject. The polynucleotide is administered to a subject in an appropriate vehicle to allow the expression of the antibody in the subject in a therapeutically effective amount.

The agents of the invention can be formulated into preparations for injections by dissolving, suspending or emulsifying them in an aqueous or nonaqueous solvent, such as vegetable or other similar oils, synthetic aliphatic acid glycerides, esters of higher aliphatic acids or propylene glycol. The formulations may also contain conventional additives such as solubilizers, isotonic agents, suspending agents, emulsifying agents, stabilizers and preservatives.

The agents can be utilized in aerosol formulation to be administered via inhalation or pulmonary delivery. The agents of the present invention can be formulated into pressurized acceptable propellants such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen and the like.

Furthermore, the agents can be made into suppositories by mixing with a variety of bases such as emulsifying bases or water-soluble bases. The agents of the present invention can be administered rectally via a suppository. The suppository can include vehicles such as cocoa butter, carbowaxes and polyethylene glycols, which melt at body temperature, yet are solidified at room temperature.

Administration of an agent of the invention may be accomplished by any convenient means, including parenteral injection, and may be systemic or localized in delivery. The agents of this invention can be incorporated into a variety of formulations for therapeutic

administration. More particularly, the agents of the present invention can be formulated into pharmaceutical compositions by combination with appropriate pharmaceutically acceptable carriers or diluents, and may be formulated into preparations in solid, semi-solid, liquid or gaseous forms, such as tablets, capsules, powders, granules, ointments, solutions, suppositories, injections, inhalants, gels, microspheres, and aerosols. As such, administration of the agents can be achieved in various ways, including oral, buccal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradermal, transdermal, intratracheal, intranasal, gastric, intramuscular, intracranial, subdermal *etc.*, administration. The active agent may be systemic after administration or may be localized by the use of regional administration, intramural administration, or use of an implant that acts to retain the active dose at the site of implantation.

Unit dosage forms for oral or rectal administration such as syrups, elixirs, and suspensions may be provided wherein each dosage unit, for example, teaspoonful, tablespoonful, tablet or suppository, contains a predetermined amount of the composition containing one or more agents of the present invention. Similarly, unit dosage forms for injection or intravenous administration may comprise the agent of the present invention in a composition as a solution in sterile water, normal saline or another pharmaceutically acceptable carrier.

Implants for sustained release formulations are well known in the art. Implants are formulated as microspheres, slabs, *etc.* with biodegradable or non-biodegradable polymers. For example, polymers of lactic acid and/or glycolic acid form an erodible polymer that is well tolerated by the host. The implant is placed in proximity to the site of protein deposits (e.g., the site of formation of amyloid deposits associated with neurodegenerative disorders), so that the local concentration of active agent is increased at that site relative to the rest of the body.

A typical dosage unit for administration of a subject includes, but is not limited to: a solution suitable for intravenous administration; a tablet taken from two to six times daily; or a one time-release capsule or tablet taken once a day and containing a proportionally higher content of active ingredient, *etc.* The time-release effect may be obtained by capsule materials that dissolve at different pH values, by capsules that release slowly by osmotic pressure or by any other known means of controlled release.

Certain agents of the invention, including antibodies and peptides, are sometimes administered in combination with an adjuvant. A variety of adjuvants can be used in

23

combination with an anti alpha-4 integrin agent to elicit an immune response. Preferred adjuvants augment the intrinsic response to an agent without causing conformational changes in the agent that affect the qualitative form of the response. Preferred adjuvants include aluminum hydroxide and aluminum phosphate, 3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A (MPLTM) (see GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, now part of Corixa). StimulonTM QS-21 is a triterpene glycoside or saponin isolated from the bark of the Quillaja Saponaria Molina tree found in South America (see Kensil *et al.*, in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); U.S. Patent No. 5,057,540, (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Other adjuvants are oil in water emulsions (such as squalene or peanut oil), optionally in combination with immune stimulants, such as monophosphoryl lipid A (see Stoute *et al.*, 1997 *N. Engl. J. Med.* 336: 86-91). Another adjuvant is CpG (WO 98/40100). Alternatively, an agent can be coupled to an adjuvant. However, such coupling should not substantially change the conformation of the desired alpha-4 epitope so as to affect the nature of the host immune response. Adjuvants can be administered as a component of a therapeutic composition with an active agent or can be administered separately, before, concurrently with, or after administration of the therapeutic agent.

A preferred class of adjuvants for administration is aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, and aluminum sulfate. Such adjuvants can be used with or without other specific immunostimulating agents such as MPL or 3-DMP, QS-21, polymeric or monomeric amino acids such as polyglutamic acid or polylysine. Another class of adjuvants is oil-in-water emulsion formulations. Such adjuvants can be used with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (e.g., N-acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (MTP-PE), N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxy propylamide (DTP-DPP) theramideTM, or other bacterial cell wall components. Oil-in-water emulsions include (a) MF59 (WO 90/14837), containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP, either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger

28

particle size emulsion, and (c) Ribi™ adjuvant system (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) containing 2% squalene, 0.2% Tween 80, and one or more bacterial cell wall components from the group consisting of monophosphoryl lipid-A, trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL + CWS (Detox™). Another class of preferred adjuvants is saponin adjuvants, such as Stimulon™ (QS-21; Aquila, Framingham, MA) or particles generated therefrom, such as ISCOMs (immunostimulating complexes) and ISCOMATRIX. Other adjuvants include Complete and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), cytokines, such as interleukins (IL-1, IL-2, and IL-12), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), and tumor necrosis factor (TNF). Such adjuvants are generally available from commercial sources.

An adjuvant can be administered with an agent as a single composition, or can be administered before, concurrent with or after administration of the agent. The agent and an adjuvant can be packaged and supplied in the same vial or can be packaged in separate vials and mixed before use. The agent and adjuvant are typically packaged with a label indicating the intended therapeutic application. If the agent and adjuvant are packaged separately, the packaging typically includes instructions for mixing before use. The choice of an adjuvant and/or carrier depends on such factors as the stability of the formulation containing the adjuvant, the route of administration, the dosing schedule, and the efficacy of the adjuvant for the species being vaccinated. In humans, a preferred pharmaceutically acceptable adjuvant is one that has been approved for human administration by pertinent regulatory bodies. Examples of such preferred adjuvants for humans include alum, MPL and QS-21. Optionally, two or more different adjuvants can be used simultaneously. Preferred combinations include alum with MPL, alum with QS-21, MPL with QS-21, and alum, QS-21 and MPL together. Also, Incomplete Freund's adjuvant can be used (Chang *et al.*, 1998 *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 173-186), optionally in combination with any of alum, QS-21, and MPL and all combinations thereof.

CHRONIC ADMINISTRATION DOSAGE REGIMES

The chronic treatment regimes of the present invention provides anti-alpha-4 integrin agent at a level that will maintain sufficient receptor saturation to suppress pathological inflammation in a patient in need of such. The methods of the invention entail administration once per every two weeks or once a month to once every two months, with repeated dosings

taking place over a period of at least six months, and more preferably for a year or longer. The methods of the invention involve obtaining and maintaining a receptor saturation level in a human patient of a dimer comprising alpha-4 integrin (e.g., VLA-4) in a range of from about 65% to 100%, more preferably between about 75% to about 100%, and even more preferably between about 80% to about 100%. These receptor saturation levels are maintained at these levels chronically (e.g., over a period of 6 months or so) to allow for continued suppression of pathological inflammation.

In a specific embodiment, the anti-alpha-4 agent is an antibody, preferably a humanized or human antibody (e.g., natalizumab), and the dosing is on a monthly basis.

Levels of receptor saturation can be monitored to determine the efficacy of the dosing regime, and physiological markers measured to confirm the success of the dosage regime. As a confirmation, serum levels of the antibody can be monitored to identify clearance of the antibody and to determine the potential effect of half-life on the efficacy of the treatment.

The amount of agent administered in a dosage unit may depend on whether adjuvant is also administered, with higher dosages generally being required in the presence of adjuvant. For immunization with an agent of the invention, the dosage ranges from about 0.0001 to about 100 mg/kg, and more usually about 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example, dosages can be about 1 mg/kg body weight or about 10 mg/kg body weight. Dosage and frequency may vary depending on the half-life of the agent in the patient. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. For antibody administration, each dosing injection is generally between about 2.0 to about 8.0 mg/kg. In accordance with the teachings provided herein, effective dosages can be monitored by obtaining a fluid sample from the patient, generally a blood serum or cerebrospinal fluid sample, and determining the integrin receptor saturation using methods well known in the art. Ideally, a sample is taken prior to initial dosing; subsequent samples are taken and measured prior to and/or after each immunization. A particularly preferred amount is a 3 mg per kg of patient per month of natalizumab or an immunologically active fragment equivalent thereof.

When adjuvant is being administered, the dosage level is increased in accordance with the particular adjuvant and the level of immunogenicity of the anti-alpha-4 agent. Doses for individual agents, selected in accordance with the present invention, are determined according to standard dosing methods, taken in conjunction with the teachings provided herein.

30

As an alternative to chronic administration comprised of repeated individual dosings, an anti-alpha-4 agent can be administered as a sustained release formulation, provided the dosage is such that the levels of receptor saturation remain sufficient to suppress inflammation. For example, controlled release systems can be used to chronically administer an anti-alpha-4 agent within the scope of this invention. Discussions of appropriate controlled release dosage forms may be found in Leszczek Krowczynski, *Extended-Release Dosage Forms*, 1987 (CRC Press, Inc.).

The various controlled release technologies cover a very broad spectrum of drug dosage forms. Controlled release technologies include, but are not limited to physical systems and chemical systems. Physical systems include, but are not limited to, reservoir systems with rate-controlling membranes, such as microencapsulation, macroencapsulation, and membrane systems; reservoir systems without rate-controlling membranes, such as hollow fibers, ultra microporous cellulose triacetate, and porous polymeric substrates and foams; monolithic systems, including those systems physically dissolved in non-porous, polymeric, or elastomeric matrices (e.g., non-erodible, erodible, environmental agent ingress, and degradable), and materials physically dispersed in non-porous, polymeric, or elastomeric matrices (e.g., non-erodible, erodible, environmental agent ingress, and degradable); laminated structures, including reservoir layers chemically similar or dissimilar to outer control layers; and other physical methods, such as osmotic pumps, or adsorption onto ion-exchange resins.

Chemical systems include, but are not limited to, chemical erosion of polymer matrices (e.g., heterogeneous, or homogeneous erosion), or biological erosion of a polymer matrix (e.g., heterogeneous, or homogeneous). Additional discussion of categories of systems for controlled release may be found in Agis F. Kydonieus, *Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications*, 1980 (CRC Press, Inc.).

The methods of the invention can be used to treat a patient that is affected with a disorder involving or arising from pathological inflammation, or to prophylactically treat a patient at risk for a particular disorder. The dosage regimes that are necessary for prophylactic versus therapeutic treatment can vary, and will need to be designed for the specific use and disorder treated.

In some methods, two or more agents (e.g., monoclonal antibodies with different binding specificities) are administered simultaneously, in which case the dosage of each agent administered falls within the ranges indicated. Intervals can also be irregular as

indicated by measuring receptor saturation levels or by following other indicia of the disease process.

Those of skill will readily appreciate that dose levels can vary as a function of the specific agent, the severity of the symptoms and the susceptibility of the subject to side effects. Some of the specific agents are more potent than others. Preferred dosages for a given agent are readily determinable by those of skill in the art by a variety of means. A preferred means is to measure the physiological potency of a given agent.

THERAPEUTIC INDICATIONS

The controlled release formulations of the present invention can be used to obtain a wide range of desirable effects. Particularly the formulations of the invention are useful in treating essentially any disease state or symptom that is treatable by long term administration of anti-inflammatories that target pathological inflammation.

The invention also provides methods of treatment that exploit the ability of anti-alpha-4 integrin agents to block alpha-4-dependent interactions. The alpha-4-dependent interaction with the VCAM-1 ligand on endothelial cells is an early event in many inflammatory responses, including those of the central nervous system. Undesired diseases and conditions resulting from inflammation and having acute and/or chronic clinical exacerbations include multiple sclerosis (Yednock *et al.*, 1992 *Nature* 356: 63; Baron *et al.*, 1993 *J. Exp. Med.* 177: 57), meningitis, encephalitis, stroke, other cerebral traumas, inflammatory bowel disease (IBD) including ulcerative colitis and Crohn's disease (CD) (Hamann *et al.*, 1994 *J. Immunol.* 152: 3238), (Podolsky *et al.*, 1993 *J. Clin. Invest.* 92: 372), rheumatoid arthritis (van Dinther-Janssen *et al.*, 1991 *J. Immunol.* 147: 4207; van Dinther-Janssen *et al.*, 1993 *Annals Rheumatic Diseases* 52: 672); Elices *et al.*, 1994 *J. Clin. Invest.* 93: 405); Postigo *et al.*, 1992 *J. Clin. Invest.* 89: 1445), asthma (Mulligan *et al.*, 1993 *J. Immunol.* 150: 2407) and acute juvenile onset diabetes (Type 1) (Yang *et al.*, 1993 *PNAS* 90: 10494); Burkly *et al.*, 1994 *Diabetes* 43: 529); Baron *et al.*, 1994 *J. Clin. Invest.* 93: 1700), AIDS dementia (Sasseville *et al.*, 1994 *Am. J. Path.* 144: 27); atherosclerosis (Cybulsky *et al.*, 1991 *Science* 251: 788-91, Li *et al.*, 1993 *Arterioscler. Thromb.* 13: 197), nephritis (Rabb *et al.*, 1995 *Springer Semin. Immunopathol.* 16: 417-25), retinitis, atopic dermatitis, psoriasis, myocardial ischemia, chronic prostatitis, complications from sickle cell anemia, lupus erythematosus, and acute leukocyte-mediated lung injury such as occurs in adult respiratory distress syndrome.

Inflammatory bowel disease is a collective term for two similar diseases referred to as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis. CD is an idiopathic, chronic ulceroinflammatory disease characterized by sharply delimited and typically transmural involvement of all layers of the bowel wall by a granulomatous inflammatory reaction. Any segment of the gastrointestinal tract, from the mouth to the anus, may be involved, although the disease most commonly affects the terminal ileum and/or colon. Ulcerative colitis is an inflammatory response limited largely to the colonic mucosa and submucosa. Lymphocytes and macrophages are numerous in lesions of inflammatory bowel disease and may contribute to inflammatory injury.

Asthma is a disease characterized by increased responsiveness of the tracheobronchial tree to various stimuli potentiating paroxysmal constriction of the bronchial airways. The stimuli cause release of various mediators of inflammation from IgE-coated mast cells including histamine, eosinophilic and neutrophilic chemotactic factors, leukotrienes, prostaglandin and platelet activating factor. Release of these factors recruits basophils, eosinophils and neutrophils, which cause inflammatory injury.

Atherosclerosis is a disease of arteries (e.g., coronary, carotid, aorta and iliac). The basic lesion, the atheroma, consists of a raised focal plaque within the intima, having a core of lipid and a covering fibrous cap. Atheromas compromise arterial blood flow and weaken affected arteries. Myocardial and cerebral infarcts are a major consequence of this disease.

Macrophages and leukocytes are recruited to atheromas and contribute to inflammatory injury.

Rheumatoid arthritis is a chronic, relapsing inflammatory disease that primarily causes impairment and destruction of joints. Rheumatoid arthritis usually first affects the small joints of the hands and feet but then may involve the wrists, elbows, ankles and knees. The arthritis results from interaction of synovial cells with leukocytes that infiltrate from the circulation into the synovial lining of joints. See e.g., Paul, *Immunology* (3d ed., Raven Press, 1993).

Another indication for chronic dosage of anti alpha-4 agents is in treatment of organ or graft rejection. Over recent years there has been a considerable improvement in the efficiency of surgical techniques for transplanting tissues and organs such as skin, kidney, liver, heart, lung, pancreas and bone marrow. Perhaps the principal outstanding problem is the lack of satisfactory agents for inducing immunotolerance in the recipient to the transplanted allograft or organ. When allogeneic cells or organs are transplanted into a host

(i.e., the donor and donee are different individuals from the same species), the host immune system is likely to mount an immune response to foreign antigens in the transplant (host-versus-graft disease) leading to destruction of the transplanted tissue. CD8⁺ cells, CD4⁺ cells and monocytes are all involved in the rejection of transplant tissues. Antibodies directed to alpha-4 integrin are useful, *inter alia*, to block alloantigen-induced immune responses in the donee thereby preventing such cells from participating in the destruction of the transplanted tissue or organ. See, e.g., Paul *et al.*, 1996 *Transplant International* 9: 420-425; Georczynski *et al.*, 1996 *Immunol.* 87: 573-580; Georczynski *et al.*, 1995 *Transplant. Immunol.* 3: 55-61; Yang *et al.*, 1995 *Transplantation* 60: 71-76; Anderson *et al.*, 1994 *APMIS* 102: 23-27.

A related use for anti alpha-4 agents is in modulating the immune response involved in "graft versus host" disease (GVHD). See e.g., Schlegel *et al.*, *J. Immunol.* 155, 3856-3865 (1995). GVHD is a potentially fatal disease that occurs when immunologically competent cells are transferred to an allogeneic recipient. In this situation, the donor's immunocompetent cells may attack tissues in the recipient. Tissues of the skin, gut epithelia and liver are frequent targets and may be destroyed during the course of GVHD. The disease presents an especially severe problem when immune tissue is being transplanted, such as in bone marrow transplantation; but less severe GVHD has also been reported in other cases as well, including heart and liver transplants. The therapeutic agents of the present invention are used, *inter alia*, to block activation of the donor T-cells thereby interfering with their ability to lyse target cells in the host.

A further use of anti alpha-4 agents of the invention is inhibiting tumor metastasis. Several tumor cells have been reported to express alpha-4 integrin and antibodies to alpha-4 integrin have been reported to block adhesion of such cells to endothelial cells (Steinback *et al.*, 1995 *Urol. Res.* 23: 175-83); Orosz *et al.*, 1995 *Int. J. Cancer* 60: 867-71; Freedman *et al.*, 1994 *Leuk. Lymphoma* 13: 47-52; Okahara *et al.*, 1994 *Cancer Res.* 54: 3233-6).

A further use of the anti-alpha-4 agents is in treating multiple sclerosis. Multiple sclerosis (MS) is a progressive neurological autoimmune disease that affects an estimated 250,000 to 350,000 people in the United States. Multiple sclerosis is thought to be the result of a specific autoimmune reaction in which certain leukocytes attack and initiate the destruction of myelin, the insulating sheath covering nerve fibers. In an animal model for multiple sclerosis, murine monoclonal antibodies directed against alpha-4 beta-1 integrin have been shown to block the adhesion of leukocytes to the endothelium, and thus prevent inflammation of the central nervous system and subsequent paralysis in the animals.

3A

The onset of MS may be dramatic or so mild as to not cause a patient to seek medical attention. The most common symptoms include weakness (in one or more limbs, visual blurring due to optic neuritis, sensory disturbances, diplopia and ataxia. The course of disease may be stratified into three general categories: (1) relapsing MS, (2) chronic progressive MS, and (3) inactive MS. Relapsing MS is characterized by recurrent attacks of neurologic dysfunction. MS attacks generally evolve over days to weeks and may be followed by complete, partial or no recovery. Recovery from attacks generally occurs within weeks to several months from the peak of symptoms, although rarely some recovery may continue for 2 or more years.

Chronic progressive MS results in gradually progressive worsening without periods of stabilization or remission. This form develops in patients with a prior history of relapsing MS, although in 20% of patients, no relapses can be recalled. Acute relapses also may occur during the progressive course.

A third form is inactive MS. Inactive MS is characterized by fixed neurologic deficits of variable magnitude. Most patients with inactive MS have an earlier history of relapsing MS.

The course of MS is also dependent on the age of the patient. For example, favourable prognostic factors include early onset (excluding childhood), a relapsing course and little residual disability 5 years after onset. By contrast, poor prognosis is associated with a late age of onset (*i.e.*, age 40 or older) and a progressive course. These variables are interdependent, since chronic progressive MS tends to begin at a later age than relapsing MS. Disability from chronic progressive MS is usually due to progressive paraplegia or quadriplegia in individual patients. In one aspect of the invention, patients will preferably be treated when the patient is in remission rather than in a relapsing stage of the disease.

Short-term use of either adrenocorticotrophic hormone (ACTH) or oral corticosteroids (*e.g.*, oral prednisone or intravenous methylprednisolone) is the only specific therapeutic measure for treating patients with acute exacerbation of MS.

Newer therapies for MS include treating the patient with interferon beta-1b, interferon beta-1a, and copaxone® (formerly known as copolymer 1). These three drugs have been shown to significantly reduce the relapse rate of the disease. These drugs are typically self-administered intramuscularly or subcutaneously.

None of the currently available treatments inhibit demyelination or MS. One aspect of the invention contemplates treating MS with agents disclosed herein either alone or in

combination with other standard treatment modalities. Standard treatment modalities include but are not limited to the following. Additional treatment modalities not discussed herein for use in treating MS in combination with the methods and compositions disclosed herein depending on the state of disease in the patient would be evident to the skilled practitioner.

- 5 Such additional treatment modalities for MS other pathological inflammation would include other immunomodulators or immunosuppressants.

The agents and pharmaceutical compositions discussed *supra* can be chronically administered for prophylactic and/or therapeutic treatments of the previously listed inflammatory disorders, including multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, asthma, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, organ or graft rejection and graft versus host disease. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient suspected of, or already suffering from such a disease in an amount sufficient to cure, or at least partially arrest, the symptoms of the disease and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as a therapeutically- or pharmaceutically-effective dose.

- 10 In prophylactic applications, pharmaceutical compositions are chronically administered to a patient susceptible to, or otherwise at risk of, a particular disease in an amount sufficient to eliminate or reduce the risk or delay the onset of the disease. Such an amount is defined to be a prophylactically effective dose. In patients with multiple sclerosis in remission, risk may be assessed by NMR imaging or, in some cases, by presymptomatic indications observed by the patient.

- Effective dosage regimes of the compositions of the present invention, for the treatment of the above described conditions will vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, and other medicaments administered. Thus, treatment dosages will need to be titrated to optimize safety and efficacy. In general, each administration of the dosage regime will range from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg of the host body weight. One preferred dosage regimen is 300 mg administered once per month for a period of at least 6 months, more preferably 12 months and perhaps over the course of several years. Another dosage regimen that is preferred is a 3 mg per kilogram of patient weight per month. Such a regimen may be preferable for pediatric or adolescent patients in need of therapy.

36

COMBINATION THERAPIES

The anti-alpha-4 agents of the invention can be used with effective amounts of other therapeutic agents against acute and chronic inflammation. Such agents include other antagonists of adhesion molecules (e.g., other integrins, selectins, and immunoglobulin (Ig) super family members (see Springer, 1990 *Nature* 346: 425-433; Osborn, 1990 *Cell* 62: 3; Hynes, 1992 *Cell* 9: 11). Integrins are heterodimeric transmembrane glycoproteins consisting of an α chain (120-180 kDa) and a β chain (90-110 kDa), generally having short cytoplasmic domains. For example, three important integrins (i.e., LFA-1, Mac-1 and P150,95) have different alpha subunits, designated CD11a, CD11b and CD11c, and a common beta subunit designated CD18. LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$) is expressed on lymphocytes, granulocytes and monocytes, and binds predominantly to an Ig-family member counter-receptor termed ICAM-1 and related ligands. ICAM-1 is expressed on many cells, including leukocytes and endothelial cells, and is up-regulated on vascular endothelium by cytokines such as TNF and IL-1. Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) is distributed on neutrophils and monocytes, and also binds to ICAM-1. The third β_2 integrin, P150,95 ($\alpha_X\beta_2$), is also found on neutrophils and monocytes. The selectins consist of L-selectin, E-selectin and P-selectin.

Other anti-inflammatory agents that can be used in combination with the anti-alpha-4 agents include antibodies and other antagonists of cytokines, such as interleukins IL-1 through IL-13, tumor necrosis factors α and β , interferons α , β and γ , tumor growth factor beta (TGF- β), colony stimulating factor (CSF) and granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF). Other anti-inflammatory agents include antibodies and other antagonists of chemokines such as MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, exotaxin and IL-8. Other anti-inflammatory agents include NSAIDS, steroids and other small molecule inhibitors of inflammation. Formulations, routes of administration and effective concentrations of agents for combined therapies are as described above for the humanized antibodies against alpha-4 integrin.

Additional agents for use in combination with agents which mediate alpha-4 integrin or dimers comprising alpha-4 integrin and treat inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's Disease (CD) and ulcerative colitis (UC), include but are not limited to 5-aminosalicylates, glucocorticoids, thioguanine derivatives, methotrexate (MTX), cyclosporine, antibiotics, and infliximab.

5-Aminosalicylates include sulfasalazine (also known as Azulfidine) which is a conjugate of mesalamine linked to sulfapyridine by a diazo bond and is usually administered

37

in an amount of 500 mg/day to about 6 g/day. 5-Aminosalicylates can also be co-administered with a glucocorticoid. Preferably, a 5-aminosalicylate is used in combination therapy with one of the other agents discussed herein to treat ulcerative colitis, however it can also be used to treat Crohn's disease. Non-sulfonamide containing formulations of mesalamine include but are not limited to ASACOL®, CLAVERSA, SALOFALK, PENTASA®, DIPENTUM®, COLAZIDE and ROWASA®.

Glucocorticoids have been a mainstay of treatment for acute severe exacerbations of IBD since 1955, when they first were shown to be efficacious in UC. Oral prednisone can be administered in conjunction with any of the agents disclosed herein. Typically, 20 to 40 mg of oral prednisone is administered once a day. Glucocorticoids can also be administered intravenously and via enemas in combination with or concurrently with or within a short time before/after an anti- α -4 integrin agent is administered. For example, hydrocortisone is available as a retention enema (100 mg/60 mL) and the usual dose is one 60-mL enema per night for 2 to 3 weeks. This can be altered when used in combination with the therapies and agents discussed herein as would be understood by the artisan of ordinary skill. Other steroids that can be used include, but are not limited to, prednisolone methasulfobenzoate, tixocortol pivalate, fluticasone propionate, beclomethasone dipropionate, and budesonide.

Thioguanine derivatives are also useful in the treatment of IBD, CD and UC. These include but are not limited to 6-mercaptopurine (6-MP) and azathioprine (IMURAN). The two drugs can be used interchangeably in combination with any of the α -4 integrin modulating agents discussed herein.

Methotrexate (MTX) is also contemplated for use in combination with the α -4 integrin regulatory agents discussed herein. Preferably, MTX is administered via intramuscular injection (i.m.) to the subject in combination with an anti- α -4 integrin agent. MTX is effective in steroid-dependent CD, but not as useful in UC. MTX can be administered in amounts of about 15 to about 25 mg per week per subject or as necessary as determined by the artisan of ordinary skill.

Cyclosporines (e.g., SANDIMMUNE®, NEORAL®) can also be used in combination with the α -4 integrin modulating agents discussed herein to treat pathological inflammation of the bowel. This can be used to treat acute, severe UC, which does not respond to glucocorticoids.

Infliximab (i.e., REMICADE®) can also be used to treat CD in combination with the α -4 integrin modulating agents indicated herein. Infliximab is an immunoglobulin that

30

binds to TNF and thereby neutralizes its activity. Other anti-TNF antibodies, such as CDP571, can also be used in combination with the alpha-4 integrin modulating agents disclosed herein.

Antibiotics are also contemplated for use in combination with the alpha-4 integrin modulating agents indicated herein to modulate UC, IBD and CD. For example, patients can be treated with metronidazole or ciprofloxacin (or pharmacological equivalents thereof) in combination with an alpha-4 integrin mediating agent or in the form of an admixture.

Also contemplated is the use of supportive therapies for IBD, CD and UC in conjunction with agents that mediate alpha-4 integrin or dimers comprising alpha-4 integrin and treat inflammatory bowel disease, Crohn's Disease and ulcerative colitis. Supportive therapies include, but are not limited to, analgesics, anticholinergic and antidiarrheal agents. Combining such supportive therapies can be useful in the beginning of a treatment regimen in reducing a patient's symptoms and improving their quality of life. Supportive therapies include administering oral iron, folate, and vitamin B₁₂. Antidiarrheal agents include, but are not limited to diphenoxylate, codeine, loperamide, and anticholinergics (or pharmacological equivalents thereof), which can be administered to patients with mild disease to reduce the frequency of bowel movements and relieve rectal urgency. Cholestyramine can be used in patients to prevent bile salt-induced colonic secretion in patients who have already undergone limited ileocolic resections prior to treatment with the chronic regimens described herein. Anticholinergic agents include, but are not limited to, clidinium bromide, dicyclomine hydrochloride, tincture of belladonna and the like, and are useful to reduce abdominal cramps, pain and rectal urgency.

For treatment of MS, the anti-alpha-4 integrin agents (e.g., anti-alpha-4 integrin antibodies, small compound alpha-4 integrin antagonists and the like) can be combined with other compounds or compositions used to treat, ameliorate or palliate symptoms associated with MS.

Other agents utilized to treat, ameliorate or palliate symptoms associated with MS, include but are not limited to: muscle relaxants (e.g., Diazepam, cyclobenzaprine, Clonazepam, clonidine, primidone, and the like), anticholinergics (e.g., propantheline, dicyclomine, and the like), central nervous system stimulants (e.g., Pemoline), non-steroidal anti-inflammatory agents (NS such as ibuprofen, naproxen and ketoprofen), interferons, immune globulin, glatiramer (Copaxone®), mitoxantrone (Novantrone®), misoprostol, tumor

39

necrosis factor-alpha inhibitors (e.g., Pirfenidone, infliximab and the like) and corticosteroids (e.g., glucocorticoids and mineralocorticoids).

Common agents for treating multiple sclerosis include interferon beta-1b (Betaseron®), interferon beta-1a (Avonex®), high-dose interferon beta-1a (Rebif),
5 Glatiramer (Copaxone®), immune globulin, mitoxantrone (Novantrone®), corticosteroids (e.g., prednisone, methylprednisolone, dexamethasone and the like). Other corticosteroids may also be used and include but are not limited to cortisol, cortisone, fludrocortisone, prednisolone, 6α-methylprednisolone, triamcinolone, and betamethasone.

Dosage forms of the agents to be used in combination with the compounds and
10 compositions disclosed herein would vary depending on the subject and drug combination being utilized. For example, interferons are typically administered as follows: Interferon beta-1a (Avonex®) is administered 30 µg once a week; interferon beta-1a is administered at about 22 µg or 44 µg three times a week; and interferon beta-1b (Betaseron®) is administered at 250 µg on alternate days (Durelli *et al.*, *Lancet* 359: 1453-60, 2002). Typically the
15 interferons are administered for relapsing or remitting multiple sclerosis. Thus in combination with the anti-alpha-4 integrin agents disclosed herein, preferred ranges of interferons may include about 0.1 µg to about 250 µg and more preferably about 0.5 µg to about 50 µg, depending on the manner in which the agent is administered in conjunction with the other anti-alpha-4 integrin compounds and compositions disclosed herein.

20 NS or NSAIDs contemplated for use with this invention include but are not limited to non-selective COX inhibitors and selective COX-2 inhibitors. Non-selective COX inhibitors include but are not limited to salicylic acid derivatives (e.g., aspirin, sodium salicylates, choline magnesium trisalicylate, salsalate, diflunisal, sulfasalazine, and olsalazine), para-aminophenol derivatives (e.g., acetaminophen), indole and indene acetic acids (e.g., tolmetin,
25 diclofenac, and ketorolac), heteroaryl acetic acids (e.g., abuprofen, naproxen, flurbiprofen, ketoprofen, fenpropfen, and oxaprozin), anthranilic acids or fenamates (e.g., mefenamic acid and meclofenamic acid), enolic acids (e.g., oxicams such as piroxicam and meloxicam), and alkanones (e.g., nabumetone). Selective COX-2 inhibitors include diaryl-substituted furanones (e.g., rofecoxib), diaryl-substituted pyrazoles (e.g., celecoxib), indole acetic acids
30 (e.g., etodolac), and sulfonanilides (e.g., nimesulide). NS are oftentimes administered in combination with interferon to lessen the flu-like symptoms experienced by patients receiving, for example, Avonex®. Common NS agents include naproxen, ibuprofen and

10

ketoprofen. Paracetamol is also frequently administered to patients. *See, Reess et al.*, 2002 *Mult. Scler.* 8: 15-8.

Glatiramer acetate (GA, Copaxone®) is a synthetic molecule that inhibits activation of myelin basic protein-reactive T cells and induces a T-cell repertoire characterized by anti-inflammatory effects. Moreover, Glatiramer can access the central nervous system (CNS), whereas interferon-beta cannot (Dhib-Jalbut, 2002 *Neurology* 58: S3-9; Weinstock-Guttman *et al.*, 2000 *Drugs* 59: 401-10).

Mitoxantrone is an anthracenedione synthetic agent, which has been shown to be effective for treating secondary progressive multiple sclerosis (SP-MS). However, use of this drug is again limited by its cumulative cardiotoxicity (Weinstock-Guttman *et al.*, 2000).

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) may be a key cytokine in demyelination (Walker *et al.*, 2001 *Mult. Scler.* 7: 305-12). Thus use of agents that antagonize TNF- α function or inhibit its synthesis may be useful in combination with the agents and compounds disclosed herein. This can include anti-TNF- α antibodies (e.g., infliximab) as well as agents such as pirfenidone. Pirfenidone is a non-peptide drug, which has been shown to decrease synthesis of TNF- α and to block receptors for TNF- α . *Id.*

The long mainstay in most demyelinating conditions and diseases has been the use of ACTH, glucocorticoids and corticoid steroids. These agents are used for their anti-edema and anti-inflammatory effects. ACTH is commonly administered to a subject at 80 U given intravenously in 500 mL of 5% dextrose and water over 6-8 hours for 3 days. It may also be administered at 40 U/ml intramuscularly at a dose of 40 U every 12 hours for 7 days, with the dose then reduced every 3 days. *See*, S. Hauser, "Multiple sclerosis and other demyelinating diseases," in *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2287-95 (13th ed., Isselbacher *et al.*, ed. 1994). Methylprednisolone is typically administered slowly in 500 ml D5W over 6 hours, preferably in the morning. Common dosages include 1000 mg daily for 3 days, 500 mg daily for 3 days and 250 mg daily for 3 days. *Id.* A methylprednisolone-prednisone combination is also commonly administered. Typically about 1,000 mg of intravenous methylprednisolone is administered over three days followed by oral prednisone at 1 mg/kg per day for 14 days. Thus, for use in combination with the compounds and compositions disclosed herein, the steroids may be administered in amounts ranging from about 1 to about 1,000 mg/kg over about 1 to 14 days, as needed.

A side effect in demyelinating conditions such as MS, is fatigue and decreased cognitive function. Agents such as amantadine hydrochloride and pemoline have been

frequently used to treat fatigue associated with MS (Geisler *et al.*, 1996 *Arch. Neurol.* 53: 185-8).

The benefit of such combination therapies is that it may lessen the class-specific and agent-specific side effects currently encountered with some of the drugs. Class-specific side effects of interferon-beta include fever, chills, myalgias, arthralgias and other flu-like symptoms beginning 2-6 hours after injection and typically resolving 24 hours post injection. Occasionally interferon-beta also induces transient worsening of preexisting MS symptoms. Agent specific side effects include injection site reactions with interferon beta-1b. Management of these effects can be accomplished by tailoring the dose and time of administration, prescribing appropriate combinations of acetaminophen, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NS or NSAIDS) and steroids. See Munschauer *et al.*, 1997 *Clin. Ther.* 19: 883-93.

Thus, combinations of drugs that can lessen the quantity of a particular drug administered may reduce adverse side effects experienced by a patient.

When administered in combination, the small compound alpha-4-integrin antagonists may be administered in the same formulation as these other compounds or compositions, or in a separate formulation. When administered in combination, the anti-alpha-4-antibodies are generally administered in a separate formulation than the other compounds and compositions. When administered in combinations, the anti-alpha-4 agents may be administered prior to, following, or concurrently with the other compounds and compositions used to treat, ameliorate, or palliate symptoms.

EXAMPLES

The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of representative examples of how to make and use embodiments of the present invention, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention, nor are they intended to represent that the experiments below are all or the only experiments performed. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (*e.g.*, amounts, temperature, *etc.*) but some experimental errors and deviations should be accounted for. Unless indicated otherwise, parts are parts by weight, molecular weight is weight average molecular weight, temperature is in degrees Centigrade, and pressure is at or near atmospheric.

42

EXAMPLE 1**CONTROLLED TRIAL OF NATALIZUMAB IN RELAPSING MULTIPLE SCLEROSIS****Patient Population**

5 Twenty-six clinical centers in the United States, Canada, and the United Kingdom enrolled 213 patients from September 1999 until May 2000. The institutional review board or central and local ethics committee approved the protocol. All patients gave written informed consent. Study oversight was provided by an independent safety data monitoring committee.

10 Eligible subjects were required to be age 18 through 65 years, with Poser criteria defined clinically or laboratory supported definite MS, either relapsing-remitting or secondary progressive, (Poser *et al.*, 1983 *Ann. Neurol.* 13: 227-31; Lublin *et al.*, 1996 *Neurology* 46: 907-11), a history of at least two relapses within the previous two years, a base-line Kurtzke Expanded Disability Status Score (EDSS) (Kurtzke, 1983 *Neurology* 33: 1444-52) between 2 and 6.5, and a minimum of three lesions on T₂-weighted brain MRI. Patients were excluded if they received immunosuppressive or immunomodulating treatments within the past 3 months, or experienced a relapse, or received systemic corticosteroids within the past 30 days.

Study Design and Randomization

20 Patients were randomly assigned to one of three treatment groups: 3 mg/kg natalizumab, 6 mg/kg natalizumab, or placebo according to a computer-generated block randomization schedule. Patients received six intravenous infusions at 28-day intervals and then had six months of safety follow-up. The investigator, all other study personnel, and patients were blinded to treatment assignment.

Study Procedures and Endpoints

30 Unenhanced proton density T₂-weighted and Gd-enhanced T₁-weighted MRI brain scans were obtained during the screening phase (month -1), immediately before each treatment (month 0-5), and one month after the last treatment (month 6). Follow-up MRI scans were obtained at months 9 and 12. Forty-six contiguous, 3-mm thick, axial slices through the brain were acquired. MRI analysis was performed by a single center blinded to

patient treatment and history. Lesions were identified on hard copy images by two experienced clinicians working by consensus.

The prospective primary outcome measure was the number of new Gd-enhancing lesions over the 6-month treatment period, defined as the period following the first infusion to one month after the last infusion. Other MRI parameters evaluated included: the number of persistent Gd-enhancing lesions (enhancing lesions that had also enhanced on the previous monthly scan); the volume of Gd-enhancing lesions (measured by a semiautomated local thresholding method; Grimaud *et al.*, 1996 *Magn. Reson. Imaging* 14: 495-505); the number of new active lesions (*i.e.*, new Gd-enhancing lesions plus new or enlarging, non-enhancing T2 lesions); and the number of active scans (*i.e.*, containing one or more new Gd-enhancing lesions).

Clinical endpoints included relapse frequency and changes in EDSS, and a self-reported global assessment using a visual-analog scale (VAS). All adverse events were recorded. Patients were examined at scheduled quarterly intervals, and at unscheduled visits for suspected relapses, by the treating and evaluating neurologists who were both unaware of the patient's treatment assignment. The treating neurologist performed a medical history and examination, and recorded adverse events. The evaluating neurologist assessed neurological status and assigned an EDSS score without knowledge of the patient's history or prior EDSS scores.

An objective relapse was defined as the occurrence of an acute episode of new or worsening MS symptoms lasting at least 48 hours following a stable period of at least 30 days. It was also accompanied by an increase of at least one point in the EDSS score, an increase of at least one point on two functional system scores (FSS), or an increase of at least two points on one FSS compared with base-line, as determined by the evaluating neurologist. Neurological symptoms that did not meet the above criteria for relapse, but were assessed by the treating neurologist to constitute a relapse, were also recorded (total relapses).

On a visual analog scale (VAS), patients marked a location along a 10-cm line that reflected their assessment of their overall well-being at base-line and after 3 and 6 months treatment, with higher scores reflecting greater well-being.

Patients were followed clinically to month 12. Patients who discontinued treatment, but who did not reach the endpoint, were encouraged to return for follow-up assessments.

HN

Statistical Analysis

Sample size estimates were based on the number of new Gd-enhancing lesions observed during the first 12 weeks following the first infusion in a previous clinical trial of natalizumab (Tubridy *et al.*, 1999 *Neurology* 53: 466-72). Based on the results of this previous trial, and using sample size methodology appropriate for a two-sided, two-group comparison at the 5 percent level of significance, based on the Wilcoxon-Mann-Whitney statistic (Noether, 1987 *J. Amer. Stat. Assoc.* 82: 645-7), it was calculated that approximately 73 patients were needed in each group for 80 percent power.

The primary comparison of the number of Gd-enhancing lesions between 6 mg/kg natalizumab and placebo as well as Gd-enhancing volumes were evaluated with the Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test. Missing values due to one or more MRI scans not being performed were imputed by replacing the missing value with the average number of lesions on available scans for that patient. MRI scans obtained from patients who received systemic corticosteroids within the previous 30 days were discarded and treated as missing values. The Cochran-Mantel-Haenszel correlation statistic, using equally spaced scores for the groups and rank scores for the primary outcome variable, was used to test for a dose-response relationship using data from all three groups.

Pearson's chi-square test was used to compare proportions of patients with relapses. Changes from baseline in EDSS and VAS were analyzed using a two-way ANOVA with study center and treatment groups as independent variables.

All analyses included all randomized patients and followed the intention-to-treat principle. All reported P values are two-tailed. There were no significant differences in demographic characteristics, MS disease history, entry EDSS, and MRI parameters among the three groups at base-line (Table 1).

TABLE 1: DEMOGRAPHIC AND BASELINE CHARACTERISTICS OF RANDOMIZED PATIENTS

CHARACTERISTIC		PLACEBO (N=71)	Natalizumab	
			3 MG/KG (N=68)	6 MG/KG (N=74)
Age, years	Mean	42.9	42.8	44.9
	Range	22-66	22-65	30-63
Gender N (%)	Male	25 (35.2)	21 (30.9)	15 (20.3)
	Female	46 (64.8)	47 (69.1)	59 (79.7)
MS category N (%)	R-R	45 (63.4)	47 (69.1)	52 (70.3)
	S-P	26 (36.6)	21 (30.9)	22 (29.7)
EDSS	Mean	4.40	4.21	4.32
	Range	2.0-6.5	1.0-6.5	0.0-6.5

215

CHARACTERISTIC		Natalizumab		
		PLACEBO (N=71)	3 MG/KG (N=68)	6 MG/KG (N=74)
Disease duration	Mean	10.2	11.6	13.1
Years	Range	1-32	0-40	2-39
Number of relapses	Mean	3	2.9	3.1
In past 2 years	Range	2-12	2-10	2-8
Time since last relapse	Mean	6.5	7.2	6
Months	Range	2-17	2-24	2-22
Screening T ₁ -weighted MRI (Month 1)		28 (40)	29 (43)	29 (40)
Number (%) of scans with one or more Gd-enhancing lesion(s)				
Number of Gd-enhancing brain lesions				
	Mean	1.6	1.5	1.7
	Range	0-42	0-18	0-23
Baseline T ₁ -weighted MRI (Month 0)				
Number (%) of scans with one or more new Gd-enhancing lesion(s)		22 (31)	29 (43)	32 (43)
Number of new Gd-enhancing brain lesions				
	Mean	1.3	1.3	1.4
	Range	0-28	0-32	0-12

Primary outcome

Patients in the placebo group exhibited an average of 9.6 new Gd-enhancing lesions during the six-month treatment period. The corresponding values in the groups receiving natalizumab were 0.7 for the 3 mg/kg group ($P < 0.0001$) and 1.1 for the 6 mg/kg group ($P < 0.0001$) (see Table 2). This difference constituted a 93% and an 88% reduction in new Gd-enhancing lesions in the 3 mg/kg and 6 mg/kg groups, respectively. A difference between treatment groups compared with placebo was apparent after the first infusion (Fig. 1).

TABLE 2: SUMMARY OF MRI ACTIVITY DURING TREATMENT (MONTHS 1-6) AND FOLLOW - UP (MONTHS 9 AND 12)

	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	P VALUE*
New enhancing lesions M1-				
Mean	9.6	0.7	1.1	(i) < 0.0001
Median	2.0	0	0	(ii) < 0.0001
SD	27.4	2.1	2.7	
Persistent enhancing lesions M1-6				
Mean	3.6	0.8	1.3	< 0.0001
Median	1	0	0	

46

	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	P VALUE*
SD	6.5	1.9	2.6	
New active lesions M1-6				
Mean	9.7	0.8	1.1	<0.0001
Median	2.0	0	0	
SD	27.4	2.2	3	
Active scans M1-6 (%)	39%	9%	11%	(i) <0.0001 (ii) <0.0001
Enhancing lesion volume M1-6(mm ³)				
Mean	1169.0	156	279.0	(i) 0.005 (ii) 0.01
Median	266	0	0	
SD	2666	359.0	632.0	
New enhancing lesions M9 and 12				
Mean	2.5	2.6	2.1	(i) 0.90 (ii) 0.59
Median	1.0	0.5	0	
SD	4.37	4.58	4.96	
Persistent enhancing lesions M9 and 12				
Mean	0.2	0.1	0.1	0.029
Median	0	0	0	
SD	0.64	0.32	0.3	
New active lesions M9 and 12				
Mean	2.7	2.8	2.3	0.424
Median	1.0	0.5	1.0	
SD	4.49	5.69	5.11	
Active scans M9 and 12 (%)	42%	40%	35%	
Enhancing lesion volume M9 and 12(mm ³)				
Mean	427.0	323	233	0.260
Median	88.0	31.0	0	
SD	797.0	591.0	686	

*(i) comparison of placebo vs. 3 mg/kg natalizumab; (ii) comparison placebo vs. 6 mg/kg natalizumab.

Secondary MRI Outcomes

5 There was a significant and marked reduction in the cumulative number of persistent enhancing lesions, new active lesions, total volume of enhancing lesions, and percentage of active scans from months 1-6 (Table 2; Fig. 2).

Clinical efficacy outcomes

10 During the six month treatment period, a total of 35 relapses were reported in 26 of the 71 placebo patients; 18 relapses were reported in 13 of the 68 patients receiving 3 mg/kg natalizumab, and 15 relapses were reported in 14 of the 74 patients receiving 6 mg/kg (P=0.05, placebo vs. all natalizumab-treated patients). Applying the more stringent objective relapse criteria, the effect was equally strong: 18 relapses in 15 placebo patients; 3 relapses in

3 patients receiving 3 mg/kg natalizumab; 8 relapses in 8 patients receiving 6 mg/kg natalizumab ($P=0.05$). More relapses in the placebo group required steroid treatment than in the treated arms (22 in placebo, 5 in the 3 mg/kg natalizumab, and 7 in the 6 mg/kg natalizumab groups, $P=0.007$, placebo vs. all natalizumab-treated patients).

5 On the VAS, patients in the placebo group reported no change, while those in the natalizumab groups reported an improvement in well-being by month 6, at which time the difference between groups was significant ($P=0.033$, placebo vs. all natalizumab-treated patients). No significant changes in EDSS were observed in any group during treatment.

10 Antibody Concentration and Receptor Saturation

15 Serum samples were collected from patients at each visit and analyzed quantitatively for antibodies directed specifically against natalizumab using an enzyme linked immunosorbant assay (ELISA). Natalizumab serum levels and receptor occupancy by natalizumab were also measured in a subgroup of 12 to 14 patients per treatment group before each infusion and at 2 hours, 24 hours, 1, 2, and 3 weeks after the first and last infusions.

20 Serum antibody concentrations were determined using an ELISA assay. In brief, a 2.0 $\mu\text{g/mL}$ solution of a capture antibody that binds specifically to natalizumab was prepared in a solution containing sodium bicarbonate to pH 8.3. 100 μL of the antibody solution was added to each well of a Costar 96-well microtiter plate. The plate was covered with plate sealing tape and incubated at ambient temperature for 12-26 hours. The plate was aspirated, 200 μL of blocking buffer (0.25% casein in PBS, pH 7.4) added to each well, and incubated for an additional hour at ambient temperature. Plates were then either dessicated and stored for later use, or washed once with 300 μL wash buffer (TBS, pH 7.5 containing 0.05% Tween-20). If plates were dessicated, they were rehydrated just prior to use by adding 300 μL wash buffer to each well and incubating for 1-2 minutes. Plates were aspirated and inverted onto tissue paper to absorb excess moisture.

25 Test samples were diluted in casein diluent prior to the ELISA (0.25% casein in PBS, with 0.05% Tween 20, pH 7.4). Typically, two or three dilutions of each sample are tested to ensure the natalizumab values were accurate. Dilution control samples were also prepared using known quantities of natalizumab to monitor the accuracy of the remaining steps.

100 μL of reference standard, test sample, or dilution control sample was added to each well, and the plate incubated between 60-75 minutes at ambient temperature. The plates

49
were washed three times with wash buffer and remaining moisture removed. 100 μ L freshly diluted mouse anti-human IgG4-alkaline phosphatase conjugate was added to each well, and the plates were incubated for an additional 60 minutes at ambient temperature. Following incubation, plates were washed four times with wash buffer, and remaining moisture removed. 100 μ L fluorescent substrate A was added using a calibrated multichannel pipetter, and the plates incubated 45-60 minutes at ambient temperature. The levels in each well were determined using an fmax Fluorescence Microplate Reader using the SOFTmax Pro Version 1.3.1 protocol file conc102.ppr.

The results are as shown in Figs. 3 and 4. As shown in these figures, levels of natalizumab decreased between dosings, and by month 7 or 8 (*i.e.*, 2 to 3 months following the final dosing) the antibody was undetectable in the majority of patients.

As well as measuring serum antibody concentration, levels of receptor saturation, and specifically levels of VLA-4 saturation, were determined during the dosing study using FACS analysis. Determination of VLA-4 saturation was determined by an indirect immunoassay using flow cytometry.

Approximately 1 mL of a blood sample from a patient was aliquoted into two 15 mL polypropylene tubes, and cold wash buffer (human serum [Scantibodies Laboratory, Inc. Part 3SH341] diluted to 3% in PBS) added to the 14 mL mark on the tube. The tubes are centrifuged at 2,200 rpm for 5 minutes at 10-15°C, and the liquid aspirated and discarded.

The cell pellet is resuspended in cold wash buffer to a total of 1 mL.

500 μ g/mL of a natalizumab stock reference standard is prepared in wash buffer. 20 μ L of the diluted natalizumab stock reference was added to the first tube, and 20 μ L wash buffer was added to the second tube. Both tubes were incubated on ice for 30 minutes in the dark. After incubation, the tubes were filled with wash buffer up to the 14 mL mark, and centrifuged at 2,200 rpm for 5 minutes in the cold. The supernatant was aspirated, and the wash step repeated a second time. Following the second wash, the cells were resuspended in wash buffer to the 1 mL mark.

10 μ L of R-Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CDw49d antibody (Pharmingen, Cat. #31475X) was added to each tube and the tubes vortexed gently. The tubes were incubated at 2-8°C for 10-15 minutes in the dark. Following incubation, 2 mL 1X lysing solution, pH 7.4, was added and each tube gently vortexed. The tubes were incubated on ice for 10-15 minutes at 2-8°C, centrifuged 5 minutes in the cold, and the supernatant aspirated from the cell pellet. The cell pellet was resuspended in 4 mL cold staining buffer,

19

and the tubes centrifuged again at 2,200 rpm in the cold. The supernatant was then very carefully removed, 0.5 mL of a fixative solution (Ortho's Fixative pH 7.6) added, and the tubes immediately vortexed to ensure that cells were resuspended in the fixative. The tubes were covered with aluminum foil until FACS assay.

5 Each sample was then for VLA-4 receptor saturation in the samples with and without analyzed natalizumab using the FACS Calibur flow cytometer and CellQuest™ software. The CellQuest™ software allows acquisition and analysis of data from the flow cytometer.

Receptor saturation levels are shown in Fig. 5. The levels of receptor saturation for months 1-4 were determined prior to that month's dosing. The levels of receptor saturation
10 produced by one month dosage intervals were consistently fairly high, and these chronic levels were sufficient to maintain a suppression of the pathological inflammation and associated physiological hallmarks of the disease. On average, the levels of saturation were maintained for a month at a mean of at least 67% and a median of at least 75%. These levels were sufficient for the suppression of brain lesions in the treated patients (see Fig. 1). The
15 minimum level of saturation determined in the study preinfusion from month 2 to month 5 (and week 21 following administration at month 5) is particularly low as compared to the mean and median values due to a single patient with an antibody response to natalizumab.

As the receptor saturation levels dropped in the patients, so did the efficacy of the treatment. Mean receptor saturation levels of 42% and median receptor saturation levels of
20 41% receptor saturation in the treated population were not associated with suppression of brain lesions in the patient population (See Figs. 2 and 5), and thus a chronic receptor saturation level above this is necessary for effective suppression of pathological inflammation using agents such as alpha-4 inhibitors.

25 Safety and Tolerability

Repeated natalizumab treatment, at either the 3 or 6 mg/kg dose, appeared well tolerated by patients with MS over a six month treatment period. Similar numbers of patients from each group experienced treatment-emergent adverse events. Though not significant, certain adverse events occurred more commonly with natalizumab compared to placebo
30 (Table 3). A sustained mild lymphocytosis was seen in the natalizumab arms over the six month treatment period.

50

TABLE 3: ADVERSE EVENTS REPORTED MORE COMMONLY IN NATALIZUMAB-TREATED PATIENTS VERSUS PLACEBO*

	PLACEBO (71)	3 MG/KG (68)	6 MG/KG (74)
Total number of patients with adverse events	68 (96%)	62(91%)	70 (95%)
Body as whole			
Infection	10 (14%)	14 (21%)	14 (19%)
Digestive system			
Flatulence	0	4 (6%)	0 (0%)
Nervous system			
Circumoral parasthesia	1 (1.0%)	5 (7%)	2 (3%)
Respiratory system			
Sinusitis	3 (4%)	7(10%)	3(4%)
Pharyngitis	8 (11%)	10 (15%)	15 (20%)
Skin and appendages			
Rash	4 (6%)	6 (9%)	8 (11%)
Urogenital system			
Infection	10(14%)	14 (21%)	11(15%)

*To be included in the Table, a difference of at least 5 percent in the incidence of adverse events was required between the placebo arm and one of the natalizumab arms.

There were no significant differences in the number of serious adverse events (SAEs) reported in the placebo and treatment arms (*i.e.*, 7 placebo-treated patients reported 11 SAEs, 5 patients receiving natalizumab 3 mg/kg reported 5 SAEs, and 3 patients receiving natalizumab 6 mg/kg reported 4 SAEs). Of these, four were considered to be immune-mediated and related to study drug. There was one anaphylactic reaction with urticaria and bronchospasm in the 3 mg/kg group, which was rapidly reversed with antihistamines and steroid treatment. There were three reports of serum sickness, one in each group including placebo. Only one event was accompanied by a change in complement levels and all occurred at the same investigative site. Overall, these events complicated fewer than one in 250 infusions.

There were no differences in the number of patients that discontinued treatment due to an adverse event between groups (*i.e.*, 3 in the placebo group, 4 in the 3 mg/kg group and 3 in the 6 mg/kg group). There was one death in the study secondary to pleural carcinomatosis complicated by hemothorax in a placebo patient.

Rate of antibody formation was also assessed. Overall, 15 natalizumab-treated patients (11 percent) developed anti-natalizumab antibodies: 13 during the treatment period, and 2 during the post-treatment follow-up period. The clinical relevance, if any, of the presence of anti-natalizumab antibodies is not currently known.

51

Maximal serum concentrations of natalizumab were dose dependent and there was no significant accumulation observed with repeated dosing. The patients receiving natalizumab at 3 mg/kg exhibited greater than 80% saturation of the VLA-4 receptor during the treatment period; receptor occupancy was higher (approximately 90%) and more prolonged in patients receiving natalizumab 6 mg/kg.

Post-treatment Follow-up: Months 6-12

The cumulative number of new enhancing lesions and active scans (months 9 and 12 combined) were similar in all three groups (Table 2). There was a trend to less activity in the 6 mg/kg group at month 9. There was no significant difference in the total number of reported clinical relapses between the three groups: 24 in the placebo group, 24 in the 3 mg/kg group, and 26 in the 6 mg/kg group or in the number of relapses as determined by the predefined objective criteria.

This study is the first to provide strong MRI and clinical evidence in humans that selective inhibition of alpha-4 integrin-mediated leukocyte adhesion and trafficking is an effective approach to the chronic treatment of MS. Both dose levels of the alpha-4 integrin-specific humanized monoclonal antibody natalizumab demonstrated highly statistically significant effects compared with placebo on suppression of new Gd-enhancing inflammatory brain lesions in patients with MS over the six month treatment period. A reduction of these lesions in natalizumab-treated patients was observed one month after the first infusion and was sustained throughout the treatment period. For both dose levels, the reduction was approximately 90 percent, an effect greater than the 50 to 70 percent reduction reported with beta-interferons (MS/MRI Analysis Group, 1995 *Neurology* 4: 1277-1285; Jacobs *et al.*, 1996 *Ann. Neurol.* 39: 285-294; and PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, 1998 *Lancet* 352: 1498-1504).

Moreover, the effects of natalizumab on MRI outcomes in this trial are supported by clinical observations. This study was not prospectively powered to show effects on clinical outcomes. Nonetheless, treatment with natalizumab resulted in a significant reduction in relapse rate and a perception of increased well-being among patients. When all reported clinical relapses are considered, both natalizumab groups experienced significantly fewer relapses than the placebo group during six months of treatment. A significant reduction in these episodes was also observed using predefined relapse criteria; a more stringent measure, because it requires a change in objective signs. The effect of natalizumab on relapses

52

exceeds that of the currently approved treatments for MS, which display approximately 30 percent effect (MS/MRI Analysis Group, *supra*; Jacobs *et al.*, *supra*; PRISMS Study Group, *supra*; Johnson *et al.*, 1995 *Neurology* 45: 1268-76).

Importantly, no rebound effects on new MRI lesions or relapses were observed in the natalizumab groups after termination of treatment. Further, monthly infusions of natalizumab for six months were well tolerated, and associated with a safety profile similar to placebo and acceptable for chronic treatment of MS.

The results of this study provide further support for the role of alpha-4 integrin, and the immune cells that express it, in the pathogenesis of acute inflammatory brain lesions in patients with MS. The reduction in new Gd-enhancing lesions was evident after one month of treatment. This observation suggests natalizumab acts early in lesion development by preventing the appearance of new lesions.

In summary, natalizumab has demonstrated strong effects on clinically meaningful parameters in this placebo-controlled trial in patients with relapsing MS. Therapy was well tolerated during this six-month trial. The beneficial effects of natalizumab on the appearance of new inflammatory CNS lesions, the occurrence of clinical relapses and improvement in patient well-being observed in this study indicate the potential for observing effects on disability in the longer term studies currently in progress.

20

EXAMPLE 2

CONTROLLED TRIAL OF NATALIZUMAB IN CROHN'S DISEASE

Methods

In a double-blind, placebo-controlled trial, 248 patients with moderate to severely active Crohn's disease (CD) were randomized to receive two infusions of placebo or infusion of natalizumab at 3 mg/kg followed by placebo; or two infusions of natalizumab at 3 mg/kg or 6 mg/kg, at a 4-week interval. Outcome measures included the Crohn's Disease Activity Index (CDAI), health-related quality of life (QOL), and serum C-reactive protein levels.

Natalizumab increased the rates of clinical remission and clinical response, and improved QOL in patients with active CD, while demonstrating a safety profile acceptable for treatment of this disease.

Patient Population

After receiving approval from the local ethics committee, each center screened male and female patients of at least 18 years of age who had clinical evidence of moderate to severely active CD defined as a CDAI of at least 220 but less than or equal to 450. Of 311 patients screened, 248 were randomized at thirty-five study centers in Belgium, the Czech Republic, Denmark, Germany, Israel, the Netherlands, Sweden, and the United Kingdom from September 1999 to August 2000. All patients gave informed, written consent. Patients who received methotrexate, cyclosporin, or any investigational agents within 3 months were excluded; patients receiving azathioprine or 6-mercaptopurine were required to have been on a stable dose for at least 4 months. Other exclusions included prior antibody treatment; current use of oral prednisolone at a dose greater than 25 mg/day; current use of an elemental diet or parenteral nutrition; infectious or neoplastic diseases of the bowel; bowel surgery within 3 months; presence of a colostomy, ileostomy, or a colectostomy with ileorectal anastomosis; symptoms due mainly to the presence of fibrotic strictures; and clinical impression that the patient was likely in the near term to require emergency abdominal surgery.

Study Design and Randomization

Eligible patients were randomly assigned to one of four treatment regimens according to a computer-generated block randomization schedule. Each group received two intravenous infusions spaced by a 4-week interval. The four treatment regimens were two infusions of placebo; one infusion of natalizumab at 3 mg/kg followed by placebo infusion; and two infusions of natalizumab at 3 or 6 mg/kg. The investigator, all other study personnel, and patients were blinded to treatment assignment.

Study Procedures and Endpoints

The primary efficacy endpoint was the proportion of patients in remission (CDAI <150) at week 6. The CDAI incorporates eight related variables: number of liquid or very soft stools per day, severity of abdominal pain or cramping, general well-being, presence of extraintestinal manifestations of disease, presence of an abdominal mass, use of antidiarrheal drugs, hematocrit, and body weight (Best *et al.*, 1976 *Gastroenterology* 70: 439-441; and Summers *et al.*, 1979 *Gastroenterology* 77: 847-69). Scores less than 150 indicated remission; scores between 150 and 219 indicated mildly active disease, between 220 and 450

54

indicated moderately active disease, and scores greater than 450 indicated severe activity. Additional prospective endpoints were the proportion of patients demonstrating clinical response (*i.e.*, at least 70 point reduction in CDAI), health-related quality of life, as measured by an inflammatory bowel disease specific questionnaire, the IBDQ (Irvine *et al.*, 1994 *Gastroenterology* 106: 287-96), and serum levels of C-reactive protein.

Safety evaluations including the recording of adverse events and monitoring of clinical laboratories were conducted throughout the study. An independent safety data monitoring committee provided an additional level of monitoring. Serum samples were collected at each visit and analyzed for antibodies against natalizumab by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Statistical Analysis

All efficacy analyses utilized the intent-to-treat (ITT) last observation carried forward (LOCF) population, which comprised all patients randomized (n=248). Patients using rescue medications were classified as treatment failures. The safety population (n=244) comprised those randomized and dosed. Four patients were not dosed due to ineligibility.

All statistical tests were two-sided and at the 5 percent level of statistical significance. Three pair-wise tests of each active treatment compared to placebo were performed. Remission and response rates were analyzed by the Cochran Mantel-Haenszel chi-squared test (general association) (Landis *et al.*, 1978 *Int'l. Stat. Rev.* 46: 237-54) using country as strata. The effect of covariates on remission and response (yes or no) was analyzed at week 6 using logistic regression.

The sample size of 60 subjects per group was calculated to provide 80 percent power at a 5 percent significance level to detect a difference in response rates assuming a 40 percent response rate in the natalizumab groups and a 15 percent response rate in the placebo group.

Two-way analysis of variance models with fixed effects for country and treatment group were used to compare the mean CDAI decreases from base-line. Contrasts comparing each of the active treatment groups to the placebo group were tested.

C-reactive protein and IBDQ data were analyzed using the Wilcoxon-Mann-Whitney test to compare the change from base-line between each of the three active treatment groups and placebo. In a prospectively planned analysis, the C-reactive protein levels were compared for patients with a value above the upper limit of the normal range of 8 mg/l at base-line (week 0).

Results

Demographic characteristics, CDAI scores, site of disease, and medications were comparable among the groups at base-line (Table 4). At the time of the week 0 assessment, most patients were receiving other medications for CD including 5-ASA compounds (48 to 64 percent), oral steroids (46 to 63 percent), or azathioprine/6-mercaptopurine (18 to 37 percent) with or without other agents. Twenty-seven patients withdrew from the study prior to completing 12 weeks: 10 in the placebo group, and 6, 5, and 6 in the 3+0, 3+3, and 6+6 mg/kg natalizumab groups, respectively.

TABLE 4: DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS AND MEDICATIONS AT BASE-LINE

CHARACTERISTIC	PLACEBO	3+0 MG/KG	3+3 MG/KG	6+6 MG/KG
Patients randomized	63	68	66	51
Mean age and range (yr)	34 (18-68)	36 (18-66)	36 (19-64)	35 (19-62)
Mean disease duration and range (yr)	8.9 (0.3-64.3)	8.4 (0.5-27.5)	8.1 (0.5-22)	7.8 (0.6-29)
Mean base-line CDAI and range*	300 (186-447)	288 (211-427)	298 (219-442)	296 (210-429)
Disease site:				
Ileal	15 (24%)	9 (13%)	17 (26%)	12 (24%)
Colonic	11 (17%)	16 (24%)	16 (24%)	16 (31%)
Ileocolonic	37 (59%)	43 (63%)	33 (50%)	23 (45%)
Gender: Female	33 (52%)	41 (60%)	36 (55%)	26 (51%)
Mean weight and range(kg)	68 (42-100)	66 (41-95)	64 (44-97)	69 (44-98)
Concomitant Medications				
No concomitant medications* for Crohn's disease	12 (19%)	11 (16%)	9 (14%)	5 (10%)
5 ASA compounds	30 (48%)	40 (59%)	42 (64%)	30 (59%)
Oral steroids	31 (49%)	31 (46%)	37 (56%)	32 (63%)
Azathioprine or 6-MP (±steroids)	2 (3%)	25 (37%)	17 (26%)	9 (18%)

*Eight of 248 patients had a CDAI score <220 at base-line. Five of these 8 patients were eligible (CDAI≥220) on the basis of their screening hematocrit, which was the value available at randomization, but had scores <220 when subsequently recalculated using the base-line hematocrit. The CDAI scores for the other 3 patients were incorrectly calculated at the time of randomization.

*5 ASAs, steroids, or immunosuppressants.

Clinical Responses, Remissions, and Mean CDAI Scores

The proportion of patients achieving a clinical response (i.e., at least a 70 point reduction in CDAI from base-line) was statistically significantly greater than placebo in all three natalizumab groups at weeks 4, 6, and 8 (Table 5 and Fig. 6), and this effect persisted

56

through week 12 in the two groups that received 2 infusions of natalizumab. Trends for improvement in clinical response rates were observed as early as 2 weeks after the first treatment, and the 3+3 mg/kg natalizumab group demonstrated a statistically significant difference from placebo at this time point. Results for the decrease from base-line in mean CDAI score (Table 6) agree with the response rate findings.

TABLE 5: RATES OF REMISSION AND CLINICAL RESPONSE IN THE ITT POPULATION

TIME POINT	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG NATALIZUMAB (N=51)
REMISSION (CDAI <150) NO. OF PATIENTS (%)				
Week 2	6(10)	10(15)	13(20)	6(12)
P value		0.328	0.127	0.745
Week 4	9(14)	21(31)	19(29)	15(29)
P value		0.02	0.027	0.028
Week 6 (prim. endpoint)	17(27)	20(29)	29(44)	16(31)
P value		0.757	0.030	0.533
Week 8	10(16)	19(28)	27(41)	22(43)
P value		0.107	<0.001	<0.001
Week 12	17(27)	19(28)	28(42)	21(41)
P value		0.992	0.042	0.091
RESPONSE (≥70 POINT DROP) NO. OF PATIENTS (%)				
Week 2	19(30)	31(46)	36(55)	22(43)
P value		0.081	0.004	0.136
Week 4	18(29)	32(47)	41(62)	27(53)
P value		0.029	<0.001	0.006
Week 6	24(38)	40(59)	47(71)	29(57)
P value		0.022	<0.001	0.039
Week 8	22 (35)	38 (56)	44 (67)	28 (55)
P value		0.018	<0.001	0.028
Week 12	27(43)	34(50)	40(61)	33(65)
P value		0.503	0.033	0.018

10 Bold highlights the statistically significant results when compared to placebo.

TABLE 6. DECREASE FROM BASE-LINE IN MEAN CDAI SCORE

TIME POINT	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG NATALIZUMAB (N=51)
MEAN DECREASE IN CDAI SCORE FROM BASE-LINE (SD)				
Week 2	39.3 (73.5)	63.5 (74.8)	80.0 (68.9)	60.5 (68.3)
P value vs. placebo		0.061	0.001	0.103
Week 4	37.3 (88.8)	79.9 (89.5)	100.7 (76.4)	84.2 (90.5)
P value vs. placebo		0.004	<0.001	0.003
Week 6	49.3 (97.8)	81.5 (86.1)	119.4 (79.1)	97.2 (94)
P value vs. placebo		0.042	<0.001	0.004
Week 8	49.7 (99.5)	82.4 (87.2)	117.8 (90.7)	106.9 (102.9)
P value vs. placebo		0.053	<0.001	0.001
Week 12	63.1 (103.9)	70.1 (91.7)	119.2 (111)	112.5 (96.4)
P value vs. placebo		0.729	0.001	0.008

Decrease from baseline is defined as (week 0-week n)
SD = standard deviation
Bold highlights the statistically significant results when compared to placebo.

Four weeks after the first treatment, and before patients received the second treatment, all three natalizumab groups had a statistically significantly higher rate of remission compared to patients in the placebo group (Table 5 and Fig. 7). However, at week 6, the prospectively defined primary endpoint, the proportion of patients in clinical remission, was statistically significantly higher only in the 3+3 mg/kg natalizumab group compared to placebo. At week 8, both groups that received two infusions of natalizumab (either 3 or 6 mg/kg) demonstrated statistically significantly higher remission rates compared to placebo. At week 12, the 3+3 mg/kg natalizumab group continued to demonstrate a statistically significant benefit over placebo for clinical remission, while the 6+6 mg/kg group demonstrated a strong trend for benefit over placebo for this outcome.

Predictors of Remission or Response

Using the results at week 6, an analysis was performed to identify base-line variables that may predict remission or clinical response. The variables examined included site of disease, duration of disease, base-line CDAI scores, concomitant use of oral steroids, concomitant use of azathioprine or 6-mercaptopurine, and extraintestinal symptoms. Base-

58

line CDAI score was a significant predictor of remission ($P<0.001$); patients with a higher base-line CDAI were less likely to achieve remission. However, base-line CDAI did not predict the likelihood of response. All other variables analyzed were not significant predictors of remission or response.

5

Quality of Life

A statistically significant improvement in mean IBDQ scores was observed in all natalizumab treatment groups at week 6 compared to placebo. By week 12, only the treatment groups that received two infusions of natalizumab continued to have IBDQ scores

10

TABLE 7: MEAN IBDQ SCORES

TIME POINT	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG NATALIZUMAB (N=51)
IBDQ SCORE, MEAN (RANGE)				
Week 0	130 (66-192)	130 (52-188)	136 (79-194)	123 (55-194)
Week 6	142 (61-219)	157 (81-221)	163 (99-211)	155 (67-224)
P value		0.008	<0.001	<0.001
Week 12	145 (61-217)	151 (81-221)	163 (86-221)	153 (64-215)
P value		0.486	0.021	0.014

Bold highlights improvements in the IBDQ score when compared to each treatment base-line.

15

C-reactive Protein

Patients who had elevated levels of serum C-reactive protein at base-line received periodic assessments of those levels during the trial. Those who received two infusions of natalizumab exhibited a significant decline from base-line in mean serum levels of C-reactive protein compared to patients in the placebo group (Fig. 8). The improvement was maintained through week 12 in patients who received two infusions of 3 mg/kg natalizumab.

20

25

59

Safety and Tolerability

Natalizumab treatment at all dose levels was well tolerated throughout the 12-week study period. Similar numbers of patients from each group withdrew from the study for adverse events (*i.e.*, 2 in the placebo group, 1 in the 3 mg/kg natalizumab group, 2 in the 3+3 mg/kg natalizumab group, and 3 in the 6+6 mg/kg natalizumab group). Overall, 31 patients reported a serious adverse event during the main study phase (*i.e.*, 9 in the placebo group, 8 in the 3 mg/kg natalizumab group, 8 in the 3+3 mg/kg natalizumab group, and 6 in the 6+6 mg/kg natalizumab group). No serious adverse events were assessed as related to study drug and none were fatal; the majority were hospital admissions for complications or symptoms associated with CD. The numbers of patients experiencing treatment-emergent adverse events were similar in the various treatment groups: 52 (83 percent) in the placebo group, 51 (78 percent) in the 3 mg/kg natalizumab group, 57 (88 percent) in the 3+3 mg/kg natalizumab group, and 41 (80 percent) in the 6+6 mg/kg natalizumab group. Table 8 shows adverse events not related to CD with an incidence at least 5 percent greater in a natalizumab group compared to the placebo group. None of these various types of adverse events were statistically significantly different from placebo, and none are deemed to present an unacceptable safety profile for the use of natalizumab in patients with moderate to severe CD.

TABLE 8: ADVERSE EVENTS NOT RELATED TO CROHN'S DISEASE WITH >5% INCIDENCE OVER PLACEBO AND OTHER EVENTS OF INTEREST

PREFERRED TERM	PLACEBO N=63(%)	3+0 N=65	3+3 N=65	6+6 N=51
Chest pain	0 (0)	2 (3)	2 (3)	4 (8)
Conjunctivitis	0 (0)	2 (3)	5 (8)	0 (0)
Dizziness	0 (0)	6 (9)	3 (5)	0 (0)
Fever	1 (2)	4 (6)	3 (5)	4 (8)
Flu syndrome	6 (10)	9 (14)	7 (11)	10 (20)
Headache	20 (32)	19 (29)	27 (42)	14 (27)
Pain	4 (6)	4 (6)	4 (6)	11 (22)
Sinusitis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
OTHER EVENTS:				
Infusion reaction*	0 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (2)
Pts with anti-natalizumab antibodies	0 (0)	8 (13)	4 (6)	1 (2)

***Leading to interruption or cessation of infusion.**

Anti-natalizumab antibodies were detected in 13 natalizumab-treated patients (7 percent) at week 12. Overall, patients with detectable anti-natalizumab antibodies were no more likely to experience an adverse event or serious adverse event than those who had no detectable anti-natalizumab antibodies.

Two patients experienced infusion reactions; in both, the event occurred during the second infusion. A patient in the 3+3 mg/kg natalizumab group experienced symptoms of mild itching and erythema, and was subsequently found to be positive for anti-natalizumab antibodies. A patient in the 6+6 mg/kg natalizumab group experienced symptoms of mild itching and coughing. These symptoms resolved without treatment, and the patient was subsequently found to be negative for detectable anti-natalizumab antibodies.

Although the prospectively defined primary efficacy endpoint (clinical remission defined as CDAI < 150 at week 6) was statistically significantly superior to placebo only for the 3+3 mg/kg natalizumab group, significant benefit over placebo was observed for this outcome at 4 separate time points for the 3+3 mg/kg group (weeks 4, 6, 8, and 12) and two time points for the 6+6 mg/kg group (weeks 4 and 8, with a trend for benefit at week 12). Combined with the findings that the proportions of patients experiencing a clinical response (defined as at least a 70 point drop in CDAI from base-line) were significantly superior to placebo for all three natalizumab groups at the week 4, 6, and 8 time points, and at the week 12 time point for the two treatment groups that received two infusions of natalizumab, these data provide strong evidence for efficacy of natalizumab in the treatment of moderate to severely active CD. Further, the beneficial effects of natalizumab on clinical response and remission rates based on improvements in the CDAI are corroborated by significant improvements in health related QOL, measured by the IBDQ, and improvement in serum C-reactive protein, an acute phase reactant used to quantify generalized inflammation.

The dosage levels of receptor saturation in the CD trial are comparable to the dosages of the MS trial, and thus receptor saturation levels should be comparable in the CD trial. Receptor saturation levels in the CD trial are thus associated with decreased levels of inflammation, as demonstrated by C-reactive protein levels and an improvement in overall patient well-being, as demonstrated by the CDAI.

No serious safety concerns were identified for any of the natalizumab treatment groups. The percentage of patients developing detectable anti-natalizumab antibodies was

61

low, and there were no serious adverse events associated with detectable anti-natalizumab antibodies.

The present study provides compelling evidence for the effectiveness and tolerability of alpha-4 integrin antagonism by natalizumab in the treatment of the clinical signs and symptoms of active moderate to severe CD. In addition, the evidence these data provide that alpha-4 integrin antagonism is an effective mechanism for treating CD raises the possibility that this modality may be more broadly applicable to the treatment of chronic autoimmune and inflammatory diseases.

EXAMPLE 3

THE EFFECT OF NATALIZUMAB ON CIRCULATING ACTIVATED LEUCOCYTES IN ACTIVE INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

The trafficking of leukocyte subsets is involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). Because alpha-4 integrins are key mediators of leukocyte migration across the vascular endothelium, being that they are expressed on all leucocytes except neutrophils, the effects of a single 3 mg/kg natalizumab (Antegren®) infusion on basic circulating leukocyte subsets, natural killer (NK) cells and activated T cells in active inflammatory bowel disease patients (IBD). It had also previously been shown that a single 3 mg/kg infusion of natalizumab produced a sustained rise in circulating peripheral blood leucocytes in animals and healthy volunteers ("A six-month weekly intravenous toxicity study with Antegren™ in cynomolgous monkeys with a six-week recovery," *Athena Report* 1998, No. 723-013-098). However, it was unknown whether natalizumab could have differential effects on leukocyte subsets, given that all leucocytes except neutrophils express alpha-4 integrins.

Methods. Leucocytes extracted from peripheral blood of 30 Crohn's disease (CD; 18 natalizumab, 12 placebo) and 10 ulcerative colitis (UC; all received natalizumab – no placebo) patients pre-, 1-, 2-, 4-, 8- and 12- weeks post-infusion were analyzed by fluorescence-activated cell-sorter (FACS). Serum natalizumab levels and disease activity scores were measured at each time-point.

Significant changes compared to baseline ($p < 0.05$) and correlations were tested by Wilcoxon and Spearman tests respectively. Wilcoxon signed rank test for analysis of changes in leukocyte subsets were compared to baseline within treatment groups ($p < 0.05$

62

denotes significance). Spearman rank correlation tests were used to assess correlation between disease activity parameters, natalizumab levels and leukocyte subsets in those patients receiving natalizumab.

Venous blood was taken immediately prior to natalizumab/placebo infusion and again at one, two, four, eight and twelve weeks post-infusion. The Lymphoprep™ method (Nycomed, Denmark) was used to isolate the peripheral blood lymphocytes (PBLs) prior to analysis by multi-color fluorescence-activated cell sorter (FACS; Becton Dickinson, Oxford, UK) in conjunction with Consort 30 software (Amlot *et al.*, 1996 *Clin. Exp. Immunol.* 105: 176-82). The percentages of PBLs expressing the following markers were measured using FACS analysis: CD19 (B cell), TCRαβ (T cell), CD3 (pan-T cell), TCRγδ (T cell), CD4 (helper/Th-1 T cell), CD8 (cytotoxic/suppressor T cell) and CD16 (NK cell).

The percentages of TCRαβ cells expressing the activation antigens CD38, CD25 (α chain of interleukin-2 receptor), CD26, CD69 and HLA-DR were measured, in addition to naïve (CD45RA) and memory (CD45RO) T cell subsets and "NK-T cells" (CD57⁺/CD3⁺).

The percentage of cytotoxic/suppressor T cells (CD8⁺) expressing the activation antigens CD28 and HLA-DR were also measured.

Results. Eosinophil, monocyte, B and T cell counts were all significantly raised for ≥1 week post-natalizumab. Total lymphocyte counts, both B and T cells, were significantly increased as compared to baseline levels. Neutrophil and basophil counts were unchanged. T cells expressing the activation markers CD25, CD26, HLA-DR, CD8DR, CD8, CD28, CD45RO and CD45RA were significantly raised compared to baseline at ≥4 and 1 week in UC and CD patients respectively. CD38⁺ and CD69⁺ T cells were raised at ≥1 week in UC patients only. NK cells were unchanged post-infusion in all patients and NK-type T cells (CD57⁺) were raised at 1 week in CD patients only. No significant changes in gamma-delta (γδ) T cells were found in CD/UC patients. Changes in T cell subsets did not correlate with disease activity or serum natalizumab levels. The leukocyte changes found post-natalizumab were not detected following placebo.

The lymphocyte counts remained elevated at 4 weeks post-infusion in both Crohn's disease patients (p=0.002) and in those patients with ulcerative colitis (p=0.02), before returning to pre-treatment values at week 8 (Gordon *et al.*, 2002 *Aliment. Pharm. & Ther.* 16: 699-706; and Gordon *et al.*, 2001 *Gastroenterology* 121: 268-74).

The effect of natalizumab on circulating eosinophils and monocytes are shown in Figs. 9A and 9B. The neutrophil and basophil counts were observed to remain unchanged in

all the patient groups studied. Figs. 10 and 11 demonstrate the effects of natalizumab administration on specific circulating T cell subsets and natural killer cells in Crohn's disease and ulcerative colitis patients. The error bars denote standards of deviation in each chart.

No significant changes in basic leukocyte subsets were detected following placebo infusion. Administration of the placebo to the 11 placebo patients is shown in Table 9. Some changes in lymphocytes expressing activation antigens were detected at isolated time points only in Crohn's patients (Table 10).

Table 9: LEUKOCYTE SUBSETS IN PLACEBO-TREATED CROHN'S DISEASE PATIENTS

Subset Cells $\times 10^6/\text{mL}$	Week 0		Week 1		Week 2		Week 4		Week 8	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Lymphocytes	.60	.33	.55	.36	.82	.67	.48	.29	.51	.31
Neutrophils	.21	.75	.18	.48	.86	.36	.61	.26	.91	.15
Eosinophils	.19	.16	.17	.13	.15	.13	.20	.12	.14	.10
Basophils	.19	.30	.14	.09	.09	.07	.09	.03	.08	.05
Monocytes	.60	.33	.55	.36	.82	.67	.48	.29	.51	.31

Table 9 Mean (SD) leukocyte subset values post-placebo; no significant differences in any group compared to baseline (week 0) values.

61

Table 10: T CELL AND NK MARKERS IN PLACEBO-TREATED CROHN'S DISEASE PATIENTS

Subset Cells x10 ⁶ /mL	Week 0		Week 1		Week 2		Week 4		Week 8		Week 12	
	Mean	<i>SD</i>	Mean	<i>SD</i>	Mean	<i>SD</i>	Mean	<i>SD</i>	Mean	<i>SD</i>	Mean	<i>SD</i>
Lymphocytes	.36	<i>.57</i>	.12	<i>.57</i>	.83	<i>.08</i>	.34	<i>.98</i>	.28	<i>.74</i>	.62	<i>.84</i>
TCRαβ+	.99	<i>.33</i>	.81	<i>.56</i>	.28	<i>.88</i>	.98	<i>.84</i>	.95	<i>.79</i>	.17	<i>.81</i>
CD25+	.18	<i>.11</i>	.12	<i>.07</i>	.27	<i>.22</i>	.17	<i>.17</i>	.18	<i>.15</i>	.22	<i>.17</i>
CD16+	.49	<i>.32</i>	.38	<i>.27</i>	.80	<i>.61</i>	.54	<i>.49</i>	.54	<i>.55</i>	.58	<i>.43</i>
CD45RA+	.74	<i>.41</i>	.57	<i>.39</i>	.95	<i>.69</i>	.68	<i>.59</i>	.68	<i>.57</i>	.84	<i>.56</i>
CD45RO+	.42	<i>.20</i>	.31	<i>.18</i>	.50	<i>.27</i>	.39	<i>.24</i>	.42	<i>.35</i>	.50	<i>.33</i>
CD38+	.42	<i>.29</i>	.31	<i>.23</i>	.46	<i>.38</i>	.35	<i>.27</i>	.33	<i>.25</i>	.40	<i>.25</i>
CD69+	.14	<i>.20</i>	.67	<i>.71</i>	.13	<i>.12</i>	.05	<i>.04</i>	.12	<i>.22</i>	.10	<i>.08</i>
HLA-DR+	.19	<i>.10</i>	.15	<i>.08</i>	.25	<i>.20</i>	.16	<i>.11</i>	.17	<i>.10</i>	.22	<i>.16</i>
CD8+	.11	<i>.09</i>	.09	<i>.06</i>	.16	<i>.15</i>	.09	<i>.07</i>	.08	<i>.05</i>	.12	<i>.11</i>
CD8+CD28+	.21	<i>.11</i>	.16	<i>.11</i>	.30	<i>.20</i>	.22	<i>.21</i>	.20	<i>.18</i>	.23	<i>.14</i>
CD8+DR+	.11	<i>.09</i>	.09	<i>.06</i>	.16	<i>.15</i>	.09	<i>.07</i>	.08	<i>.05</i>	.12	<i>.11</i>
CD57+CD3+	.08	<i>.06</i>	.06	<i>.05</i>	.10	<i>.10</i>	.07	<i>.04</i>	.07	<i>.05</i>	.10	<i>.15</i>
CD16+CD3-	.11	<i>.09</i>	.12	<i>.09</i>	.16	<i>.18</i>	.09	<i>.04</i>	.12	<i>.12</i>	.17	<i>.19</i>
TCRγδ+	.11	<i>.16</i>	.08	<i>.09</i>	.18	<i>.28</i>	.10	<i>.13</i>	.09	<i>.09</i>	.11	<i>.10</i>
KappaMAb+	.02	<i>.02</i>	.03	<i>.05</i>	.05	<i>.08</i>	.07	<i>.09</i>	.03	<i>.04</i>	.10	<i>.01</i>

Table 10 Columns show mean counts (*SD*) of T cell subsets and NK-type cells of Crohn's study placebo patients compared with baseline values (Wilcoxon signed rank test; *p*<0.05). Significant differences compared to baseline are shown in bold. Standard deviations for each mean are shown in italic numbers.

There was no significant correlation between the total lymphocyte counts and disease activity score in either Crohn's disease or ulcerative colitis patients (Tables 11 and 12), nor were any significant correlations found between individual lymphocyte subsets and disease activity. No significant correlation was detected between serum natalizumab levels and changes in leukocyte subsets at one, two or four weeks post-infusion. Natalizumab was undetectable in almost all patients at eight weeks. Thus correlations were not calculated for this time point.

65

Table 11: SPEARMAN R VALUES COMPARING LYMPHOCYTE SUBSETS AND DISEASE ACTIVITY

Subjects	Crohn's disease			Ulcerative colitis		
	Week 1	Week 2	Week 4	Week 1	Week 2	Week 4
Lymphocytes	0.16	-0.37	-0.01	-0.63	-0.19	0.03
TCRαβ	0.26	-0.29	0.05	-0.59	-0.39	0
CD25	0.44	0.07	0.13	-0.39	-0.46	0.17
CD26	0.31	-0.22	-0.11	-0.39	-0.29	0.10
CD45RA	0.29	-0.25	0.19	-0.54	-0.39	0.51
CD45RO	0.32	-0.27	0.34	0.18	-0.17	-0.05
CD38	0.31	-0.08	0.01	-0.57	0.03	-0.05
CD69	-0.32	0.12	0.12	-0.15	0.28	0.12
HLA-DR	0.19	-0.05	-0.01	0.12	-0.13	0.15
CD8CD28	0.01	-0.17	-0.13	-0.18	-0.04	-0.17
CD8DR	0.11	-0.19	-0.18	-0.1	0.07	0.24
CD57	0.19	-0.08	-0.04	0.21	-0.15	0.15
CD16	-0.08	-0.3	-0.15	-0.19	0.1	-0.32
TCRγδ	0.34	0.14	-0.31	-0.63	-0.47	-0.66
Kappa Mab	-0.11	-0.02	-0.2	0.05	-0.27	0.19

Table 11 No significant correlation found between lymphocyte subset counts and CDAI (Crohn's disease patients) or Powell-Tuck score (ulcerative colitis).

Table 12: SPEARMAN R VALUES COMPARING LYMPHOCYTE SUBSETS WITH SERUM NATALIZUMAB

Subjects	Crohn's disease			Ulcerative colitis		
	Week 1	Week 2	Week 4	Week 1	Week 2	Week 4
Lymphocytes	0.03	0.49	0.64	0.1	-0.02	0.18
TCRαβ	-0.11	0.35	0.51	-0.04	0.28	-0.11
CD25	-0.09	0.03	0.26	0.25	-0.07	-0.25
CD26	-0.07	0.28	0.61	0.20	0.22	-0.14
CD45RA	0.19	0.29	0.62	-0.12	-0.25	-0.32
CD45RO	-0.16	0.32	0.34	0.37	0.08	0.39
CD38	0.06	0.18	-0.34	-0.01	-0.45	-0.43
CD69	0.02	0.26	0.57	0.2	-0.22	0.14
HLA-DR	0.05	0.13	-0.25	0.08	0.27	-0.07
CD8CD28	-0.18	0.16	0.41	0.25	0.07	0.32
CD8DR	0.4	0.16	0.004	0.08	0.3	-0.18
CD57	0.1	-0.06	-0.31	-0.08	0.03	0
CD16	0.22	0.19	-0.5	0.13	0.37	0.25
TCRγδ	0.002	-0.16	-0.2	0.21	0.61	0.6
Kappa MAb	-0.07	-0.27	0.29	0.41	0.45	-0.41

Table 12 No significant correlation between disease activity and lymphocyte subsets, except for total lymphocyte counts at week 4 (p=0.04).

Based on the above data, a single 3 mg/kg natalizumab infusion produced increased circulating levels of most, but not all, leukocyte subsets in patients with active IBD. Circulating eosinophil, monocyte and lymphocyte counts were significantly elevated above

66

baseline values for at least four weeks post-infusion in most patients. A wide range of circulating T cell subsets were significantly increased above pretreatment values, particularly those expressing activation antigens. However, NK cell counts (CD16⁺/CD3⁺) were not affected by natalizumab, and CD57⁺ T cells were affected to a much lesser extent by natalizumab than other T cell subsets. Lymphocytes expressing the $\gamma\delta$ T cell receptor were also not affected by natalizumab, suggesting that alpha-4 integrins are either not expressed, or are expressed at a lower level on these cells.

Thus, in active IBD patients, natalizumab may limit trafficking and maintain in circulation many leukocyte and activated lymphocyte subsets. The NK cells, $\gamma\delta$ cells, neutrophils and basophils appear unaffected by the administration of natalizumab, which may suggest that they are less important mediators in the trafficking of these cell types.

While the present invention has been described with reference to the specific embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the invention.

U.S. Provisional Application Nos. 60/360,134 and 60/374,501 filed respectively on 25 February 2002 and 23 April 2002 are incorporated by reference herein in their entirety for all purposes. All references cited herein are herein incorporated by reference in their entirety for all purposes.

67

We claim:

- 1. A method of chronically reducing pathological inflammation in a patient in need thereof comprising chronically administering an agent to the patient that inhibits alpha-4 integrin or inhibits a dimer comprising alpha-4 integrin in a therapeutically effective amount.**
- 2. The method of claim 1, wherein the chronic administration is for a period of at least 6 months.**
- 3. The method of claim 2, wherein the chronic administration is for a period of at least 12 months.**
- 4. The method of claim 1, wherein the agent is administered repeatedly in a manner to bind to alpha-4 integrin or a dimer comprising alpha-4 integrin, and wherein the administration maintains alpha-4 integrin receptor saturation at a level sufficient to chronically suppress pathological inflammation in the patient.**
- 5. The method of claim 4, wherein the agent is administered repeatedly to the patient such that alpha-4 integrin receptor saturation is about at least 65% to about 100% in the patient.**
- 6. The method of claim 5, wherein the saturation is at least 75%.**
- 7. The method of claim 5, wherein the saturation is at least 80%.**
- 8. The method of any of claims 1 or 4, wherein the agent binds to alpha-4 integrin dimers.**
- 9. The method of any of claims 1 or 4, wherein the agent is a monoclonal antibody or an immunologically active fragment thereof.**
- 10. The method of claim 9, wherein the monoclonal antibody is natalizumab.**

62

11. The method of claim 1, wherein the alpha-4 integrin dimer is alpha-4 beta-1.
12. The method of claim 4, wherein the agent is administered in amount sufficient to saturate at least one alpha-4 integrin dimer receptor thereby inhibiting pathological inflammation.
13. The method of claim 12, wherein the dimer receptors are alpha-4 beta-1 or alpha-4 beta-7, and the pathological inflammation is caused by multiple sclerosis.
14. The method of claim 12, wherein the dimers receptors are alpha-4 beta-1 or alpha-4 beta-7, and the pathological inflammation is caused by an inflammatory disease of the gastrointestinal tract.
15. The method of claim 14, wherein the inflammatory disease of the gastrointestinal tract is Crohn's Disease, ulcerative colitis or inflammatory bowel disease.
16. The method of any of claims 1-11, wherein the pathological inflammation is caused by an inflammatory disease of the gastrointestinal tract.
17. The method of claim 16, wherein the inflammatory disease of the gastrointestinal tract is Crohn's disease, ulcerative colitis, or inflammatory bowel disease.
18. The method of any of claims 1-11, wherein the pathological inflammation is caused by multiple sclerosis.
19. A method of determining the efficacy of a chronic administration regime for treating pathological inflammation in a subject, wherein the pathological inflammation is modulated by an alpha-4 integrin comprising measuring saturation of the alpha-4 integrin or a dimer comprising alpha-4 integrin.

67
69

20. The method of claim 19, wherein the alpha-4 integrin dimer is alpha-4 beta-1 or alpha-4 beta-7.

21. The method of claim 19, wherein the pathological inflammation is caused by Crohn's Disease, and measurement of the C-reactive protein and/or CDAI in the patient measures saturation of alpha-4 integrin.

22. The method of claim 19, wherein the pathological inflammation is caused by multiple sclerosis.

23. The method of claim 1, wherein the pathological inflammation is an inflammatory disease of the gastrointestinal tract and comprises chronically administering a therapeutically effective dose of natalizumab or an immunologically active fragment thereof to a patient in need thereof sufficient to treat or ameliorate the inflammatory disease of the gastrointestinal tract in the patient.

24. The method of claim 23, wherein the disease of the gastrointestinal tract is inflammatory bowel disease, Crohn's disease or ulcerative colitis.

25. The method of any of claims 23 or 24, wherein natalizumab is administered by infusion every four weeks for at least 6 months in an amount of about 1 mg/kg patient to about 20 mg/kg patient.

26. The method of claim 25, wherein the infusions are administered for at least 12 months.

27. The method of claim 1, wherein the pathological inflammation is multiple sclerosis and comprises chronically administering a therapeutically effective dose of natalizumab or an immunologically active fragment thereof, to a patient in need thereof sufficient to relieve symptoms of multiple sclerosis.

70

28. The method of claim 27, wherein natalizumab is administered by infusion every four weeks for at least 6 months in an amount of about 1 mg/kg patient to about 20 mg/kg patient.

29. The method of claim 28, wherein the infusions are administered for at least 12 months.

30. A composition for chronic treatment of pathological inflammation in a patient comprising an agent in an amount sufficient to relieve symptoms of the pathological inflammation in the patient in need thereof.

31. The composition of claim 30, wherein the agent inhibits alpha-4 integrin activity and/or alpha-4 integrin dimer activity.

32. The composition of any of claims 30 or 31, wherein the composition further comprises a stabilizer, a carrier and/or an excipient.

33. The composition of any of claims 30 or 31, wherein the agent is natalizumab.

34. The composition of claim 33, wherein natalizumab is formulated for intravenous infusion in the amount of about 1 mg/kg patient to about 20 mg/kg patient for administration every 4 weeks for at least 6 months.

35. The composition of claim 33, wherein the pathological inflammation is caused by multiple sclerosis.

36. The composition of claim 33, wherein the pathological inflammation is caused by an inflammatory disease of the gastrointestinal tract.

37. The composition of claim 36, wherein the inflammatory disease of the gastrointestinal tract is Crohn's disease, ulcerative colitis or inflammatory bowel disease.

38. A combination therapy for the chronic treatment of pathological inflammation in a patient, wherein the combination therapy comprises a composition of any of claims 30-33 and a compound that ameliorates the pathological inflammation.

39. The combination therapy of claim 38, wherein the pathological inflammation is caused by an inflammatory disease of the gastrointestinal tract.

40. The combination therapy of claim 39, wherein the inflammatory disease of the gastrointestinal tract is ulcerative colitis, inflammatory bowel disease or Crohn's disease, and the compound is a 5-aminosalicylate, a glucocorticoid, a thioguanine derivative, methotrexate, a cyclosporine, a monoclonal antibody that binds to TNF, or an antibiotic.

41. The combination therapy of claim 38, wherein the pathological inflammation is caused by multiple sclerosis.

42. A use of an alpha-4 integrin inhibitor for preparation of a medicament for the chronic treatment of a pathological inflammation in a patient in need thereof.

43. The use of an alpha-4 integrin inhibitor of claim 42, wherein the pathological condition is caused by multiple sclerosis.

44. The use of an alpha-4 integrin inhibitor of claim 42, wherein the pathological condition is caused by an inflammatory disease of the gastrointestinal tract.

45. The use of an alpha-4 integrin inhibitor of claim 44, wherein the alpha-4 integrin inhibitor is natalizumab, and the inflammatory disease of the gastrointestinal tract is Crohn's disease, inflammatory bowel disease or ulcerative colitis.

46. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 42, wherein the medicament is formulated such that alpha-4 integrin receptors are saturated at level sufficient to suppress pathological inflammation when the medicament is administered to the patient.

47. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 46, wherein the medicament when administered to a patient provides alpha-4 integrin receptor saturation of about at least 65% to about 100%.

48. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 47, wherein the saturation is at least 75%.

49. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 47, wherein the saturation is at least 80%.

50. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of any of claims 42-47, wherein the inhibitor binds to alpha-4 integrin dimers.

51. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of any of claims 42-47, wherein the inhibitor is a monoclonal antibody.

52. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 51, wherein the monoclonal antibody is natalizumab or an immunologically active fragment thereof.

53. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 50, wherein the inhibitor binds to alpha-4 beta-1.

54. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 42, wherein the agent is administered in an amount sufficient to saturate one or more dimer receptors thereby inhibiting pathological inflammation.

55. The use of the alpha-4 integrin inhibitor of claim 44, wherein the medicament further comprises a compound which ameliorates an inflammatory disease of the gastrointestinal tract.

56. The use of the the alpha-4 integrin inhibitor of claim 55, wherein the compound is 5-aminosalicylate, a glucocorticoid, a thioguanine derivative, methotrexate, a

cyclosporine, a monoclonal antibody that binds TNF, an antibiotic, an analgesic, an antidiarrheal, or an anticholinergic.

57. The use of an alpha-4 integrin inhibitor of any of claims 42-56, wherein the inhibitor is natalizumab and is formulated in an amount of about 1 mg/kg patient to about 20 mg/kg patient for intravenous infusion to the patient in need thereof every 4 weeks for at least 6 months.

58. The use of an alpha-4 integrin inhibitor of claim 57, wherein the inhibitor is formulated for intravenous infusion to the patient for at least 12 months.

1/19

Cumulative mean number of new gd-enhancing lesions

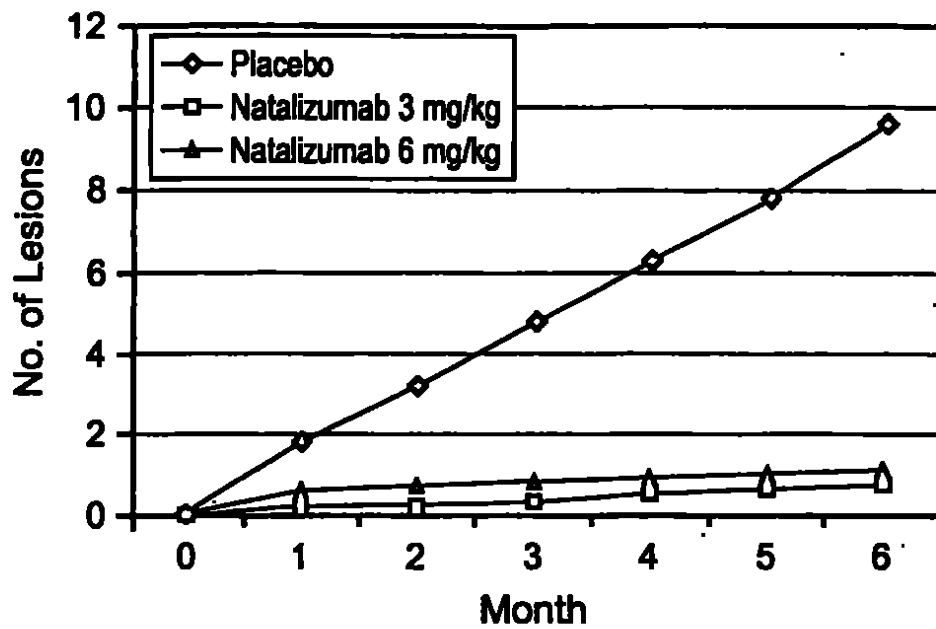


FIG. 1

Proportion of MRI scans with new enhancing lesions

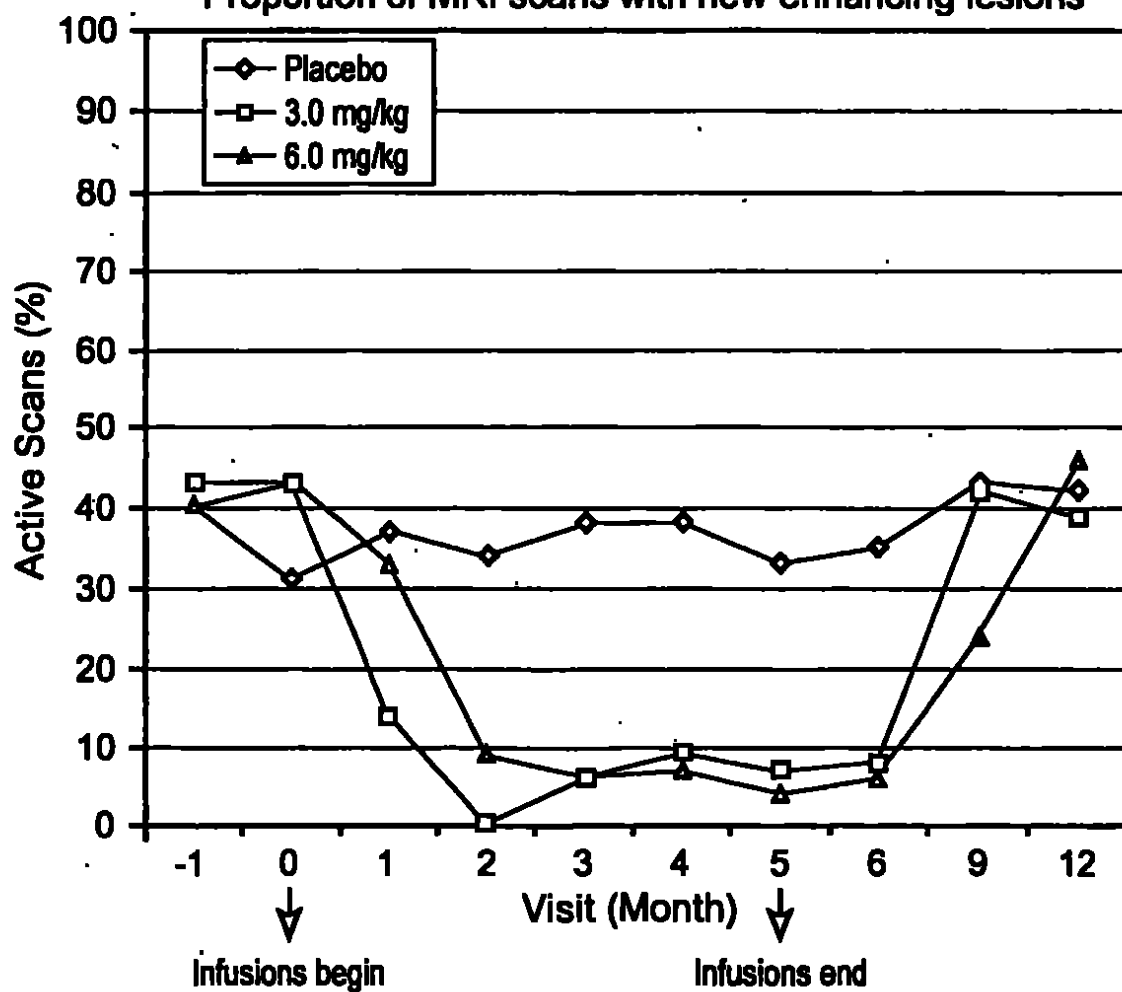


FIG. 2

75

Summary of Serum Natulizimab Concentrations for 3 0 mg/kg Natulizimab

Patient	Month 0				Week 1	Week 2	Week 3	Month 1
	Pre-Infusion	60 min	2 hrs	24 hrs				
01	<0.13	65.0	74.7 µg/ml	43.4 µg/ml	11.6 µg/ml	4.6 µg/ml	4.9 µg/ml	2.3 µg/ml
02	<0.13	56.1	72.2	39.2	17.7	11.2	ND	3.6
03	<0.13	58.5	60.0	34.4	10.6	5.8	3.6	1.3
04	<0.13	77.9	97.3	54.1	16.2	7.2	2.3	0.2
05	<0.13	75.6	67.5	42.0	17.3	10.7	8.0	5.4
06	<0.13	72.0	73.7	ND	10.7	4.0	1.5	1.6
07	<0.13	16.9	30.7	23.7	13.0	ND	ND	3.5
08	<0.13	54.3	58.4	49.0	15.7	9.9	6.7	4.0
09	<0.13	82.7	74.2	62.6	18.6	ND	3.5	2.2
10	<0.13	84.3	84.1	64.2	22.7	10.7	7.3	3.9
11	<0.25	62.5	72.6	42.0	14.3	6.8	4.1	2.2
12	<0.25	102.7	80.6	82.1	25.5	13.7	5.8	3.5
13	<0.13	76.0	67.8	44.3	13.7	8.6	5.3	2.7
14	<0.13	66.4	70.2	36.5	11.0	6.3	3.9	2.0

	Month 0				Week 1	Week 2	Week 3	Month 1
	Pre-Infusion	60 min	2 hrs	24 hrs				
N	14	14	14	13	14	12	12	14
Mean	0.0	67.9	70.3	47.5	15.6	8.3	4.7	2.7
SD	0.00	19.60	14.96	15.18	4.50	2.88	1.97	1.33

2/19

FIG 3A

35

Summary of Serum Natulizumab Concentrations for 3 0 mg/kg Natulizumab

				Month 5			
Patient	Month 2	Month 3	Month 4	Pre-infusion	60 min	2 hrs	24 hrs
01	2 4 µg/ml	1 4 µg/ml	1 9 µg/ml	ND	ND	ND	ND
02	7 1	8 0	11 1	7 8	65 1	82 3	50 5
03	2 3	2 9	2 7	1 2	53 9	54 7	40 8
04	<0 13	<0 13	<0 13	<0 13	24 6	21 4	2 5
05	8 1	11 4	1 8	0 2	ND	ND	ND
06	1 4	1 8	1 9	2 0	81 9	90 3	51 9
07	1 7	2 5	2 2	2 6	36 0	62 7	22 2
08	4 5	5 7	2 0	4 7	76 0	65 0	ND
09	3 4	3 9	3 3	3 3	59 7	64 8	48 5
10	2 9	3 3	6 1	4 5	82 0	79 6	59 9
11	2 7	4 6	5 5	3 0	82 6	79 3	55 6
12	2 0	1 9	1 9	3 6	68 8	ND	65 2
13	4 3	4 3	3 6	5 0	74 9	55 4	47 0
14	2 1	1 6	1 9	3 0	70 3	63 0	35 5
				Month 5			
SRN							
	Month 2	Month 3	Month 4	Pre-infusion	60 min	2 hrs	24 hrs
N	14	14	14	13	12	11	11
Mean	3 2	3 8	3 3	3 1	64 7	65 3	43 6
SD	2 19	2 98	2 74	2 11	18 51	18 61	18 03

FIG 3B

77

Summary of Serum Natulizimab Concentrations for 3 0 mg/kg Natulizimab

Patient	Week 21	Week 22	Week 23	Month 6	Month 7	Month 8	Month 9	Month 10	Month 12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	33.8	21.4	10.3	8.1	0.4	<0.13	<0.13	ND	ND
03	21.3	9.4	4.7	5.1	<0.25	<0.13	<0.13	ND	ND
04	<0.13	<0.13	<0.13	<0.13	<0.25	<0.13	<0.13	ND	ND
05	ND	ND	ND	0.2	<0.25	<0.13	<0.13	ND	ND
06	21.5	7.6	3.9	2.4	<0.13	<0.13	<0.13	ND	ND
07	ND	11.0	6.2	3.7	0.3	<0.13	ND	ND	ND
08	19.1	13.2	9.6	5.3	0.4	<0.13	<0.13	<0.13	ND
09	33.7	13.1	6.1	3.8	<0.13	ND	ND	ND	ND
10	29.9	16.8	ND	7.4	0.5	ND	ND	ND	ND
11	ND	18.4	10.5	6.6	0.7	<0.13	ND	ND	ND
12	ND	9.9	6.3	3.5	<0.13	<0.13	ND	ND	ND
13	22.1	13.3	9.1	4.6	<0.13	<0.13	ND	ND	ND
14	14.1	8.2	9.4	4.7	<0.13	ND	ND	ND	ND
SRN	Week 21	Week 22	Week 23	Month 6	Month 7	Month 8	Month 9	Month 10	Month 12
N	9	12	11	13	13	10	6	1	0
Mean	21.7	11.9	6.9	4.3	0.2	0.0	0.0	0.0	
SD	10.57	5.61	3.25	2.44	0.25	0.00	0.00		

4/19

FIG 3C

77

Summary of Serum Natulizumab Concentrations for 6.0 mg/kg Natulizumab

Month 0								
Patient	Pre-infusion	60 min	2 hrs	24 hrs	Week 1	Week 2	Week 3	Month 1
01	<0.25	104.8	155.3	110.0	36.3	16.8	11.4	11.0
02	<0.13	102.8	135.0	81.8	37.5	18.7	11.0	3.9
03	<0.13	121.1	96.3	68.4	22.9	19.9	11.4	6.6
04	<0.13	136.0	141.2	86.6	26.0	20.9	13.7	9.8
05	<0.13	163.8	138.6	84.4	29.4	17.5	14.0	9.6
06	<0.13	145.7	173.7	94.8	29.3	16.5	14.0	9.7
07	<0.25	173.5	164.0	110.0	33.9	ND	ND	ND
08	<0.13	135.8	143.0	105.8	20.9	17.6	15.0	10.9
09	<0.13	97.3	127.9	66.8	27.0	8.3	7.8	4.8
10	<0.13	149.2	111.2	103.2	37.0	21.4	11.9	4.8
11	<0.25	111.6	142.5	88.9	20.8	20.7	9.7	8.6
12	<0.13	147.6	135.0	95.5	43.9	28.0	19.4	9.9
13	<0.25	183.9	168.6	113.2	52.0	31.7	20.9	12.1
14	<0.13	140.2	129.2	109.9	36.9	21.0	12.2	7.9
Month 0								
	Pre-infusion	60 min	2 hrs	24 hrs	Week 1	Week 2	Week 3	Month 1
N	14	14	14	14	14	13	13	13
Mean	0.0	136.7	140.1	94.2	32.4	19.9	13.3	8.4
SD	0.00	26.72	21.18	15.38	8.97	5.61	3.63	2.64

5/19

FIG 4A

78

Summary of Serum Natulizimab Concentrations for 6.0 mg/kg Natulizimab

Patient	Month 2	Month 3	Month 4	Month 5			
				Pre-infusion	60 min	2 hrs	24 hrs
01	10.7 µg/ml	ND µg/ml	2.4 µg/ml	ND	ND	ND	ND
02	6.8	8.2	9.6	10.3	ND	ND	ND
03	8.6	9.9	10.5	7.8	92.6	97.5	85.9
04	11.8	16.4	17.1	15.8	200.1	161.1	135.6
05	9.3	11.6	16.9	19.5	190.4	168.3	104.4
06	11.7	14.5	16.8	18.2	171.3	153.0	112.7
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	14.6	12.9	14.2	18.4	145.2	172.5	99.2
09	8.5	8.4	12.0	ND	103.0	107.5	44.9
10	9.0	16.3	18.1	10.9	114.3	141.4	103.0
11	11.8	14.2	13.3	14.5	135.7	109.4	93.8
12	11.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	1.6	<0.13	1.9	7.5	187.0	141.8	124.6
14	11.2	12.6	12.8	11.8	152.4	124.0	114.6

SRN	Month 5						
	Month 2	Month 3	Month 4	Pre-Infusion	60 min	2 hrs	24 hrs
N	13	11	12	10	10	10	10
Mean	9.8	11.4	12.1	13.5	149.2	137.7	101.9
SD	3.18	4.71	5.39	4.43	37.96	26.82	24.75

FIG 4B

6/19

Handwritten signature

Summary of Serum Natulizimab Concentrations for 6 0 mg/kg Natulizimab

Patient	Week 21	Week 22	Week 23	Month 6	Month 7	Month 8	Month 9	Month 10	Month 12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
03	43 2	17 2	15 5	10 1	1 3	<0 13	<0 13	ND	ND
04	59 1	38 6	25 1	19 3	3 4	0 2	<0 13	ND	ND
05	46 0	29 3	21 3	24 8	6 5	0 3	0 2	ND	ND
06	78 9	42 9	25 1	17 4	2 9	<0 13	<0 13	ND	ND
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	50 1	26 0	24 7	21 2	ND	0 7	<0 13	<0 13	ND
09	32 2	30 2	16 6	9 3	1 1	<0 13	<0 13	ND	ND
10	50 7	34 3	17 0	13 1	2 1	<0 13	<0 13	<0 13	ND
11	34 0	30 0	23 7	22 5	4 6	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	48 1	31 9	19 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	44 8	32 3	15 5	13 6	2 6	ND	ND	ND	ND
	Week 21	Week 22	Week 23	Month 6	Month 7	Month 8	Month 9	Month 10	Month 12
N	10	10	10	9	8	7	7	2	0
Mean	48 7	31 3	20 4	16 8	3 1	0 2	0 0	0 0	
SD	13 20	6 93	4 08	5 56	1 79	0 26	0 08	0 00	

FIG 4C

Levels of receptor saturation maintained in the MS study

Visit	Sampling Time	Statistic	Placebo (n=71)	3.0 mg/kg Antegren (n=68)	6.0 mg/kg Antegren (n=74)
Month 0	Pre-infusion	N	14	13	14
		Mean	9.82	8.06	7.56
		SD	5.331	2.192	3.135
		Median	8.3	7.7	6.7
		Minimum	4.7	5.9	3.1
		Maximum	24.9	14.4	13.3
Month 0	2-Hr Post infusion	N	14	14	14
		Mean	8.21	99.11	100.97
		SD	3.567	10.557	4.884
		Median	7.5	102.4	102.1
		Minimum	5.2	74.9	93.2
		Maximum	18.6	110.8	110.7
Visit	Sampling Time	Statistic	Placebo (n=71)	3.0 mg/kg Antegren (n=68)	6.0 mg/kg Antegren (n=74)
Month 0	24-Hr Post infusion	N	12	12	13
		Mean	9.30	99.09	98.93
		SD	7.328	9.052	12.079
		Median	6.7	99.9	97.4
		Minimum	5.6	81.5	81.2
		Maximum	31.9	109.4	117.5
Week 1		N	14	14	14
		Mean	7.92	93.41	99.61
		SD	2.579	5.656	12.011
		Median	8.3	94.3	94.9
		Minimum	3.5	82.8	83.5
		Maximum	13.3	100.9	120.8

8/19

FIG 5A

8/19

9/19

Levels of receptor saturation maintained in the MS study

		Placebo (n=71)	3.0 mg/kg Antegren (n=68)	6.0 mg/kg Antegren (n=74)
Visit	Statistic			
Week 2	N	12	14	13
	Mean	8.98	88.28	97.37
	SD	2.991	7.494	14.377
	Median	8.4	88.0	97.9
	Minimum	4.1	75.9	78.3
	Maximum	13.4	101.4	131.7
Week 3	N	13	13	12
	Mean	8.17	80.99	92.79
	SD	2.242	19.150	9.767
	Median	8.8	85.5	92.3
	Minimum	4.9	24.5	74.7
	Maximum	12.0	99.3	110.9
		Placebo (n=71)	3.0 mg/kg Antegren (n=68)	6.0 mg/kg Antegren (n=74)
Visit	Statistic			
Month 1	N	14	13	13
	Mean	8.87	82.48	85.58
	SD	3.808	11.272	8.491
	Median	8.4	84.1	84.6
	Minimum	3.1	56.1	68.6
	Maximum	17.3	100.2	96.1
Month 2	N	12	14	13
	Mean	9.41	79.15	93.21
	SD	3.846	22.779	9.194
	Median	9.4	87.1	94.0
	Minimum	4.7	7.3	75.8
	Maximum	19.5	96.6	104.2

FIG 5B

83

Levels of receptor saturation maintained in the MS study

			Placebo (n=71)	3 0 mg/kg Antegren (n=68)	6 0 mg/kg Antegren (n=74)
Visit	Sampling Time	Statistic			
Month 3		N	12	14	12
		Mean	6 97	79 47	83 32
		SD	2 720	23 459	18 333
		Median	6 5	81 6	88 9
		Minimum	3 3	8 9	29 2
		Maximum	11 4	104 5	96 3
Month 4		N	10	14	11
		Mean	8 38	77 81	95 51
		SD	3 400	25 375	15 794
		Median	7 1	76 0	93 6
		Minimum	4 9	7 9	78 3
		Maximum	16 9	117 4	139 0
			Placebo (n=71)	3 0 mg/kg Antegren (n=68)	6 0 mg/kg Antegren (n=74)
Visit	Sampling Time	Statistic			
Month 5	Pre-infusion	N	9	13	11
		Mean	9 48	70 88	91 94
		SD	2 606	26 535	10 720
		Median	9 1	75 1	94 8
		Minimum	6 1	9 0	75 4
		Maximum	15 6	115 0	106 9
Month 5	2-Hr Post infusion	N	9	11	10
		Mean	11 03	92 09	99 19
		SD	6 203	8 267	10 200
		Median	7 6	95 0	97 4
		Minimum	4 9	79 7	82 5
		Maximum	21 7	103 4	114 6

FIG 5C

84

WO 03072040

Levels of receptor saturation maintained in the MS study

		Placebo (n=71)			3.0 mg/kg Antegren (n=68)			6.0 mg/kg Antegren (n=74)			
Visit	Sampling Time	Statistic									
Month 5	24-Hr Post infusion	N	8			12			10		
		Mean	7.50			92.04			89.08		
		SD	2.660			15.256			32.364		
		Median	6.4			94.6			95.9		
		Minimum	4.7			49.5			4.8		
		Maximum	12.8			106.4			123.2		
Week 21		N	8			12			11		
		Mean	8.06			80.25			92.27		
		SD	2.217			24.078			11.557		
		Median	8.2			86.2			88.9		
		Minimum	4.3			5.1			77.3		
		Maximum	11.7			94.6			112.9		
		Placebo (n=71)			3.0 mg/kg Antegren (n=68)			6.0 mg/kg Antegren (n=74)			
Visit	Sampling Time	Statistic									
Week 22		N	7			12			10		
		Mean	8.67			84.98			90.44		
		SD	2.471			25.744			18.174		
		Median	8.7			90.5			81.6		
		Minimum	5.1			6.2			73.5		
		Maximum	12.0			101.7			127.8		
Week 23		N	7			10			10		
		Mean	9.16			82.89			97.24		
		SD	2.950			27.649			23.374		
		Median	8.7			90.2			90.9		
		Minimum	4.6			6.1			78.8		
		Maximum	14.0			100.5			154.8		

11/19

PCT/US03065421

FIG 5D

[Handwritten signature]

Levels of receptor saturation maintained in the MS study

		Placebo (n=71)	3.0 mg/kg Antegren (n=68)	6.0 mg/kg Antegren (n=74)
Visit	Statistic			
Month 6	N	10	13	9
	Mean	8.65	67.32	80.59
	SD	3.574	29.838	27.738
	Median	8.2	80.2	85.4
	Minimum	4.4	6.4	10.0
	Maximum	16.7	102.5	106.2
Month 7	N	10	12	8
	Mean	7.69	42.10	80.46
	SD	1.281	24.011	27.664
	Median	7.7	41.1	67.2
	Minimum	5.1	4.7	62.5
	Maximum	10.4	88.0	145.2
		Placebo (n=71)	3.0 mg/kg Antegren (n=68)	6.0 mg/kg Antegren (n=74)
Visit	Statistic			
Month 8	N	10	13	8
	Mean	7.60	14.09	34.16
	SD	1.726	10.214	21.619
	Median	6.9	12.1	29.6
	Minimum	6.0	6.2	11.8
	Maximum	10.7	45.0	59.6
Month 9	N	5	7	7
	Mean	9.52	5.88	9.45
	SD	2.701	2.246	4.644
	Median	9.0	5.6	7.7
	Minimum	6.3	3.7	5.5
	Maximum	13.5	10.4	18.0

FIG 5E

Levels of receptor saturation maintained in the MS study

Visit	Sampling Time	Statistic	Placebo (n=71)	3 0 mg/kg Antegren (n=68)	6 0 mg/kg Antegren (n=74)
Month 10		N	2	3	4
		Mean	7 78	8 65	9 17
		SD	2 029	0 635	1 655
		Median	7 8	8 6	9 3
		Minimum	6 3	8 0	7 1
		Maximum	9 2	9 3	11 0
Month 12		N	1	1	1
		Mean	8 80	6 04	6 61
		SD			
		Median	8 8	6 0	6 6
		Minimum	8 8	6 0	6 6
		Maximum	8 8	6 0	6 6
Visit	Sampling Time	Statistic	Placebo (n=71)	3 0 mg/kg Antegren (n=68)	6 0 mg/kg Antegren (n=74)
Early Termination		N	0	1	1
		Mean		94 51	32 29
		SD			
		Median		94 5	32 3
		Minimum		94 5	32 3
		Maximum		94 5	32 3

13/19

FIG 5F

14/19

87
87

Clinical Response in the CD Study

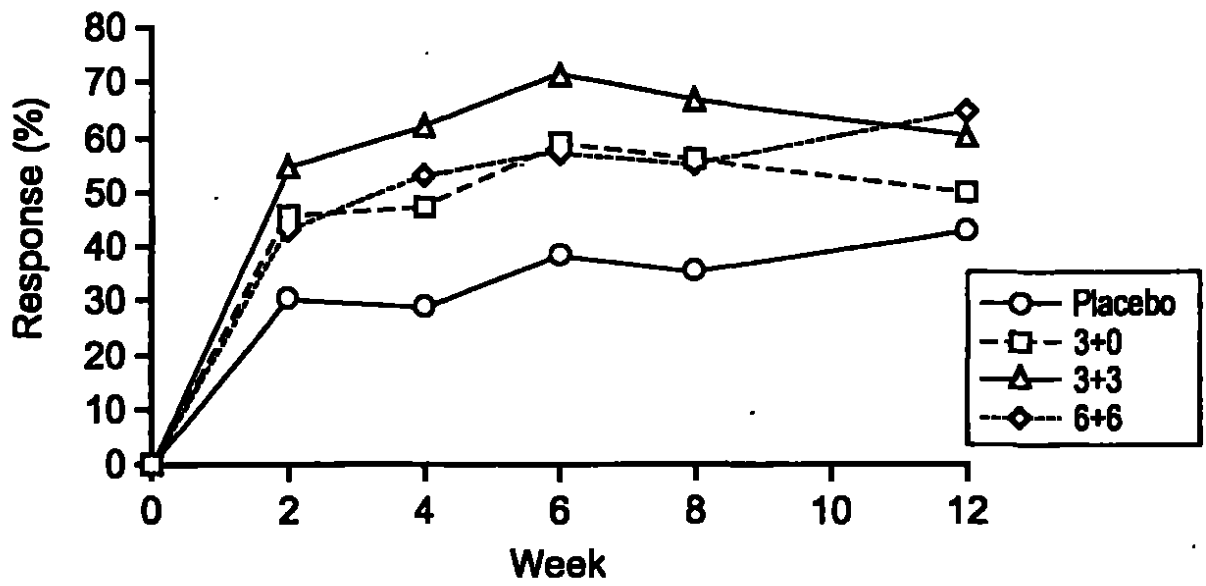


FIG. 6

Remission in the CD Study

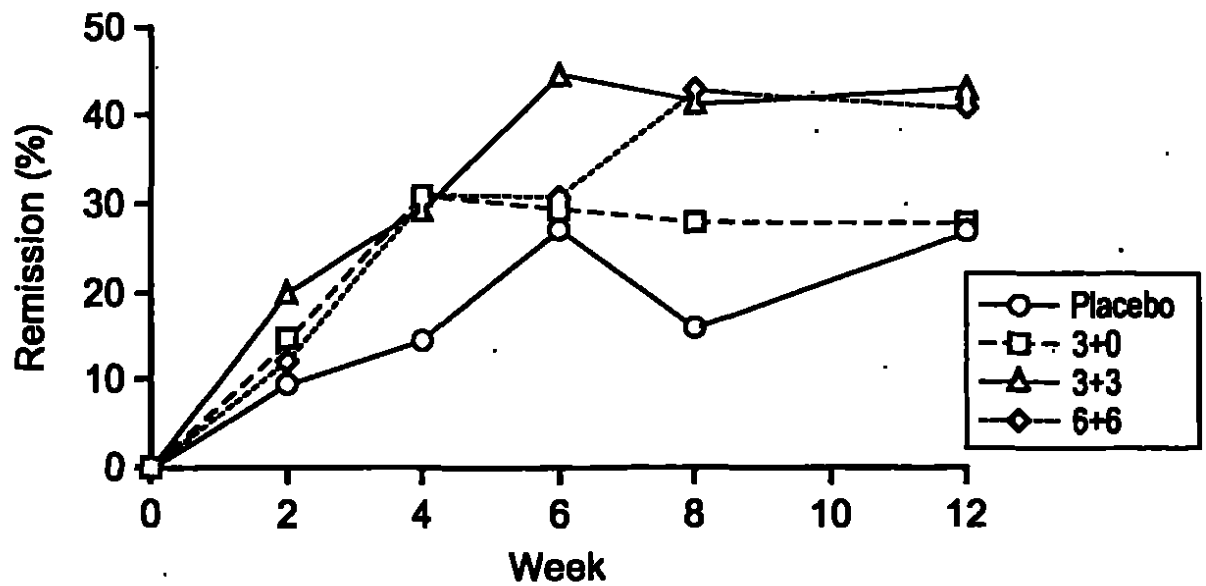


FIG. 7

90

15/19

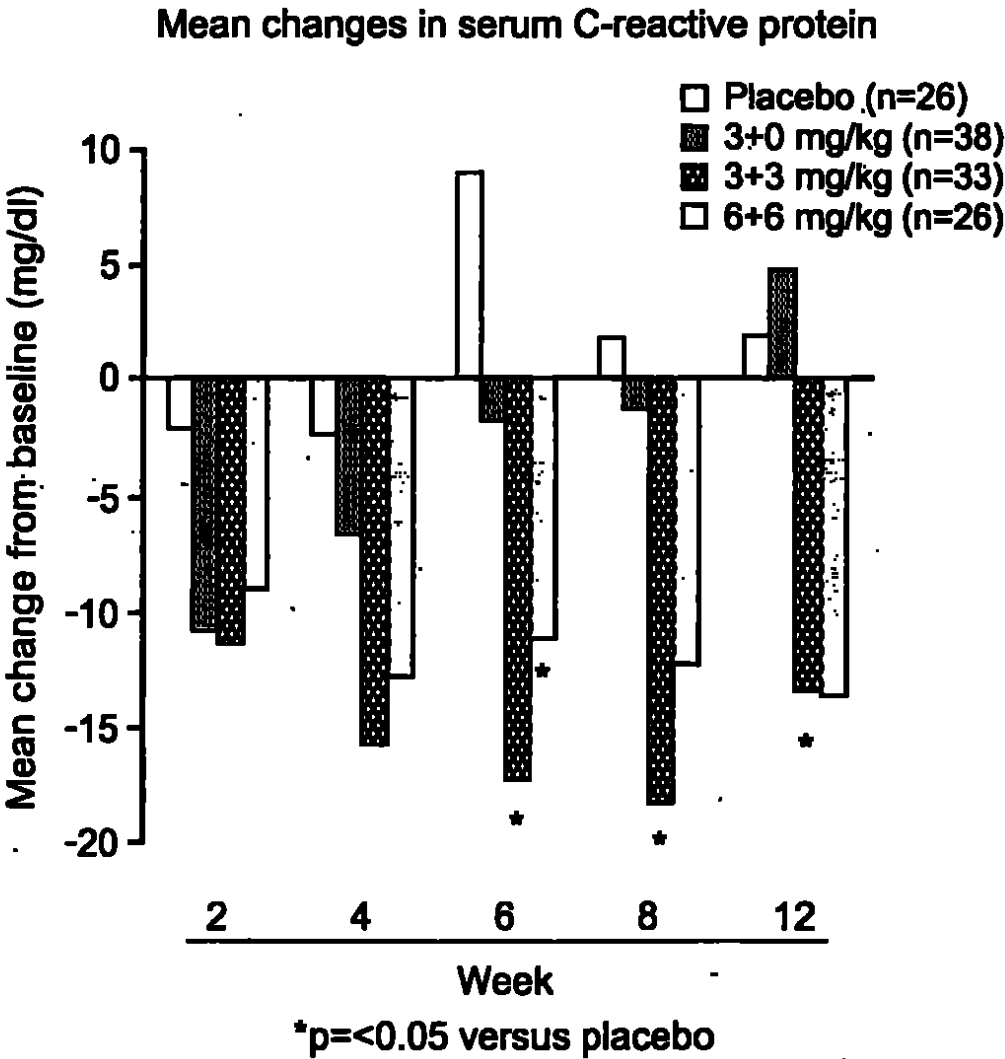


FIG. 8

89

The effect of natalizumab on circulating eosinophils in patients with active Crohn's disease and ulcerative colitis.

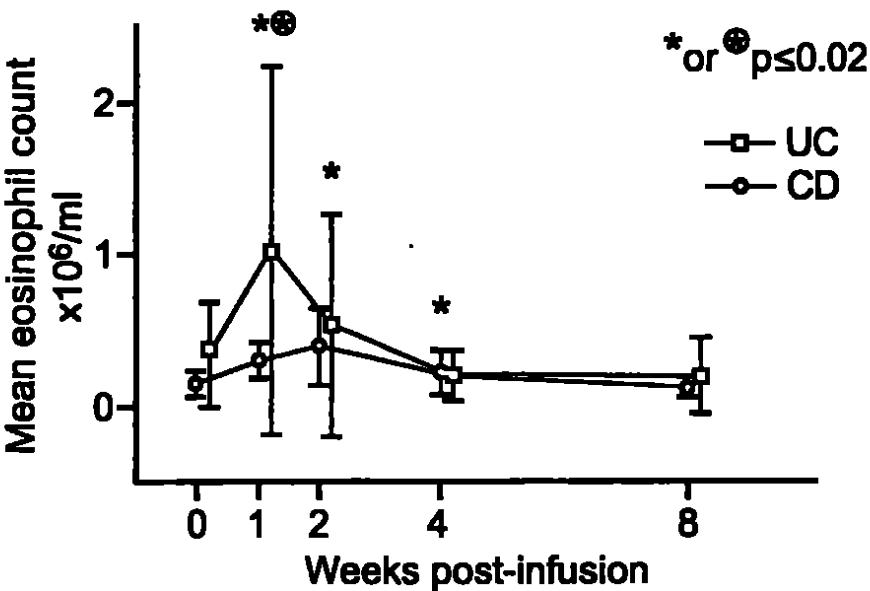


FIG. 9A

The effect of natalizumab on circulating monocytes in patients with active Crohn's disease and ulcerative colitis.

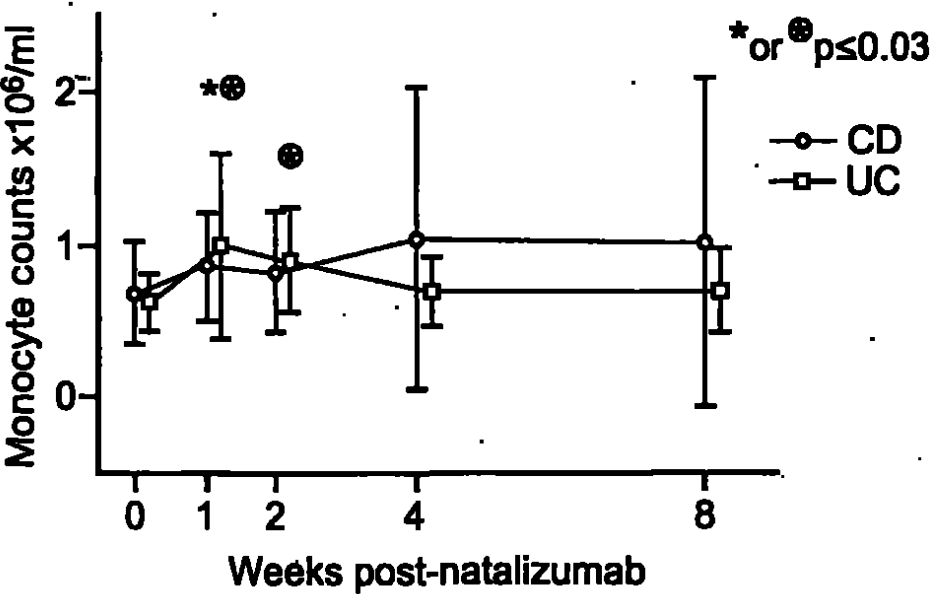


FIG. 9B

90

17/19

The effects of natalizumab on TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells expressing activation antigens in patients with active Crohn's disease.

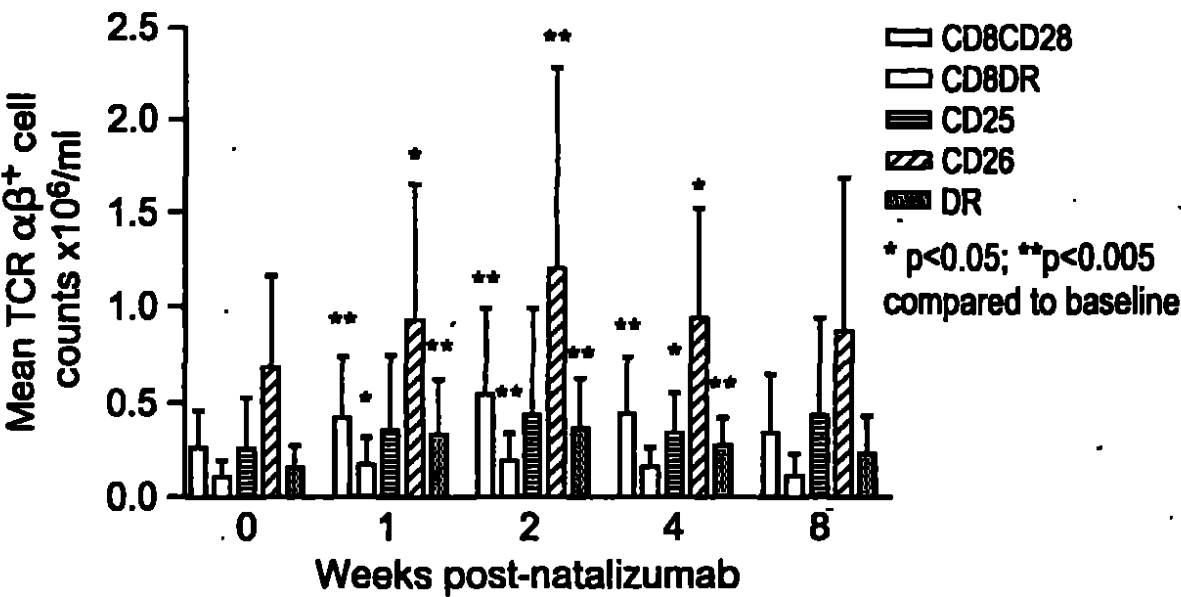


FIG. 10A

The effects of natalizumab on TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells expressing activation antigens in patients with active ulcerative colitis.

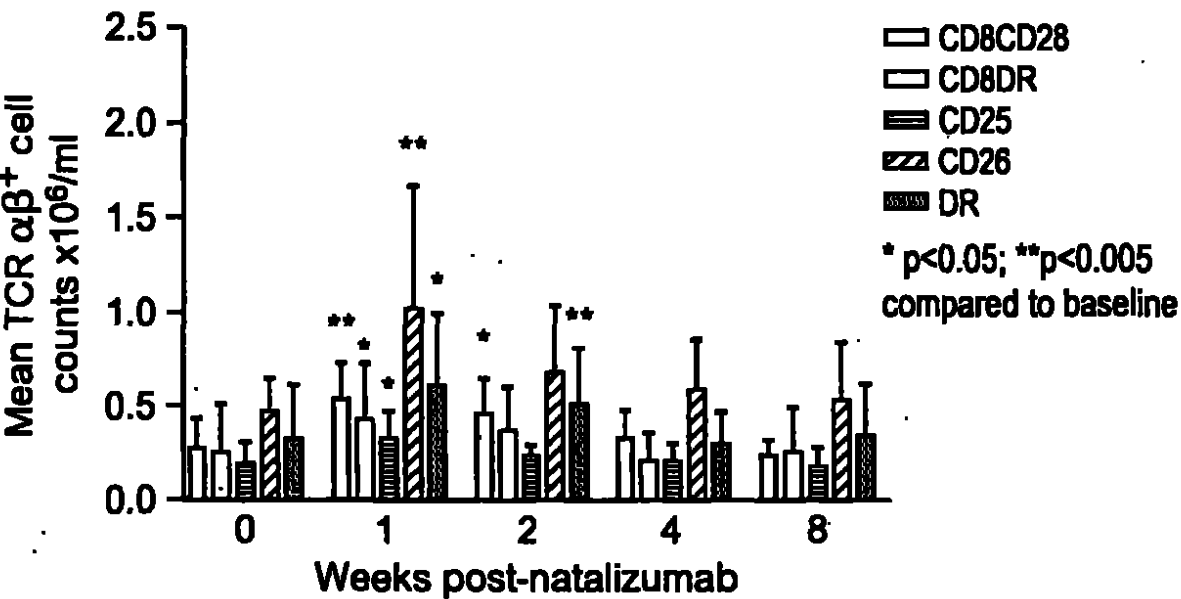


FIG. 10B

al

18/19

The effects of natalizumab on TCR $\alpha\beta^+$ cells expressing activation antigens and memory and naive markers in patients with active Crohn's disease.

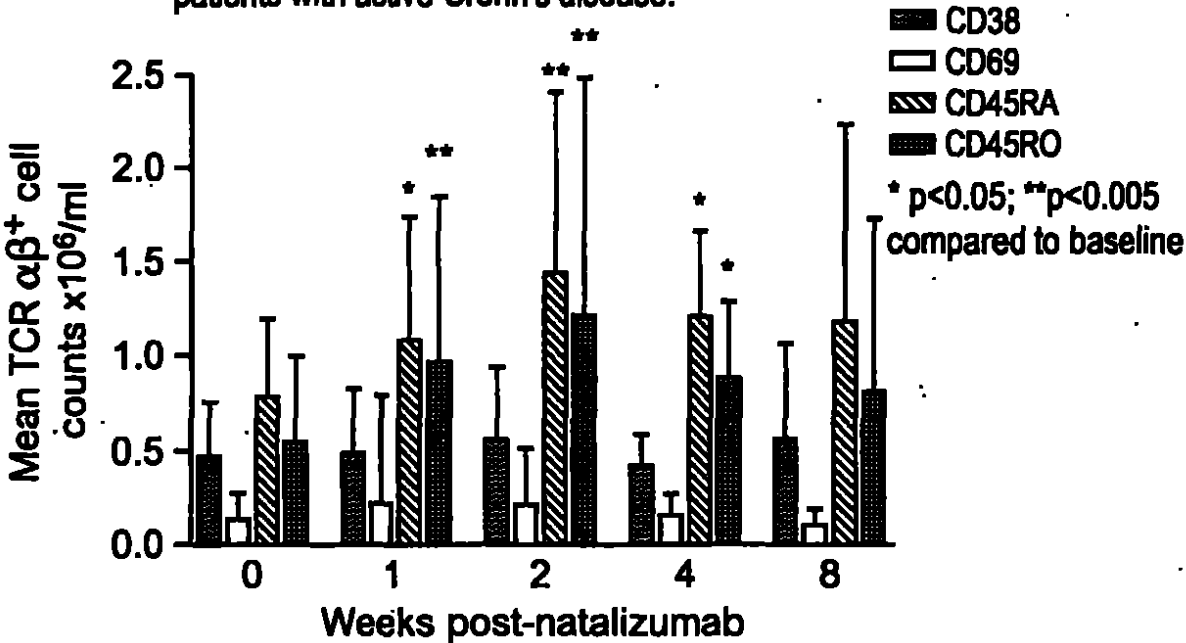


FIG. 10C

The effects of natalizumab on TCR $\alpha\beta^+$ cells expressing activation antigens, memory and naive markers in patients with active ulcerative colitis.

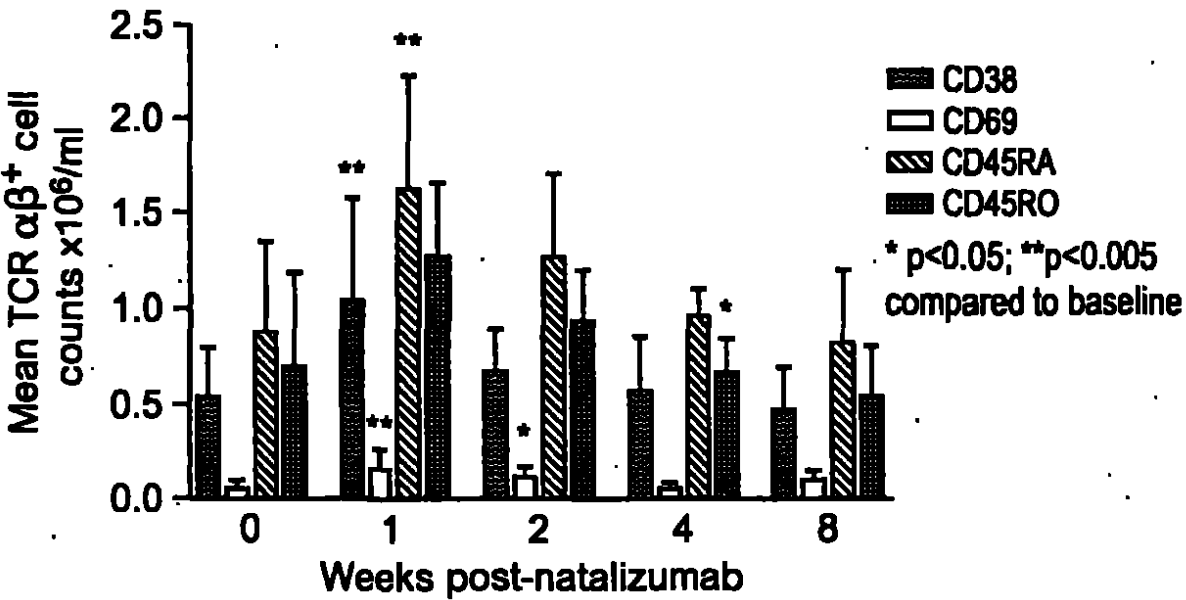


FIG. 10D

19/19

The effects of natalizumab on circulating TCR- $\gamma\delta^+$ and NK-type cells in patients with active Crohn's disease.

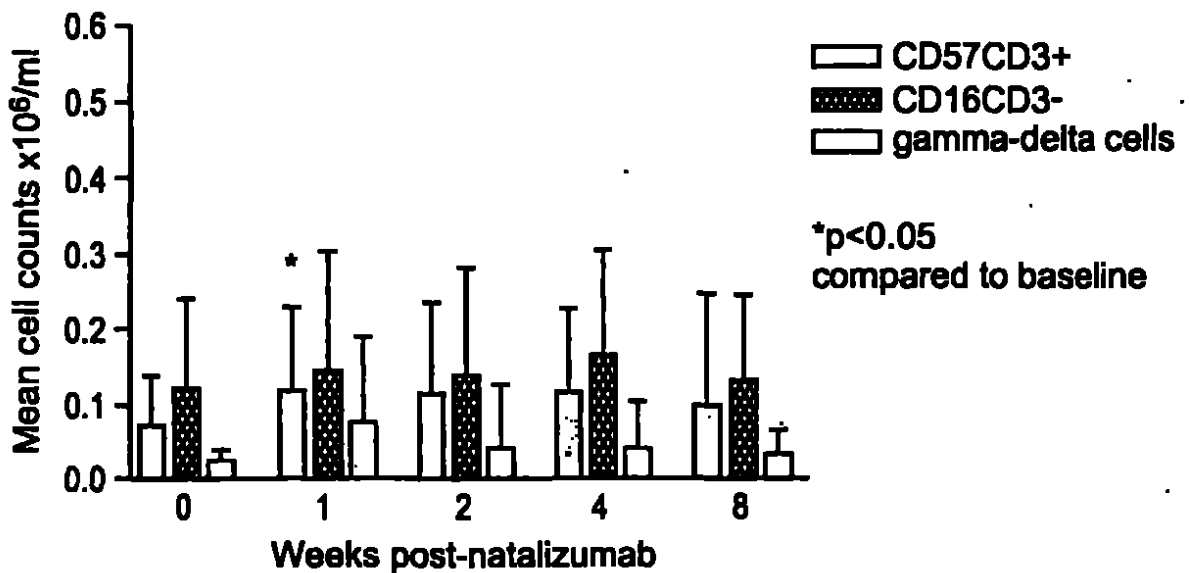


FIG. 11A

The effects of natalizumab on circulating TCR- $\gamma\delta^+$ and NK-type cells in patients with ulcerative colitis.

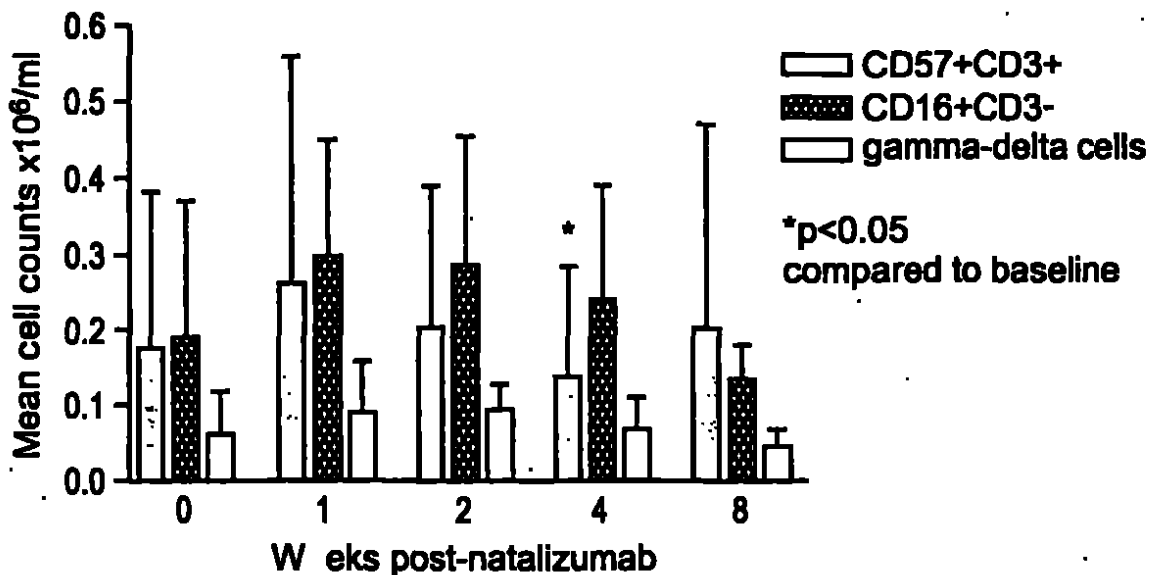


FIG. 11B

23

ADMINISTRACIÓN DE AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE
INFLAMACIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona de manera general con agentes que se unen específicamente e inhiben un receptor de integrina que comprende una subunidad alfa -4 ($\alpha 4$) y los usos terapéuticos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inflamación es una respuesta a los tejidos vascularizados a infecciones o daños y se afecta por la adhesión de leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y su infiltración en los tejidos circundantes. En la inflamación normal, los leucocitos infiltrantes liberan mediadores tóxicos para matar los organismos invasores, fagocitar desechos y células muertas, y jugar un papel en la reparación de tejido y la respuesta inmune. Sin embargo, en inflamación patológica, los leucocitos infiltrantes son una sobre respuesta y pueden originar daños serios o fatales. Ver, por ejemplo Hickey, *Psychoneuroimmunology II* (Academia Press 1990).

Las integrinas son una familia de glicoproteínas de la superficie celular involucrada en la adhesión celular, la migración y la activación de célula inmune. La integrina alfa-4 se expresa en todos los leucocitos circulantes excepto los neutrofilos, y forma receptores heterodiméricos en conjunto con las subunidades integrina beta 1 o beta 7, ambos dímeros alfa -4 beta-1 ($\alpha 4\beta 1$) y alfa-4 beta-7 ($\alpha 4\beta 7$) juegan un papel en la migración de leucocitos a través de el endotelio vascular (Springer et al., 1994 *Cell* 76: 301-14; y Butcher et al., 1996 *Science* 272: 60-6) y contribuye a la activación celular y a la supervivencia dentro del parenquima (Damle et al., 1993 *J. Immunol.* 151: 2368-79; Koopman et al., 1994 *J. Immunol.* 152:3760-7; y Leussink et al., 2002 *Acta Neuropathol.* 103:131-136).

Específicamente, el alfa-4 beta-1 (también conocido como el antígeno-4 muy tardío [VLA-4]), se une a la molécula-1 de adhesión de célula vascular (VCAM-1) (Lobb et al; 1994. *J. Clin. Invest.* 94:1722-8), que se expresa mediante el endotelio vascular en muchos sitios de inflamación crónica (Bevilacqua et al., 1993 *Annu. Rev. Immunol.* 11:767-804; y Postigo et al., 1993 *Res. Immunol.* 144: 723-35). El dímero alfa-4 beta-7 interactúa con la molécula

de adhesión a la célula adresina de la mucosa (MAdCAM-1), y media el retorno de los linfocitos al intestino (Farstad et al., 1997 *Am J. Pathol.* 150:187-99; and Issekutz et al., 1991 *J. Immunol.* 147: 4178-84). La expresión del MAdCAM-1 en el endotelio vascular también se incrementa en sitios de inflamación en el tracto intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (Briskin et al., 1997 *Am. J. Pathol.* 151:97-110).

Las moléculas de adhesión tales como las integrinas alfa-4 son objetivos potenciales para los agentes terapéuticos. Por ejemplo, el receptor VLA-4, del cual la integrina alfa-4 es una subunidad, es un objetivo importante en razón de su interacción con un ligando que reside en las células endoteliales del cerebro. Las enfermedades y las condiciones que resultan de la inflamación del cerebro tienen consecuencias particularmente severas. En otro ejemplo, el dímero de integrina de alfa-4 beta-7 es un objetivo importante debido a su involucramiento en el retorno del linfocito y la inflamación patológica en el tracto gastrointestinal.

La integrina alfa-4 beta-1 se expresa en la superficie extracelular de los linfocitos y monocitos activados, que han estado implicados en la patogénesis e las lesiones cerebrales inflamatorias agudas y la degradación de la barrera cerebral sanguínea (BBB) asociada con esclerosis múltiple (MS) (Coles et al., 1999 *Ann. Neurol.* 46 (3): 296-304). Los agentes contra la integrina alfa-4 han sido ensayados por su potencial anti inflamatorio tanto *in Vitro* como *in vivo* en modelos animales. Ver Yednock et al., 1992 *Nature* 356: 63-66; Patente estadounidense No. 5,840,299 otorgada a Bendig, et al., en Noviembre 24, 1998, y la Patente U. S. No. 6,001,809 otorgada a Thorsett et al., en Noviembre 14, 1999. Los experimentos *in Vitro* demuestran que los anticuerpos de integrina alfa-4 bloquean la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales del cerebro. Los experimentos que ensayan el efecto de los anticuerpos de integrina alfa-4 en animales que tienen una condición artificialmente inducida que simulan esclerosis múltiple, encefalomiелitis auto inmune experimental (EAE), han demostrado que la administración de los anticuerpos de integrina anti-alfa-4 evitan la inflamación del cerebro y la subsecuente parálisis en animales. Colectivamente, estos experimentos identifican los anticuerpos de

integrina anti-alfa-4 como agentes terapéuticos potencialmente útiles para tratar la esclerosis múltiple y otras enfermedades y desórdenes inflamatorios.

En otro ejemplo específico de la inflamación patológica que involucra las integrinas alfa-4, la enfermedad de Krohn (CD) es una inflamación crónica, incurable, recurrente, transmural del tracto intestinal. La enfermedad se caracteriza por la migración celular inmune inapropiada y la activación de la mucosa intestinal que involucra células T, macrófagos y neutrófilos (Schreiber et al., 1991 *Gastroenterology* 101: 1020-30). Las terapias médicas de primera línea para la enfermedad de Krohn incluyen 5-aminosalicilatos (5-ASAs), que tienen baja eficacia, y corticosteroides, que tienen varios efectos colaterales de corto y largo plazo (Munkholm et al., 1994 *Gut* 35:360-2). Los pacientes refractarios a las terapias de primera línea son tratados con agentes inmunosupresivos tales como azatioprina, 6-mercaptopurina, y metotrexato, pero estos agentes tienen una irrupción lenta de acción y efectos colaterales potencialmente serios. (Stein et al., 2001 *Surg. Clin. North Am.* 81:71-101, VIII). Más recientemente, los agentes biológicos con irrupción más rápida de acción han

sido introducidos para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, pero tales agentes están similarmente plagados de asuntos tales como la eficacia y los efectos colaterales de largo plazo.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra métodos para reducir crónicamente la inflamación patológica en un paciente por vía de la administración crónica de un agente que se une selectivamente a la integrina alfa-4. El régimen de dosis crónico del agente alfa-4 se diseña de tal forma que (1) el agente se una específicamente a la integrina alfa-4 o aun dímero integrina que comprende integrina alfa-4, y (2) el agente se administra repetidamente para mantener la saturación del receptor de integrina alfa-4 en un nivel suficiente para suprimir la inflamación patológica. El agente de la invención puede ser útil en la supresión de inflamación por vía de la unión e inhibición de todos los dímeros de integrina que comprenden la subunidad alfa-4, o se puede diseñar para unirse a un dímero específico, por ejemplo alfa-4 beta-1.

En una modalidad, la eficacia de un régimen de dosis crónico se puede determinar por la medición de saturación de un dímero de integrina específico. En un ejemplo particular, se cree que el dímero de integrina alfa-4 beta-1 se involucra en esclerosis múltiple, así el nivel de saturación requerido para un régimen de administración crónico eficaz se puede medir por vía de la medición de saturación del receptor dímero alfa-4 beta-1.

En otra modalidad, cuando los dímeros de integrina múltiples se creen que están involucrados en la inflamación patológica, la saturación de una combinación de receptores dímeros se puede medir para determinar la eficacia de un régimen de administración crónico. En un ejemplo específico, tanto los dímeros alfa-4 beta-1 como alfa-4 beta-7 se cree que se involucran en la inflamación patológica asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino. Así, la medición tanto de los niveles de saturación de alfa-4 beta-1 como alfa-4 beta-7 puede ser benéfica para determinar la eficacia de un régimen de administración crónico particular.

En una modalidad, el éxito de un régimen de dosis crónico se puede determinar mediante la valoración de un marcador

fisiológico de la inflamación patológica. Por ejemplo, en un régimen de dosis crónico administrado para MS, el éxito del régimen de dosis se puede confirmar mediante la detección de los niveles de lesiones cerebrales que utilizan una técnica de imágenes, por ejemplo, imágenes de resonancia magnética (MRI). En otro ejemplo, un régimen de dosis crónico administrado para CD, el éxito del régimen de dosis se puede confirmar mediante la detección de los niveles de proteína reactiva-C de suero en un paciente. En aún otro ejemplo, el éxito del régimen de dosis se puede determinar utilizando un conjunto de criterios asociados bienestar, por ejemplo, reducción en CDAJ en un paciente CD.

Otra modalidad de la invención contempla el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal (por ejemplo la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa y la enfermedad inflamatoria del intestino) de un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende natalizumab suficiente para tratar o mejorar dicha enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal en dicho sujeto.

En una modalidad específica, la invención caracteriza un régimen de dosis en donde la administración repetida de un agente se suministra para proveer un nivel de saturación del sector integrina alfa-4 del 65-100% en un paciente, suministrando de esta manera la supresión crónica de la inflamación patológica en el paciente. En otra modalidad específica, el agente es administrado repetidamente para suministrar niveles de al menos aproximadamente 75-100% en un paciente. Aun otra modalidad específica, el agente es administrado repetidamente para suministrar niveles de al menos aproximadamente 80-100% en un paciente.

Una característica de la invención es que los efectos indeseables de la inflamación patológica se pueden suprimir a largo plazo en un paciente, por ejemplo, durante un periodo de seis meses, un año, dos años, o más.

Un aspecto del método de la invención es que los niveles suficientes de un agente de integrina anti-alfa-4 son mantenidos durante largos periodos para suprimir la inflamación patológica durante esos periodos.

Una característica de la invención es que la forma de dosis suministra niveles más bajos de inflamación patológica durante más largos periodos comparados con una dosis simple.

Una ventaja de la invención es que los agentes utilizados en un método de la invención son bien tolerados y tienen baja toxicidad.

Estos y otros objetos ventajas, y características de la invención serán evidentes para aquellas personas expertas en la técnica luego de la lectura de leer los detalles de los métodos formulaciones como se describen completamente adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una gráfica lineal que ilustra un número medio acumulado de nuevas lesiones que mejoran Gd en pacientes MS luego de dosificación con natalizumab

La figura 2 muestra el porcentaje de exploraciones activas en cada punto de tiempo durante el estudio MS con

natalizumab. Las alteraciones activas son aquellas que contienen una o más lesiones que mejoran Gd.

Las figuras 3A-C y 4A-C muestran las concentraciones de suero de natalizumab que siguen los puntos de tiempo de régimen de dosis en un estudio MS. Las figuras 3A-C muestran los niveles del estudio de 3-mg/kg; las figuras 4A-C muestran los niveles para el estudio de 6-mg/kg.

Las figuras 5A-F ilustran los niveles de saturación del receptor mantenido en el estudio MS. Los niveles mostrados son valores porcentuales.

Las figuras 6 y 7 muestran el porcentaje de pacientes que logran criterios predefinidos de respuestas clínica (figura 6) o remisión (figura 7) luego de la dosificación en el estudio CD.

La figura 8 ilustra ilustran los cambios medios en la proteína reactiva -C de suero en un subconjunto de pacientes que tienen proteína reactiva -C elevada en la línea base en el estudio CD. Los valores de línea base fueron (en mg/l): placebo, 38.44 (N=26); grupo 3+0 mg/kg.

32.35 (N=38); grupo 3+3 mg/kg, 41.16 (N=36); y grupo 6+6 mg/kg, 333 (N=26).

La figura 9 A-B demuestra respectivamente los efectos del natalizumab sobre eosinófilos circulantes en paciente con enfermedad de Kohn activa (CD) y colitis ulcerativa (UC). En la figura 9A demuestra que el natalizumab incrementa significativamente el conteo de eosinófilo circulante en la enfermedad de Kohn (N=18) y en pacientes con colitis ulcerativa (N=12) después de 3 mg/kg de infusión de natalizumab. La figura 9 muestra que la administración de la natalizumab incrementa significativamente el conteo de monocitos en la enfermedad de Kohn activa y en pacientes con colitis ulcerativa después de 3 mg/kg de infusión de natalizumab.

Las figuras 10 A-D demuestran el impacto de la administración de natalizumab sobre las células TCR $\alpha\beta^+$ que expresan antígeno de activación. El panel A demuestra el efecto de natalizumab en pacientes con enfermedad de Kohn activa es decir, un incremento significativo de las células TCR $\alpha\beta^+$ que expresan en CD 26, HLA-DR, CD8CR y CD8 CD28 en al menos cuatro semanas luego de 3mg/kg de infusión de natalizumab. El panel B demuestra los efectos

del natalizumab sobre las células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ que expresan activación de antígenos en pacientes con colitis ulcerativa activada, es decir, incremento significativo en las células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ que expresan CD26, HLA-DR, CD8CR y CD8 CD28 en al menos 4 semanas luego de 3 mg/kg de infusión de natalizumab. El panel B muestra los efectos de la administración de natalizumab en células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ que expresan a antígenos de activación y memoria y marcadores naturales en pacientes con enfermedad de Krohn activa, es decir, incremento significativo de la memoria (CD45RO) y células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ naturales (CD45RA) en al menos 4 semanas luego de la infusión de natalizumab. El panel B muestra los efectos de natalizumab en las células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ que expresan antígenos de activación, memoria y marcadores naturales en pacientes con colitis ulcerativa activa, es decir incremento significativo de la memoria (CD45RO, células (CD45RA), CD69 y CD38 $\text{TCR}\alpha\beta^+$ naturales en una semana luego de la administración de natalizumab.

Las figuras 11 A-B demuestran el efecto del natalizumab en las células tipo $\text{TCR}\alpha\beta^+$ y NK circulantes en pacientes con enfermedad de Krohn activa y con colitis ulcerativa respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de que se describan los presentes métodos y los agentes terapéuticos, se debe entender que esta dimensión está limitada a los métodos particulares y agentes terapéuticos descritos, como tal puede, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada aquí es para propósitos de describir las modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante.

Donde se suministra un rango de valores, se entiende que cada valor interviniente valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente dicte otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido está comprendido dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos rangos más pequeños pueden ser independientemente incluidos en el objeto más pequeño a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen cualquiera

de ambos de aquellos límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por alguien experto en la técnica al cual la invención pertenece. Aunque cualquiera métodos y materiales similares equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención los métodos preferidos y los materiales son ahora descritos. Todas las publicaciones mencionadas aquí se incorporan aquí como referencia para mostrar y describir los métodos y/o materiales en relación con las cuales las publicaciones son citadas.

Se debe notar que como se utilizan aquí, las formas singulares un "una", "y", y "el" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de tales anticuerpos y la referencia a "la dosis" incluye referencia a una o más dosis y equivalentes de estas conocidas por el experto en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones discutidas aquí se suministran solamente para sus descripciones antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada aquí debe ser considerado como una admisión de que la presente invención no tiene capacidad para anticipar tal publicación en virtud de la invención previa. Además las fechas de publicación suministradas pueden ser diferentes de las fechas de publicación actuales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

DEFINICIONES

El término "agente anti-alfa-4" como se utiliza aquí se refiere a cualquier agente, que se une específicamente a una integrina que comprende una subunidad alfa-4 e inhibe la actividad de la integrina. Esto incluye agentes que se unen específicamente a la integrina alfa-4, así como también agentes que se unen a un dímero de integrina que comprende la integrina alfa-4. Por ejemplo, alfa-4 beta-1 ($\alpha 4\beta 1$) o alfa-4 beta-7 ($\alpha 4\beta 7$) el término "agentes" significan incluir moléculas sintéticas y recombinantes (por ejemplo anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos u

otras moléculas sintéticamente producidas o compuestos, así como también productos de gen recombinantemente producidos) así como también compuestos de ocurrencia natural (por ejemplo polipéptidos, anticuerpos y similares).

El término "eficacia" como se utiliza aquí en el contexto de un régimen de dosis crónica se refiere a la efectividad de un régimen de tratamiento particular. La eficacia se puede medir con base en el cambio de curso de la enfermedad de respuesta a un agente de la presente invención. Por ejemplo, en el tratamiento de MS, a la eficacia se puede medir por la frecuencia de recurrencias en el MS recurrente-remitente, y por la presencia o ausencia de nuevas lesiones en el Sistema Nervioso Central detectadas utilizando métodos tales como MRI.

El término "éxito" como se utiliza aquí en el contexto de los regímenes de tratamiento crónico se refieren a la efectividad de un régimen de tratamiento particular. Esto incluye un balance de eficacia, toxicidad (por ejemplo efectos colaterales y tolerancia del paciente de una formulación o unidad de dosis), el cumplimiento del paciente, y similar. Para el régimen de administración

crónico hacer considerado "exitoso" debe balancear aspectos diferentes del cuidado del paciente y la eficacia para producir el más favorable éxito del paciente.

Los términos "específicamente unidos" o "unido específicamente" como se utiliza aquí se refieren a la situación en la cual un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a las moléculas diferentes de su compañera de unión específica (por ejemplo una afinidad de aproximadamente 1000x o más para su compañero de unión). En la presente invención, el agente de integrina anti-alfa-4 no mostrará unión significativa a ningún polipéptido diferente de la integrina alfa-4 o un receptor que comprenda integrina alfa-4. Por ejemplo, los anticuerpos utilizados en los métodos de la invención que se unen a una integrina alfa-4 con una afinidad de unión de 10^7 mol/l o más, preferiblemente 10^8 mol/litro o más, se dice que se unen específicamente a una integrina alfa-4.

El término "sustancialmente homólogo" como se utiliza aquí pretende significar cualquier polipéptido que tiene una alteración en la secuencia tal que un aminoácido

funcionalmente equivalente se sustituye para uno o más aminoácidos en el polipéptido, produciendo así un cambio que no tiene ningún o relativamente poco efecto sobre las propiedades de unión del polipéptido. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácido dentro de la secuencia se pueden sustituir por otro aminoácido de una polaridad similar.

El término "elicitación de una respuesta inmune" y "elicitación de una respuesta inmune de huésped" como se utiliza aquí se refiere a la producción de una respuesta inmunológica a un receptor que comprende una integrina alfa-4 en un sujeto luego de la introducción de un agente de la infección al sujeto. Una respuesta inmune en el sujeto se puede caracterizar por la reactividad de suero con un receptor de integrina alfa-4 que es al menos dos veces aquel del objeto no tratado, más preferiblemente tres veces la reactividad de un sujeto no tratado, y aún más preferiblemente al menos cuatro veces la reactividad de un sujeto no tratado, con inmunoreactividad de suero medida utilizando una dilución de suero de aproximadamente 1:100.

El término "material excipiente" pretende significar cualquier compuesto que forma parte de la formulación que pretende actuar simplemente como un portador, es decir, que no pretende tener actividad biológica en sí mismo.

El término "adyuvante" como se utiliza aquí se refiere a un aditivo de composición que aumenta la respuesta inmune a un agente de la invención pero que no elicitara por sí mismo una respuesta inmune. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmune utilizando una variedad de mecanismos biológicos, que incluyen pero no están limitados a reclutamiento linfocítico, estimulación de célula T, estimulación de célula B, y estimulación de macrófago.

Los términos "tratar" y "tratamiento" y similares son utilizados aquí para significar de manera general obtener un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar o prevenir parcialmente una enfermedad, síntoma o condición de ésta y /o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, condición, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se utiliza aquí cubre cualquier

tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad ocurra en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad pero que no se le hay diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, interrumpir su desarrollo, o (c) aliviar la enfermedad, es decir originar la regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o condiciones. La invención está dirigida hacia tratar un paciente que sufre de enfermedad relacionada con inflamación patológica. La presente invención está involucrada en la prevención, inhibición, o alivio de los efectos adversos atribuidos a la inflamación patológica durante largos periodos de tiempo y/o son tales causados por las respuestas fisiológicas a la inflamación inapropiada presente en un sistema biológico durante largos periodos de tiempo.

El término "inflamación patológica" como se utiliza aquí se refiere a una inflamación inapropiada y crónica asociada con desórdenes que incluyen, pero no están limitados a, asma, aterosclerosis, SIDA, demencia, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, rechazo de transplante, injerto versus enfermedad de huésped, esclerosis múltiple (especialmente

para inhibir la desmielinación adicional), metástasis tumoral, nefritis, dermatitis atópica, soriasis, isquemia del miocardio, prostatitis crónica, con complicaciones de anemia de célula falciforme, lupus eritematoso, y daño de pulmón mediado por leucocito agudo. Tal inflamación se caracteriza por una respuesta exacerbada de células inflamatorias, que incluye infiltrar leucocitos. Durante el tiempo, tal inflamación patológica a menudo da como resultado el daño al tejido en la región de inflamación inapropiada.

Por "Antegren®" se significa incluir el anticuerpo también conocido como AN100226 (número de código del anticuerpo) o natalizumab (nombre USAN). En Antegren® es un anticuerpo de integrina anti-alfa-4 recombinante, humanizada. Preferiblemente, la enfermedad o condición que es tratada en el mamífero es aquella que se modula cuando una dosis terapéuticamente efectiva de Antegren® se administra.

ASPECTOS GENERALES DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el sorprendente resultado que la administración crónica de una clase de

emergente de nuevo compuesto conocidos como inhibidores de molécula de adición selectiva (SAMI) es suficiente para suministrar el mantenimiento de supresión crónica de inflamación en desórdenes que involucran dímeros de integrina. Luego de la cesación del régimen de dosis repetido, la supresión de la inflamación se reversa (ver, por ejemplo, figura 2). Los tratamientos previos de los inhibidores inflamatorios han aproximado los regímenes de dosis muy diferentemente, en la creencia que la administración de un inhibidor inflamatorio originaría una reacción del sistema de respuestas propio del cuerpo, que conduciría a su vez a un reconocimiento de la inflamación como patológica y un alivio crónico resultante de la inflamación patológica. Lo que los inventores han mostrado aquí es que un régimen de dosis crónica no es solamente más efectivo que un régimen de dosis a corto plazo, sino de hecho, que se requiere para mantener la supresión de la inflamación patológica. Así, con el fin de comprender algunas de las más importantes ventajas de la invención, los niveles del agente de integrina anti-alfa-4 necesitan ser mantenidos durante un número de meses aun años.

La presente invención está basada en el resultado de un gran ensayo aleatorizado, controlado con placebo de un anticuerpo de integrina anti-alfa-4, natalizumab, en pacientes con MS recurrente o con CD moderado a severamente activo. Natalizumab es un antagonista de anticuerpo monoclonal, recombinante, humanizado contra integrina alfa-4. Los resultados de estos ensayos han mostrado que el tratamiento con natalizumab mejora los signos y síntomas del paciente con MS y CD. La invención también pretende incluir otros anticuerpos quiméricos, que incluyen anticuerpos de primatized™.

En un sentido general el método de la invención no involucra ningún modo particular de administración, en razón a que el modo de administración depende de la forma del agente activo y de la formulación desarrollada para suministrar él o los agentes activos. Sin embargo, los ejemplos específicos descritos aquí fueron obtenidos utilizando administración parenteral de natalizumab. Aunque la presente invención se describe utilizando un anticuerpo que se une específicamente a una integrina alfa-4, también se pretende incluir la administración crónica de, por ejemplo, anticuerpos bivalentes o multivalentes que reconocen tanto los compañeros de un

dímero de integrina, siempre y cuando el dímero comprenda una integrina alfa-4.

El concepto general de la invención se relaciona con introducir cantidades relativamente constantes de un agente activo al sistema circulatorio del paciente durante un periodo de meses o años. Esta introducción crónica de un agente que se une selectivamente a la integrina alfa-4 o un dímero que comprende una integrina alfa-4 da como resultado la supresión de la inflamación patológica que es mantenida a un nivel constante durante un periodo de tiempo. Al mantener los niveles terapéuticos de un agente activo durante un periodo de tiempo, la inflamación patológica puede ser crónicamente suprimida en el paciente.

En un sentido muy específico, la invención involucra obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano de un dímero que comprende integrina alfa-4 en un rango desde aproximadamente 65% a aproximadamente 100%, más preferiblemente entre aproximadamente 75% a aproximadamente 100%, y aún más preferiblemente entre aproximadamente 80% a aproximadamente 100%. Estos niveles de saturación del

receptor son mantenidos en éstos niveles crónicamente (por ejemplo durante un periodo de 6 meses o algo así) para permitir la supresión continuada de la inflamación patológica.

LOS AGENTES QUE SE UNEN SELECTIVAMENTE A LAS INTEGRINAS

ALFA-4

Varios tipos de agentes con la capacidad de unirse e inhibir la actividad de la integrina alfa-4 se pueden utilizar en la práctica de la invención. Muchos de tales agentes se han identificado y caracterizado y se describen agentes específicos adelante. Dadas las enseñanzas descritas aquí, está dentro de la habilidad del experto en la técnica identificar otros agentes que sean capaces de inhibir los dímeros de integrina que comprenden alfa-4 de una manera que se asemeje biológicamente o sea similar a los agentes específicamente descritos, y la presente invención pretende incluir la administración crónica de tales agentes y las combinaciones de tales agentes.

Anticuerpos

En una modalidad específica, los agentes de la invención son anticuerpos o fragmentos inmunológicamente activos de esta que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o a un dímero que comprende alfa-4, tal como alfa-4 Beta-1 o alfa-4 beta-7.

Cuando el agente de la invención es un anticuerpo, se prefiere un anticuerpo monoclonal. Como contraste a las preparaciones de anticuerpo policlónal, que típicamente incluye diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un epítipo simple sobre el antígeno. La segunda ventaja de los anticuerpos monoclonales es que ellos son sintetizados por medios que sean descontaminados por otras inmunoglobulinas, por ejemplo, por despliegue de fago o aislamiento de un hibridoma. Aunque la presente invención pretende comprender tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales como agentes de la invención, los anticuerpos monoclonales son preferidos en la medida en la medida en que ellos son altamente específicos, y la invención se discute así principalmente en términos de anticuerpos monoclonales.

Además, otros anticuerpos pueden ser identificados utilizando técnicas disponibles en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden producir utilizando tecnología de despliegue de fago. Los fragmentos de anticuerpo que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o a un dímero que comprende una integrina alfa-4 son entonces aislados. Los métodos preferidos de ejemplo para la producción de tales anticuerpos por vía de despliegue de fago son descritos en la patente U.S. Nos. 6,225,447; 6,180,336; 6,172,197; 6,140,471; 5,969,108; 5,885,793; 5,871,907; 5,858,657; 5,837,242; 5,733,743; y 5,565,332.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir utilizando los métodos de hibridoma convencionales. Estos métodos se han aplicado ampliamente para producir líneas celulares híbridas que secretan altos niveles de anticuerpo monoclonales contra muchos antígenos específicos, y también pueden ser utilizados para producir anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, los ratones (por ejemplo el ratón Balb/c) se puede inmunizar con un epítipo de integrina alfa-4 antigénico mediante inyección intraperitoneal. Después de que ha pasado tiempo suficiente para permitir

una respuesta inmune, los ratones son sacrificados, y se obtienen las células de bazo y se fusionan con células de mieloma, utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Las células resultantes fusionadas, hibridomas, son entonces crecidas en un medio selectivo, y las células supervivientes crecen en tal medio utilizando 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 al objetivo, la integrina alfa-4 o un dímero que comprende una integrina alfa-4. Para producir agentes específicos para uso humano, el aislado monoclonal puede entonces ser utilizado para producir anticuerpos quiméricos y humanizados.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple (por ejemplo scFv), fragmentos, F (ab') fragmentos producidos mediante una librería de expresión Fab, anticuerpos antidiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id a anticuerpos de la invención), y fragmentos que se unen

a epítomos de cualquiera de los anteriores. Más preferiblemente los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno humano de la presente invención e incluyen, pero no están limitados a, Fab, Fab' y F (ab')₂, Fd, Fvs de cadena simple (scFv) anticuerpos de cadena simple, Fvs ligados por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un VL o un dominio VH. Los fragmentos de anticuerpo que se unen al antígeno, incluyen anticuerpos de cadena simple, pueden comprender el o las regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región de piboteo, dominio CH1, CH2 y CH3. También están incluidas en la invención los fragmentos de unión de antígeno que pueden comprender cualquier combinación de una región o regiones variables con una región de piboteo, domino CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo pájaros y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, de murinos (por ejemplo ratón y rata), asno, oveja, mono, conejo, cabra, cerdo de guinea, cerdo, camello, caballo o pollo (u otra ave). Como se utiliza aquí, los anticuerpos "humano" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácido de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos asilados de las librerías de inmunoglobulina

humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describió *infra* y, por ejemplo en la Pat. U.S. No. 5,939,598 de Kucherlapati et al.

Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden producir de anticuerpos no humanos, y pueden tener la misma o similar afinidad de unión que el anticuerpo del cual son producidos. Las técnicas para producción de anticuerpos quiméricos (Morrison et al., 1948 Proc.Natl.Acad. Sci. 81:6851; Neuberger et al., 1984 Nature 312:604; Takeada et al., 1985 Nature 314:452) incluyen empalmar los genes de, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada; tales anticuerpos están dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una región variable (V) de un anticuerpo monoclonal de ratón se puede unir a un ácido nucleico que codifica una región constante humana (C), por ejemplo, IgG1 o IgG4. El anticuerpo resultante es así una especie híbrida, generalmente con el dominio de unión de antígeno

proveniente de anticuerpo no humano y el dominio C o del efectuator de un anticuerpo de humano o primate.

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos con regiones variables que son principalmente de anticuerpo humano (es decir el anticuerpo aceptador), pero que tienen regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de un anticuerpo no humano (el anticuerpo donador). Ver, por ejemplo, Queen et al., Proc Nat'l. Acad. Sci USA 86:10029-10033 (1989); WO 90/07861, U.S. Patent Nos. 6,054,297; 5,693,761; 5,585,089; 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 son típicamente escogidos de anticuerpos humanos que tienen secuencias que despliegan una alta homología con los dominios de unión de la región variable no humana deseada. Los residuos de variable de cadena pesada y ligera se pueden derivar del mismo anticuerpo, o un anticuerpo humano diferente. Además, las secuencias pueden ser escogidas como un consenso de los varios anticuerpos humanos, tales como los descritos en la WO 92/22653.

Un "anticuerpo Primatized™" es un anticuerpo recombinante que contiene secuencias variables de primate o porciones de unión de antígeno, y secuencias de dominio constante de humano. Ver Newman, Biotechnology, 1992,10:1455-60. La primatización de anticuerpos da como resultado la generación de anticuerpos que contiene dominios variables de mono y secuencias constantes de humano. Para mayores detalles ver la patente U.S. No.6.113,898. Esta técnica modifica los anticuerpos de tal forma que ellos no son rechazados luego de la administración en humanos porque ellos son antigénicos. Esta técnica confía en la inmunización de monos cinomólogos con antígenos o receptores humanos. Esta técnica fue desarrollada para crear alta afinidad de anticuerpos monoclonales dirigida a antígenos de superficie de célula humana.

Los aminoácidos específicos dentro de la región variable humana son seleccionados para sustitución con base en la conformación predicha y las propiedades de unión de antígeno. Esto se puede determinar usando técnicas tales como modelos por computador, predicción del comportamiento de las propiedades de unión de los aminoácidos en ciertos sitios dentro de la región variable, y observación de los efectos de sustitución.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre una región variable no humana y una región variable humana, la región variable humana se puede alterar para reflejar la composición del aminoácido de la región variable no humana.

En una modalidad específica, los anticuerpos utilizados en el régimen de dosis crónica de la presente invención son anticuerpos humanizados como se describe en la patente U.S. No. 5,840,299, que se incorpora aquí como referencia.

En otra modalidad, los ratones transgénicos que contienen genes de anticuerpo humano se pueden inmunizar con una estructura de integrina alfa-4 antigénica y se puede utilizar la tecnología de hibridoma para generar anticuerpos humanos que se unan selectivamente a la integrina alfa-4.

Los anticuerpos humanos y/o humanizados quiméricos se pueden producir al utilizar expresión recombinante, por ejemplo expresión en hibridomas humanos (Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p 77 (1985), en células de mieloma o en células de ovario

de hámster chino (CHO). Alternativamente, las secuencias de codificación del anticuerpo se puede incorporar en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la subsecuente expresión en la leche del animal transgénico. Por ejemplo, patente U.S. Nos. 6,197,946; 5,849,992; 5,565,362; 5,336,894; y 5,304,489. Los trasvenes adecuados incluyen trasvenes que tienen promotor y/o un mejorador de un gen específico de la glándula mamaria, por ejemplo Caseína o β -lactoglobulina.

Moléculas Pequeñas

Las moléculas pequeñas para uso en la presente invención comprenden numerosas clases químicas, aunque típicamente ellas son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 4,000 Daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con propteinas, particularmente unidos con hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos grupos químicos

funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los anteriores grupos funcionales. Los agentes candidatos son también encontrados entre biomoléculas que incluyen, pero no están limitados a: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de éstos.

Las moléculas pequeñas se pueden obtener de una amplia variedad de fuentes que incluyen librerías de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para la síntesis aleatoria y directa de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, las librerías de compuestos naturales en la forma de extractos bacteriales, fungos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Adicionalmente, las librerías naturales o sintéticas producidas y los compuestos son fácilmente modificados a través de química, física y bioquímica convencionales, y pueden ser utilizados para producir librerías

combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden ser sometidos a modificaciones químicas directas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, acidificación, etc. para producir análogos estructurales.

Péptidos de Integrina Anti-Alfa-4

Los métodos de la invención se pueden desarrollar con cualquier péptido que sea capaz de unirse a una integrina alfa-4 o a un dímero que comprende una subunidad alfa-4. En los métodos de la invención se encuentran incluidos péptidos que son sustancialmente homólogos a una región de la matriz extracelular o a un ligando natural del receptor específico de la integrina alfa-4 o a receptores objetivo. Por ejemplo, para la inhibición crónica del receptor alfa-4 beta-1, los péptidos se pueden utilizar que comprendan al menos una porción de la región III CS de fibronectina (por ejemplo los péptidos que comprenden al menos una porción de la secuencia del péptido CS-1 o una secuencia sustancialmente homologa a la secuencia CS-1) se pueden utilizar para unirse a un receptor e inhibir la actividad de la integrina que comprende alfa-4. Ver

por ejemplo USSN 08/452,098, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Agentes que Elicitan una Respuesta Inmune

En una modalidad específica, los agentes de la invención son péptidos o peptidomiméticos que comprenden un fragmento inmunogénico de una integrina alfa-4. Un fragmento inmunogénico es cualquier fragmento que comprende un epítipo de alfa-4, y generalmente tiene al menos 3,5,7,10,15,17 ó 20 aminoácidos contiguos de una proteína alfa-4 de mamífero de ocurrencia natural. La secuencia del péptido tanto del alfa-4 humano como de murino es accesible del GenBank (Accesos Nos. AA 59613 y NP_034706). Un experto en la técnica puede fácilmente diseñar un agente péptido de la invención con base en la secuencia de aminoácido del alfa-4 o utilizando los nucleótidos tipo silvestre que los codifica (por ejemplo GenBank Accesos Nos. L12002 y NM-01056, respectivamente).

Una vez que se designa el péptido apropiado, este puede ser inicialmente tamizado contra los anticuerpos conocidos por tener la actividad inmunogénica deseada, por ejemplo anticuerpos que se unen selectivamente a una

estructura alfa-4 y se caracterizan por la capacidad de inhibir la actividad de una integrina que comprende Alfa-4.

El fragmento inmunogénico se puede diseñar para tener análogos de aminoácido u otros elementos estructurales que mejorarán la respuesta inmunogénica. En particular, los fragmentos de péptido pueden tener extremos terminales C- o N- alterados y mejora la inmunogenicidad total de las moléculas aunque no impidiendo su capacidad de elicitar una respuesta inmune. Ejemplos de tales análogos incluyen, pero no están limitados a: aminoácidos alfa, y alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato, gama-N,N,N-trimetillisina, gama-N-acetil lisina, O-fosfocerina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, y 5-hidroxilisina. Otros análogos útiles se pueden encontrar en Sigma, Biochemicals and Reagents, Sigma-Aldrich (2001). El fragmento puede ser marcado detectablemente para permitir el seguimiento de la molécula dentro del sujeto luego de la administración a un sujeto.

132

Los péptidos, las estructuras análogas, los peptidométicos y similares se pueden aislar de fuentes naturales, y entonces ser opcionalmente procesados (por ejemplo por vía de clivage de péptido) o alternativamente sintetizados por técnicas convencionales conocidas en el arte tal como la síntesis de fase sólida o la expresión recombinante. Ver, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbro Press, New Cork, 2^{da} edición 1989). La síntesis automática de péptido se puede desarrollar utilizando un aparato comercialmente disponible de fabricantes tales como Applied Biosystems (Foster City, California), y los métodos de hacerlo así están bien establecidos. La producción recombinante de proteínas puede ser en células procarióticas tales como fago o células bacteriales o sistemas eucarióticos, tales como células de levadura, insecto o mamífero. Alternativamente, las proteínas se pueden producir utilizando sistemas in vitro libres de célula conocidos en la técnica.

En otro ejemplo, las librerías que despliegan los péptidos de fago se pueden utilizar para expresar grandes números de péptidos que se pueden escoger in vitro para identificar péptidos que se unen específicamente al alfa-

4 o aun dímero que comprende la integrina de alfa-4. La tecnología que despliega el fago suministra unos medios para expresar una población diferente de péptidos aleatorios o selectivamente aleatorizados. Varios métodos de despliegue de fago y métodos para producir diversas poblaciones de péptidos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Ladner et al, (Patente U.S.No. 5,223,409), describe métodos para preparar poblaciones diversas de dominios de unión sobre la superficie de un fago. Ladner et al. Describe vectores de fago para producir una librería de despliegue de fago, así como también métodos para seleccionar dominios de unión potenciales y producir dominios de unión mutados aleatoria o selectivamente. La escogencia de una librería de despliegue de fago generalmente involucra paneo in vitro de la librería utilizando una molécula objetivo purificada. El fago que se une a la molécula objetivo se puede recuperar; el fago individual se puede clonar, y el péptido expresado por un fago clonado se puede determinar.

Similarmente, Smith and Scout (Meth. Enzymol. 217:228-257 (1993) y Science 249: 386-390(1990)) describe métodos de producción de librerías que despliegan el péptido de fago, incluyendo vectores y métodos para diversificar la

134

población de péptidos "que son expresados (ver también, Huse, WO 91/07141 y WO 91/07149). La tecnología de despliegue de fago puede ser particularmente potente cuando se utiliza, por ejemplo, con un codón basado en método de mutagénesis, que se puede utilizar para producir péptidos aleatorios o péptidos deseablemente presionados (ver, por ejemplo, pat. U.S. No.5,264,563). Estos y otros métodos bien conocidos se pueden utilizar para producir una librería de despliegue de fago, que puede ser sometida al método de paneo in vivo de la invención con el fin de identificar un péptido que se encuentra en uno o unos pocos órganos seleccionados.

Las moléculas de una librería que despliega péptido de fago también pueden estar presentes como un conjugado, que puede facilitar la recuperación o identificación del péptido de interés. Como se utiliza aquí, el término "conjugado" significa un péptido o un péptido mimético de la librería ligada a una porción física, química o biológica tal como pero va limitada a un sustrato sólido, un micro glóbulo plástico, un oligonucleótido o un bacteriófago, y similar. La porción puede suministrar unos medios para identificar o recuperar un agente.

✓
135

Algunos agentes utilizados para elicitir una respuesta inmune semejan el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune contra la integrina de alfa-4 pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos por si mismos. En esta situación, el agente del péptido puede estar ligado a un portador adecuado para facilitar una respuesta inmune. Los portadores adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa cerradura (KHL), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, toxoide de tétano o un toxoide de otra bacteria patógena, tal como difteria, E. coli, cólera, o H. pílori, o un derivado de toxina atenuado. Otros portadores incluyen epítipos de células T que se unen a alelos MCH múltiples, por ejemplo, al menos 75% de todos los alelos MHC humanos. Tales portadores son algunas veces conocidos en la técnica como "epítipos de células T universales". Ejemplos de epítipos de células T incluyen:

Hemaglutinina de Influenza: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT (ID SEC No 2)
PADRE

AKXVAAWTLKAAA (ID SEC No.3)

Donde X es preferiblemente
cicloexilalanina, tirosina,
o fenilalanina

(36

Malaria CS: Epitopo T3	EKKIAKMEKASSVFNV (ID SEC No.4)
Antígeno de superficie de Hepatitis B: HBsAg ₁₉₋₂₀	FLLTRILTI (ID SEC No 5)
Proteína de golpe de calor 65: hsp65 ₁₅₃₋₁₇₁	DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (ID SEC No 6)
Bacilo Calmete- Guérin	QVHFQPLPPAVVKL (ID SEC No 7)
Toxoide de Tétano: TT ₈₃₀₋₈₄₄	QYIKANSKFIGITEL (ID SEC No 8)
Toxoide de Tétano TT ₉₄₇₋₉₆₇	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (ID SEC No 9)
HIV gp 120 T1	KQIINMWQEVGKAMYA (ID SEC No.10)

Otros portadores para estimular la o mejorar la respuesta inmune incluyen citoquinas tales como IL-1 IL-1 α y β péptidos, IL-2, γ - INF, IL-10, GM-CSF, y quimoquinas, tales como proteína inflamatoria de macrófago (MIP) 1 α y β y RANTES (es decir células T normales de regulación luego de activación expresadas y secretadas). Los agentes inmunogénicos también se pueden ligar a péptidos que mejoran el transporte a través de los tejidos, como se describió en la WO 97/17613 y WO 97/17614.

137

Los agentes inmunogénicos pueden estar ligados a portadores mediante reticulación química. Las técnicas para ligar un agente a un portador incluyen pero no están limitadas a la formación de enlaces disulfuro utilizando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) y succinimidil 4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC) (si al péptido le falta un grupo sulfhidrilo, este puede ser suministrado mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace de sulfuro entre ellos mismos y un péptido de cisteína que reside en una proteína y un enlace de amida a través del ε-amino y una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describen en Immun.Rev.62:185(1982). Otros agentes acoplantes bifuncionales forman un tio-eter en lugar de un enlace disulfuro. Muchos de éstos agentes formadores de tio-eter están comercialmente disponibles e incluyen ésteres reactivos de ácidos 6-maleimidocapróico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-yodoacético, y ácido 4-(N-maleimido-metil) ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo se pueden activar al combinarlos con succinimida o sal de sodio de ácido 1-hidroxil -2-nitro-4 sulfónico.

Los agentes de péptido también se pueden expresar como proteínas de fusión con portadores (es decir, péptidos heterólogos. El agente péptido puede estar ligado a su terminal amino, su terminal carboxilo, o ambos a un portador. Opcionalmente, las repeticiones múltiples del péptido inmunogénico pueden estar presentes en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede estar ligado a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, tanto en el terminal N como C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir la respuesta de la célula T ayudante contra el péptido portador. Las células T ayudantes inducidas a su vez inducen respuesta de la célula B contra el péptido inmunogénico enlazado al péptido portador.

Si el agente es un anticuerpo, polipéptido, péptido, molécula pequeña u otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención que se le va a dar a un individuo, la administración es por vía de un régimen de dosis crónico. La cantidad actual administrada, y el índice y el curso de tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y severidad de lo que está siendo tratado. La prescripción del tratamiento, por ejemplo,

decisiones de dosis etc., está dentro de la responsabilidad de los practicantes generales y de otros médicos, y típicamente tiene en cuenta el desorden a ser tratado, la condición del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración, y otros factores conocidos por los practicantes. Ejemplos de las técnicas y los protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Science, 18 edición, Osol, A. (ed), 1990.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención también suministra composiciones farmacéuticas para la reducción de una inflamación patológica crónica en un sujeto susceptible a tal, y/o que sufra de un desorden asociado con inflamación patológica.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención preferiblemente contienen un agente en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% de la formulación. Ellas también se pueden utilizar en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y

excipientes son simplemente ejemplos y de ninguna manera pretenden ser limitantes.

Para las preparaciones orales, los agentes se pueden utilizar solos o en combinación con aditivos apropiados para hacer tabletas, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de papa; con ligadores, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegradores, tales como almidón de maíz, almidón de papa o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes amortiguantes, agentes humectantes reservativos y agentes saborizantes.

Cuando el agente es un anticuerpo, la formulación es preferiblemente administrada en una forma de dosis parenteral. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que son definidos como vehículos comúnmente utilizados para

161

formular composiciones farmacéuticas para administración en animales o humanos. El diluyente se selecciona con el fin de no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina amortiguada con fosfato fisiológico, solución de Ringer, solución de dextrosa, y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o la formulación también puede incluir otros portadores, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. También se pueden incluir moléculas portadoras tales como proteoglicanos. Los ejemplos específicos de tales moléculas portadoras incluyen, pero no están limitados, a glicosaminoglicanos tales como sulfato de heparina, ácido hialurónico, queratán-sulfato, condroitin 4-sulfato, condroitin 6-sulfato, heparán sulfato y dermatin sulfato, perlecan, y pentopolisulfato.

Los anticuerpos de la invención se pueden administrar como dosis inyectables de una solución o como una suspensión de la sustancia en un diluyente farmacéuticamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua y aceites con o sin la adición de un tensoactivo. Otras

142

preparaciones farmacéuticas son aquellas de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soya, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son los portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los agentes de ésta invención se pueden administrar en una forma de liberación sostenida, por ejemplo una inyección de depósito, preparación de implante, o bomba osmótica, los cuales se pueden formular de tal manera que permitan una liberación sostenida del ingrediente activo.

Además, los agentes de la invención que son anticuerpos se pueden suministrar mediante la administración de un polinucleótido que codifica un anticuerpo completo o parcial (por ejemplo una cadena simple Fv) a un sujeto. El polinucleótido se administra a un sujeto en un vehículo apropiado para permitir la expresión del anticuerpo en el sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Los agentes de la invención se pueden formular en preparaciones para inyecciones al disolver, suspender o emulsificarlos en un solvente acuoso o no acuoso, tal

147

como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol. Las formulaciones también pueden contener aditivos convencionales tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsificantes, estabilizadores y preservativos.

Los agentes se pueden utilizar en formulación de aerosol para ser administrados por vía de inhalación o suministro pulmonar. Los agentes de la presente invención se pueden formular en propulsantes presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Adicionalmente, los agentes pueden se hechos de supositorios mediante la mezcla con una variedad de bases tales como bases emulsificantes o bases solubles en agua. Los agentes de la presente invención se pueden administrar rectalmente por vía de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboneras y polietilenglicoles, los cuales se funden a la temperatura del cuerpo, solidificando aún a temperatura de ambiente de cuarto.

La administración de un agente de la invención puede lograrse mediante cualquier medio conveniente, incluyendo inyección parenteral, y puede ser sistémica o localizada en suministro. Los agentes de ésta invención se pueden incorporar en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente los agentes de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante la combinación con portadores o diluyentes apropiados farmacéuticamente aceptables, y se pueden formular en la preparación en formas solidas, semisólida, líquida o gaseosas, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, micro esferas, y aerosoles. Como tal, la administración de los agentes se puede lograr de varias maneras, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratecal, intranasal, gástrica, intramuscular, intracraneal, subtémica, etc. El agente activo puede ser sistémico después de la administración o se puede localizar mediante el uso de administración regional, administración intramural, o el uso de un implante que

actúa para retener la dosis activa en el sitio de la implantación.

Las formas de dosis unitaria para administración oral o rectal tal como melazas, elixires, y suspensiones se pueden suministrar en donde cada unidad de dosis, por ejemplo, cucharadita, cucharada, tableta o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más agentes de la presente invención. Similarmente, las formas de dosis unitaria para la inyección o la administración intravenosa pueden comprender el agente de la presente invención en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro portador farmacéuticamente aceptable.

Los implantes para las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidos en la técnica. Los implantes son formulados como microesferas, lonchas, etc., con polímeros biodegradables y no biodegradables, por ejemplo, polímeros de ácido láctico y/o ácido glicol y conforman un polímero erodable que es bien tolerado por el huésped. El implante es ubicado en proximidad del sitio de los depósitos de proteína (por ejemplo el sitio

de formación de depósitos amiloides asociados con desordenes neurodegenerativos), de tal forma que la concentración local del agente activo se incrementa en el sitio con relación al resto del cuerpo.

Una unidad de dosis típica para administración de un sujeto incluye, pero no está limitada a: una solución adecuada para administración intravenosa; una tableta tomada de dos a seis veces diariamente; o una cápsula de liberación en el tiempo o una tableta tomada una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente mayor del ingrediente activo, etc. El efecto de liberación en el tiempo se puede obtener por los materiales de la cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, por cápsulas que se liberan lentamente mediante presión osmótica o por cualquier otros medios conocidos de liberación controlada.

Ciertos agentes de la invención, incluyendo anticuerpos, y péptidos son algunas veces administrados en combinación con un adyuvante. Variedad de adyuvantes pueden ser utilizados en combinación con un agente de integrina alfa-4 para elicitar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un agente

sin originar los cambios conformacionales en el agente que afectan la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil 3 De-O-asilado lípido A (MPL™) (Ver GB2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa) Stimulón™ QS-21 es un glicócido triterpeno de saponina aislado del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en Suramérica (Ver Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente U.S. No 5,057,540, (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son aceite en emulsiones de agua (tal como escueleno o aceite de maní), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforil lípido A (Ver Stoute et al., 1997 *N. Engl. J. Med.* 336:86-91) Otro adyuvante es CpG (WO98/40100). Alternativamente, un agente se puede acoplar a un adyuvante. Sin embargo, tal acoplamiento no debe cambiar sustancialmente la conformación del epítipo alfa-4 deseado con el fin de afectar la naturaleza de la respuesta inmune del huésped. Los adyuvantes se pueden administrar como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o se pueden administrar

142

separadamente, antes, concurrentemente con o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes para la administración son las sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y sulfato de aluminio. Tales adyuvantes se pueden utilizar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilicina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsiones de aceite en agua. Tales adyuvantes se pueden utilizar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo N-acetilomuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina(nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidrofosforilóxi)etilamina (MTP-PE), N-acetilglucsaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP_DPP) teramidaTM, u otros componentes de pared celular bacterial. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a)MF59 (WO90/14837), que contiene 5% de Squalene, 0,5% Tween 80, y 0,5% de Span 85 (que contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE)

formuladas en partículas submicrónicas utilizando un fluidizador talo como el fluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAL que contiene 10% de Squalene, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado plirónico L121, y thr-MDP, o microfluidizado en una emulsión submicrónica o vortizado para generar una emulsión con tamaño de partícula mayor, y (c) sistema adyuvante RibiTM (RAS), (Ribi immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de Squalene, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de pares de célula bacterial del grupo que consiste de monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM). Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como StimulónTM (Qs-21; Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas de éstos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo e incompleto de Freund's (IFA), citoquinas, tales como interleuquinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulante de colonia de macrófago (M-CSF), y factor de necrosis tumoral (TNF). Tales adyuvantes están generalmente disponibles de fuentes comerciales.

150

Un adyuvante se puede Administrar con un agente como una composición simple, o se puede administrar antes, concurrente con o después de la administración del agente. El agente y un adyuvante se pueden empacar y suministrar en el mismo frasco o se pueden empacar en frascos separados y mezclar antes de uso. El agente del adyuvante están típicamente empacados con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el agente y el adyuvante están empacados separadamente, el empaque típicamente incluye instrucciones para mezclar antes de uso. La escogencia de un adyuvante y/o portador depende de tales factores tales como la estabilidad de la formulación que contiene el adyuvante, la ruta de administración, la programación de dosificación, y la eficacia del adyuvante para las especies que están siendo vacunadas. En humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable preferido es aquel que se ha aprobado para administración de humanos por los cuerpos regulatorios pertinentes. Ejemplos de tales adyuvantes preferidos para humanos incluyen alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, dos o más diferentes adyuvantes se pueden utilizar simultáneamente. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, y alumbre, Qs-21 y MPL juntos. También, el adyuvante de

Freund's incompleto se puede utilizar (Chang et al., 1998 *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:173-186), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21, y MPL y todas las combinaciones de éstos.

REGÍMENES DE DOSIS DE ADMINISTRACIÓN CRÓNICA

Los regímenes de tratamiento crónico de la presente invención suministran un agente de integrina anti-alfa-4 a un nivel que mantendrá saturación de receptor suficiente para suprimir la inflamación patológica en un paciente necesitado de esto. Los métodos de la invención implican administración una vez por cada dos semanas una vez al mes a una vez cada dos meses, con dosificaciones repetidas que tiene lugar durante un periodo de al menos seis meses, y más preferiblemente durante un año o más. Los métodos de la invención involucran obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano o un dímero que comprende integrina alfa-4 (por ejemplo VLA-4) en un rango de desde aproximadamente 65% a 100%, más preferiblemente entre aproximadamente 75% a aproximadamente 100%, y aún más preferiblemente aproximadamente 80% a aproximadamente 100%. Estos niveles de saturación del receptor son mantenidos a estos niveles

crónicamente (por ejemplo durante un periodo de 6 meses o algo así) para permitir la supresión continua de la inflamación patológica.

En una modalidad específica, el agente anti-alfa-4 es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humanizado o humano (por ejemplo natalizumab), y la dosis es sobre una base mensual. Los niveles de saturación del receptor se pueden monitorear para determinar la eficacia del régimen de dosificación, y los marcadores fisiológicos medidos para confirmar el éxito del régimen de dosis. Como una confirmación, los niveles de suero del anticuerpo se pueden monitorear para identificar la distancia del anticuerpo y determinar el efecto potencial de la vida a media sobre la eficacia del tratamiento.

La cantidad del agente administrado en una unidad de dosis puede depender de si el adyuvante también es administrado, con mayor dosis generalmente siendo requeridas en la presencia del adyuvante. Para la inmunización con un agente de la invención, los rangos de dosis van desde aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, más usualmente aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg, del peso de cuerpo del huésped. Por ejemplo, las dosis

153

pueden ser aproximadamente 1 mg/kg de peso de cuerpo o aproximadamente 10 mg/kg de peso de cuerpo. Las dosis y la frecuencia pueden variar dependiendo de la vida media de la gente en el paciente. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Para la administración del anticuerpo, cada inyección de dosis está generalmente entre aproximadamente 2,0 a aproximadamente 8,0 mg/kg. De acuerdo con las enseñanzas suministradas aquí, las dosis efectivas pueden ser monitoreadas al obtener una muestra de fluido del paciente, generalmente un suero de sangre o una muestra de fluido cerebro espinal, y determinar la saturación de receptor de integrina que utiliza métodos bien conocidos en el arte. Idealmente, una muestra es tomada antes de la dosificación inicial; subsecuente muestras son tomadas y medidas antes y/o después de cada inmunización. Una cantidad particularmente preferida es de 3 mg por kg de paciente por mes de natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo equivalente de este.

Cuando se administra el adyuvante, el nivel de dosis se incrementa de acuerdo con el adyuvante particular y el nivel de inmunogenicidad del agente anti-alfa-4. Las

dosis para los agentes individuales seleccionados de acuerdo con la presente invención, se determinan de acuerdo con los métodos de dosificación estándar tomados en conjunto con las enseñanzas suministradas aquí.

Como alternativa a la administración crónica comprendida de dosificaciones individuales repetidas, un agente anti-alfa-4 se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, siempre y cuando la dosis sea tal que los niveles de saturación del receptor permanezcan suficientes para suprimir la inflamación. Por ejemplo, los sistemas de liberación controlada se pueden utilizar para administrar crónicamente un agente anti-alfa-4 dentro del alcance de esta invención. La discusión de las formas de dosis de liberación controlada apropiadas se puede encontrar en Lesczek Krowczynski, *Extended-Release Dosage Forms*, 1987 (CRC Press, Inc).

Las varias tecnologías de liberación controlada cubren un muy amplio espectro de formas de dosis de droga. Las tecnologías de liberación controlada incluyen, pero no están limitadas a sistemas físicos y sistemas químicos. Los sistemas físicos incluyen, pero no están limitados, a sistemas de reservorio con membranas que controlan las

proporciones, tales como microencapsulación, macroencapsulación, y sistemas de membrana; sistemas de reservorio sin membranas de control de proporción, tales como fibras huecas, triacetato de celulosa ultramicroporoso, y sustratos poliméricos porosos y espumas; sistemas monolíticos, incluyendo aquellos sistemas físicamente disueltos en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo ingreso de agente ambiental no erodable, erodable, y degradable), y materiales físicamente dispersos en poliméricos no porosos, o matrices elastoméricas (por ejemplo ingreso de agente ambiental no erodable, erodable, y degradable); estructuras laminadas que incluyen capas de reservorio químicamente similares o no similares a capas de control exteriores; y otros métodos físicos, tales como bombas osmóticas, o absorción sobre resinas intercambiadoras de ion.

Los sistemas químicos incluyen, pero no están limitados a, erosión química de matrices de polímetro (por ejemplo erosión homogénea heterogénea u homogénea), o erosión biológica de una matriz de polímero (por ejemplo heterogénea u homogénea). La discusión adicional de las categorías de los sistemas para liberación controlada se

pueden encontrar en Agis F. Kydonieus, *Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications*, 1980 (CRC Press, Inc).

Los métodos de la invención se pueden utilizar para tratar un paciente que está afectado con un desorden que involucra o surge de inflamación patológica, o tratar profilácticamente un paciente con riesgo de un desorden particular. Los regímenes de dosis que son necesarios para el profiláctico versus el tratamiento terapéutico pueden variar, y necesitaran ser diseñados para el uso específico y desorden tratado.

En algunos métodos, dos o más agentes (por ejemplo anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión) son administrados simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada agente administrado cabe dentro de los rangos indicados. Los intervalos pueden ser irregulares como se indican al medir los niveles de saturación del receptor o al seguir otros indicios del proceso de la enfermedad.

Aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que aquellos niveles de dosis pueden variar como una unción

del agente específico, la severidad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos colaterales. Algunos de los agentes específicos son más potentes que otros. Las dosis preferidas para un agente dado son fácilmente determinables por aquellos expertos en la técnica por una variedad de medios. Uno de los medios preferidos son medir la potencia fisiológica de un agente dado.

INDICACIONES TERAPÉUTICAS

Las formulaciones de liberación controlada de la presente invención se pueden utilizar para obtener un amplio rango de efectos deseados. Particularmente las formulaciones de la invención son útiles para tratar esencialmente cualquier estado de enfermedad o síntoma que sea tratable mediante la administración a largo plazo de antiinflamatorios que apuntan a la inflamación patológica.

La invención también suministra métodos de tratamiento que explotan la capacidad de los agentes anti-alfa-4 para bloquear las interacciones dependientes de alfa-4. Las interacciones dependientes de alfa-4 con el ligando VCAM-1 sobre las células endoteliales son un evento temprano

en muchas respuestas inflamatorias, incluyendo aquellas del Sistema Nervioso Central. Las enfermedades y condiciones no deseadas que resultan de la inflamación y que tienen exacerbaciones clínicas agudas y/o crónicas incluyen esclerosis múltiple (Yednock et al., 1992 *Nature* 356:63; Baron et al., 1993 *J Exp Med.* 177:57) meningitis, encefalitis, ataque, otros traumas cerebrales, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) que incluye colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn (CD) (Hamman et al., 1994 *J. Immunol.* 152:3238), (Podolsky et al., 1993 *J. Clin. Invest.* 92:372), artritis reumatoide (Van Dinther-Janssen et al., 1991 *J. Immunol.* 147:4207; van Dinther-Janssen et al., 1993 *Annals Rheumatic Diseases* 52:672); Elices et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 93:405); Postigote al., 1992 *J. Clin. Invest.* 89:1445), asthma (Mulligan et al., 1993 *J. Immunol.* 150:2407) y comienzo de diabetes juvenil aguda (tipo 1) (Yang et al., 1993 *PNAS* 90:10494); Burkly et al., 1994 *Diabetes* 43:529) Baron et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 93:1700), AIDS demencia (Sasseville et al., 1994 *Am. J. Path.* 144:27); aterosclerosis (Cybulsky et al., 1991 *Science* 251:788-91, Li et al., 1993 *Arterioscler. Thromb.* 13:197) nefritis (Rabb et al., 1995 *Springer Semin. Immunopathol.* 16:417-25, renitis, dermatitis atópica, soriasis, isquemia del miocardio,

159

prostatitis crónica, complicaciones de la anemia celular falciforme, lupus eritematoso, y daño del pulmón mediado por leucocito agudo tal como ocurren en el síndrome de dolor respiratorio en adulto.

La enfermedad inflamatoria del intestino es un término colectivo para dos enfermedades similares denominada como enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerativa. El CD es una enfermedad inflamatoria ulceroconstrictiva ideopática, crónica caracterizada por involucramiento fuertemente delimitado y típicamente transmural se todas las capas de la pared del intestino mediante una reacción inflamatoria granulomatosa. Cualquier segmento del tracto gastrointestinal, de la boca al ano, se puede involucrar, aunque la enfermedad más comúnmente afecta el íleo terminal y/o colon: la colitis ulcerativa es una respuesta inflamatoria limitada grandemente a la mucosa colónica y submucosa.. Los linfocitos y los macrófagos son numerosos en las lesiones de la enfermedad inflamatoria del intestino y pueden contribuir al daño inflamatorio.

El asma es una enfermedad caracterizada por la respuesta creciente del árbol traqueobronquial a varios estímulos

que potencian la constricción paroxismal de las vías aéreas bronquiales. El estímulo causa la liberación de varios mediadores de inflamación provenientes de las células mástiles recubiertas con IgE que incluyen histamina, factores eosinofílicos y neutrofílicos quimiotácticos, leucotrilinos, prostaglandina y factor de activante de plaqueta. La liberación de estos factores recluta basófilos, eosinófilos y neutrofilos, que originan el daño inflamatorio.

La Ateroesclerosis es una enfermedad de arterias (por ejemplo coronaria, carótida. Aorta e iliaca). La lesión básica, el ateroma, consiste de una placa focal levantada dentro de la íntima, que tiene un núcleo de lípido y una capa fibrosa de cubierta. Los ateromas comprometen el flujo sanguíneo arterial y debilita las arterias afectadas. Los infartos de miocardio y cerebrales son la mayor consecuencia de esta enfermedad. Los macrófagos y los leucocitos son reclutados a los ateromas y contribuyen al daño inflamatorio.

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica, recurrente que origina primariamente el daño y la destrucción de las articulaciones. La artritis

reumatoide usualment³e afecta primero las articulaciones pequeñas de las manos y pies y luego puede involucrar las muñecas, codos, tobillos y rodillas. La artritis resulta de la interacción de las células sinoviales con leucocitos que se filtran desde la circulación dentro del recubrimiento interno sinovial de las articulaciones. Ver, por ejemplo, Paul, Immunology (3d ed, Raven Press, 1993).

Otra indicación para dosis crónicas de agentes anti alfa-4 es en el tratamiento del rechazo de órganos o injertos. Durante los años recientes ha habido una considerable mejora en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para el trasplante de tejidos y órganos tales como piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás el principal problema subsistente es la falta de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor al injerto u órgano trasplantado. Cuando las células alogénicas u órganos son trasplantados en un huésped (es decir el donador y el donante son individuos diferentes de las mismas especies), el sistema inmune del huésped probablemente monta una respuesta inmune a los antígenos extraños en el transplante (enfermedad de huésped versus injerto) conduciendo a la destrucción del

102

tejido trasplantado. Las células CD8⁺, células CD4⁺ y los monolitos están todas involucradas en el rechazo de los tejidos del trasplante. Los anticuerpos dirigidos a la integrina alfa-4 son útiles, inter alia, para bloquear las respuestas inmunes inducidas por aloantígeno en el donante evitando de esta manera que tales células participen de la destrucción del tejido u órgano trasplantado. Ver, por ejemplo, Paul et al., 1996 *Transplant Internacional* 9:420-425; Georczynski et al., 1996 *Immunol.* 87:573-580); Georczynski et al., 1995 *Transplant Immunol* 3:55-61); Yang et al., 1995 *Transplantation* 60:71-76); Anderson et al., *APMIS* 102:23-27.

Un uso relacionado para los agentes alfa-4 es modular la respuesta inmune involucrada en la enfermedad de "injerto versus huésped" (GVHD). Ver por ejemplo, Schlegel et al., *J. Immunol.* 155, 3856-3865 (1995). El GVHD Es una enfermedad potencialmente fatal que ocurre cuando las células inmunológicamente competentes intransferidas a un receptor alogénico. En esta situación, las células inmunocompetentes del donador pueden atacar los tejidos en el receptor. Los tejidos de la piel, el epitelio del intestino y el hígado son frecuentes objetivos y pueden

ser destruidos durante el curso del GVHD. La enfermedad presenta un problema especialmente severo cuando tejido inmune está siendo transplantado. Tal como en trasplante de médula ósea, pero GVHD menos severa también ha sido reportada en otros casos así como también, incluyendo trasplantes de corazón e hígado. Los agentes terapéuticos de la presente invención son utilizados, inter alia, para bloquear la activación de las células T del donador interfiriendo de esta manera con su capacidad para lisar células objetivo en el huésped.

Un uso adicional de agente anti alfa-4 de la invención es inhibir la metástasis de tumor. Varias células tumorales se han reportado por expresar integrina alfa-4 y anticuerpos a integrina alfa-4 han sido reportados por bloquear la adhesión de tales células a células endoteliales (Steinback et al., 1995 *Urol. Res.* 23:175-83); Orosz et al., 1995 *Int. J. Cancer* 60:867-71); Freedman et al., 1994 *Leuk. Lymphoma* 13:47-52) Okahara et al., 1994 *Cáncer Res.* 54:3233-6).

Un uso adicional de los agentes anti-alfa-4 es para tratar esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad auto inmune neurológica progresiva que

afecta un estimado de 250,000 a 350,000 personas en los Estados Unidos. La esclerosis múltiple se cree que es el resultado de una reacción auto inmune específica en la cual ciertos leucocitos atacan e inician la destrucción de la mielina, la cubierta aislante que cubre las fibras nerviosas. En un modelo animal para esclerosis múltiple, los anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra integrina alfa-4 beta-1 han mostrado bloquear la adhesión de leucocitos al endotelio, y así evitar la inflamación del Sistema Nervioso Central y la subsecuente parálisis en animales.

El ataque de MS puede ser dramático o ser medio como para no hacer que el paciente tenga atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad (en uno o más miembros, falta de claridad visual debido a neuritis óptica, disturbios sensoriales, diplopía, ataxia. El curso de la enfermedad puede ser estratificado en tres categorías generales: (1) MS recurrente, (2) MS progresiva crónica, y (3) MS inactiva. La MS recurrente se caracteriza por ataques recurrentes de la disfunción neurológica. Los ataques de MS generalmente evolucionan durante días a semanas y pueden ser seguidos por recuperación completa, parcial o sin recuperación. La

recuperación de los ataques generalmente ocurre en semanas a varios meses del pico del síntoma, aunque raramente alguna recuperación puede continuar durante dos o más años.

El MS progresivo crónico resulta en un empeoramiento gradualmente progresivo sin periodos de estabilización o remisión. Esta forma se desarrolla en pacientes con una historia anterior de MS recurrente, aunque en el 20% de los pacientes, no se presentan recurrencias. Las recurrencias agudas también pueden ocurrir durante el curso progresivo.

Una tercer forma es el MS inactivo. El MS inactivo se caracteriza por déficit neurológicos fijos de magnitud variable. La mayoría de los pacientes con MS inactivo tienen una historia temprana de MS recurrente.

El curso del MS también es dependiente de la edad del paciente. Por ejemplo, los factores de pronóstico favorables incluyen ataques tempranos (excluyendo niñez), curso recurrente y poca discapacidad residual 5 años después del ataque. Como contraste, la prognosis pobre se asocia con edad vieja de ataque (por ejemplo edad de 40 o

superior) y un curso progresivo. Estas variables son interdependientes, en razón a que la MS progresiva crónica tiende a iniciar a una edad más tardía que la MS recurrente. La discapacidad de la MS progresiva crónica es usualmente debida a la paraplejia progresiva o al cuadriplejia en pacientes individuales. En un aspecto de la invención, los pacientes preferiblemente serán tratados cuando los pacientes estén en remisión en lugar de en una etapa de recurrencia de la enfermedad.

El uso a corto plazo de hormona adrenocorticotópica (ACTH) o corticosteroides orales (por ejemplo prednisona oral o metilprednisolona intravenosa) es la única medida terapéutica específica para tratar pacientes con exacerbabción aguda de MS.

Nuevas terapias para MS incluyen tratar el paciente con interferón beta-1b, interferón beta-1^a, y copaxone® (anteriormente conocido como copolímero 1). Estas tres drogas no han mostrado una reducción significativa del índice de recurrencia de la enfermedad. Estas drogas son típicamente autoadministradas intramuscularmente o subcutáneamente.

Ninguno de los tratamientos habitualmente disponibles inhiben la desmielinización o MS. UN aspecto de la invención contempla tratar MS con agentes descritos aquí bien sea solos o en combinación con otras modalidades de tratamiento estándar. Las modalidades de tratamiento estándar incluyen pero no están limitadas a las siguientes. Modalidades de tratamiento adicionales no discutidas aquí para uso en el tratamiento de MS en combinación con el método y composiciones descritas aquí dependen del estado de la enfermedad en el paciente que sería evidente para el practicante experto. Tales modalidades de tratamiento adicional para MS diferentes a la inflamación patológica incluirían otros inmunomoduladores o inmunosupresores.

Los agentes y composiciones farmacéuticas discutidos supra pueden ser crónicamente administrados para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de los desórdenes inflamatorios listados previamente, incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, aterosclerosis, artritis reumatoide, rechazo de órgano o injerto y enfermedad de injerto versus huésped. En las aplicaciones de terapia, las composiciones son administradas a un paciente que se

sospecha o que ya sufre de tal enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos contrarrestar parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis terapéutica o farmacéuticamente efectiva.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas son crónicamente administrada a un paciente susceptible de o en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retraso en inicio de la enfermedad. Tal cantidad se define por ser una dosis profilácticamente efectiva. En pacientes con esclerosis múltiple en remisión, el riesgo puede ser evaluado mediante imágenes NMR, o, en algunos casos, mediante indicaciones presintomáticas observadas por el paciente.

Los regímenes de dosis efectivos de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las condiciones anteriormente descritas variará de pendiendo de muchos diferentes factores, incluyendo medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Así, las

dosis de tratamiento necesitarán ser tituladas para optimizar la seguridad y eficacia. En general cada administración del régimen de dosis variara desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg del peso del cuerpo del huésped. Un régimen de dosis preferido es 300 mg administrado una vez por mes durante un período de al menos 6 meses, más preferiblemente 12 meses y quizás durante el curso de varios años. Otro régimen de dosis que es preferido es 3 mg por kilogramo de peso del paciente por mes. Tal régimen puede ser preferible para pacientes pediátricos o adolescentes necesitados de la terapia.

TERAPIAS DE COMBINACIÓN

Los agentes de la invención anti alfa-4 pueden usarse con cantidades efectivas de otros agentes terapéuticos contra la inflamación aguda y crónica. Tales agentes incluyen otros antagonistas de moléculas de adhesión (por ejemplo, otras integrinas, selectinas, y miembros de la super familia de las inmunoglobulinas (Ig) (ver Sringer, 1990 *Nature* 346: 425-433; Osborn, 1990 *Cell* 62: 3; Inés, 1992 *Cell* 9: 11). Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas transmembrana que consisten en una cadena

α (120-180 kDa) y una cadena β (90-110 kDa), que tienen generalmente dominios citoplasmáticos cortos. Por ejemplo, tres importantes integrinas (esto es, LFA-1, Mac-1 y P150,95) tienen diferentes subunidades alfa, designadas como CD11a, CD11b y CD11c, y una subunidad común β designada como CD18. LFA-1($\alpha_L\beta_2$) se expresa sobre linfocitos, granulocitos y monocitos, y enlaza predominantemente a un receptor contrario miembro de la familia de Ig denominado ICAM-1 y a los ligandos relacionados. ICAM-1 se expresa sobre muchas células, incluidos leucocitos y células endoteliales, y es regulado sobre el endotelio vascular por citoquinas tales como la TNF y la IL-1. Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) se distribuye sobre neutrófilos y monocitos, y también se enlaza a ICAM-1. La tercera integrina β_2 , P150,95 ($\alpha_X\beta_2$), también se encuentra sobre neutrófilos y monocitos. Las selectinas consisten en L-selectina, E-selectina y P-selectina.

Otros agentes antiinflamatorios que pueden usarse en combinación con los agentes anti alfa-4 incluyen anticuerpos y otros antagonistas de citoquinas, tales como las interleukinas IL-1 hasta IL-13, los factores α y β de necrosis tumoral, interferones α , β y γ , el factor β de crecimiento tumoral (TGF- β por sus siglas en inglés),

el factor de estimulación de colonias (CSF por sus siglas en inglés) y el factor de estimulación de colonias granulocito monocito (GM-CSF por sus siglas en inglés). Otros agentes antiinflamatorios incluyen anticuerpos y otros antagonistas de quemoquinas tales como MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, exotaxina e IL-8. Otros agentes antiinflamatorios incluyen NSAIDS, esteroides y otras pequeñas moléculas inhibidoras de inflamación. Las formulaciones, rutas de administración y concentraciones afectivas de agentes para terapias combinadas son como se describió antes para los anticuerpos humanizados contra la integrina alfa-4.

Agentes adicionales para ser usados en combinación con agentes que median la integrina alfa-4, o dímeros que incluyen integrina alfa-4 y que tratan la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD por sus siglas en inglés), Enfermedad de Crohn (CD por sus siglas en inglés) y colitis ulcerativa (UC por sus siglas en inglés), incluyen pero no están limitadas a 5-aminosalicilatos, glucocorticoides, derivados de la tioguanina, metotrexato (MTX por sus siglas en inglés), ciclosporina, antibióticos e infliximab.

Los 5-aminosalicilatos incluyen sulfasalazina (también conocida como Azulfidina) que es un conjugado de mesalamina enlazada a sulfapiridina por medio de un enlace diazo, y se administra usualmente en una cantidad entre 500 mg/día y alrededor de 6 g/día. Los 5-aminosalicilatos pueden también ser co-administrados con un glucocorticoide. Preferiblemente, se usa un 5-aminosalicilato en terapia combinada con uno de los otros agentes discutidos aquí para tratar colitis ulcerativa, sin embargo, también puede ser usada para tratar la enfermedad de Crohn. Las formulaciones de mesalamina que no contiene sulfonamida, incluyen pero no están limitadas a, ASACOL®, CLAVERSA, SALOFALK, PENTASA®, DIPENTUM®, COLAZIDE y ROWASA®.

Los glucocorticoides han sido un soporte en el tratamiento de exacerbaciones severas agudas de IBD desde 1955, cuando fueron mostradas por primera vez como eficaces contra la UC. La prednisona oral puede administrarse junto con cualquiera de los agentes descritos aquí. Típicamente, se administran de 20 a 40 mg de prednisona oral una vez al día. Los glucocorticoides también pueden administrarse en forma intravenosa y por medio de enemas, en combinación con, o concurrentemente

con, o dentro de un corto período de tiempo antes / después de ser administrado un agente de integrina anti alfa-4. Por ejemplo, la hidrocortisona se encuentra disponible como un enema de retención (100 mg/60 mL), y la dosis usual es un enema de 60 mL por noche durante 2 a 3 semanas. Esto se puede modificar cuando se usa en combinación con las terapias y agentes discutidos aquí, como sería entendido por una persona normalmente entrenada. Otros esteroides que pueden ser utilizados incluyen, pero no se limitan a, metasulfobenzoato de prednisolona, pivalato de tixocortol, propionato de fluticasona, dipropionato de beclometasona, y budesonida.

Los derivados de tioguanina también son útiles en el tratamiento de IBD, CD y UC. Estos incluyen, pero no están limitados a 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina (IMURAN). Las dos drogas pueden usarse en forma intercambiada en combinación con cualquiera de los agentes moduladores de la integrina alfa-4 discutidos aquí.

Al metotrexato (MTX) también se lo contempla para su uso en combinación con los agentes reguladores de la integrina alfa-4 discutidos aquí. Preferiblemente, el MTX

se administra al sujeto por medio de una inyección intramuscular (i.m. por sus siglas en inglés), en combinación con un agente de integrina anti alfa-4. El MTX es efectivo con CD dependientes de esteroides, pero no tan útil con la UC. El MXT puede administrarse en cantidades alrededor de 15 a 25 mg por semana por sujeto, o como lo determine prudente la persona normalmente entrenada.

Las ciclosporinas (por ejemplo, SANDIMMUNE ®, NEORAL®) también pueden usarse en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 discutidos aquí, para tratar la inflamación patológica del intestino. Éste puede usarse para tratar UC severa y aguda, la cual no responde a los glucocorticoides.

Infliximab (esto es, REMICADE®) también puede usarse para tratar la CD, en combinación con los agentes moduladores de la integrina alfa-4 indicados aquí. Infliximab es una inmunoglobulina que se enlaza a la TNF con lo cual neutraliza su actividad. Otros anticuerpos anti TNF, tales como CDP571, pueden también usarse en combinación con los agentes moduladores de la integrina alfa-4 descritos aquí.

También se contempla el uso de antibióticos para ser usados en combinación con los agentes moduladores de la integrina alfa-4 indicados aquí, para modular la UC, la IBD y la CD. Por ejemplo, los pacientes pueden tratarse con metronidazol o con ciprofloxacina (o con equivalentes farmacológicos de los mismos), en combinación con un agente mediador de la integrina alfa-4 o en la forma de una mezcla.

También se contempla el uso de terapias de soporte para la IBD, la CD, y la UC junto con agentes que medien la integrina alfa-4 o dímeros que incluyan integrina alfa-4 y que traten la enfermedad inflamatoria del intestino, la Enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Las terapias de soporte incluyen, pero no se limitadas a, analgésicos, agentes anticolinérgicos y antidiarreicos. La combinación de tales terapias de soporte pueden ser útiles al comienzo del régimen de tratamiento para reducir los síntomas en el paciente y mejorar su calidad de vida. Las terapias de soporte incluyen la administración por vía oral de hierro, folato y vitamina B₁₂. Los agentes antidiarreicos incluyen, pero no están limitados a, difenoxilato, codeína, loperamida, y anticolinérgicos (o

equivalentes farmacéuticos de los mismos), los cuales pueden administrarse a pacientes con enfermedad leve para reducir la frecuencia de los movimientos intestinales y alivien la urgencia rectal. La colestiramina puede usarse en pacientes para prevenir la secreción colónica inducida de sales biliares, en pacientes que ya han sido sometidos a resecciones ileocólicas limitadas, previas al tratamiento con los regímenes crónicos descritos aquí. Los agentes anticolinérgicos incluyen, pero no están limitados a, bromuro de clidinio, clorhidrato de dicitlomina, tintura de belladona y similares, y que son útiles para reducir los calambres abdominales, dolor y urgencia rectal.

Para el tratamiento de MS, los agentes de integrina anti alfa-4 (por ejemplo, anticuerpos de integrina anti alfa-4, los antagonistas del pequeño compuesto de integrina alfa-4 y similares) pueden combinarse con otros compuestos o composiciones usadas para tratar, mejorar o mitigar los síntomas asociados con MS.

Otros agentes utilizados para tratar, mejorar o mitigar los síntomas asociados con MS, incluyen pero no están limitados a: relajantes musculares (por ejemplo,

② Diazepam, ciclobenzaprime, Clonazepam, clonidina, primidona, y similares), anticolinérgicos (por ejemplo, propanteline, diciclomina, y similares), estimulantes del sistema nervioso central (por ejemplo, Pemoline), agentes antiinflamatorios no esteroideos (NS tal como ibuprofén, naproxén y ketoprofén), interferones, inmunoglobulinas, glatirámero, (Copaxone®), mitoxantrone (Novantrone®), misoprostol, inhibidores del factor alfa de necrosis tumoral (por ejemplo, Pirfenidone, infliximab y similares) y corticosteroides (por ejemplo, glucocorticoides y mineralocorticoides).

③ Agentes comunes para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen interferón beta-1b (Betaseron®), interferón beta-1a (Avonex®), alta dosis de interferón beta-1a (Rebif), Glatiramer (Copaxone®), inmunoglobulina, mitoxantrone (Novantrone®), corticosteroides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona y similares). Otros corticosteroides también pueden ser usados, e incluyen pero no están limitados a, cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6α-metilprednisolona, triamcinolona, y betametasona.

Las formas de dosificación de los agentes a ser usados en combinación con los compuestos y composiciones descritas

aquí, variarían dependiendo del sujeto y combinación de drogas a ser utilizadas. Por ejemplo, los interferones son típicamente administrados como sigue: del interferón beta-1a (Avonex®) se administran 30 µg una vez a la semana; del interferón beta-1a se administran alrededor de 22 µg o 44 µg tres veces a la semana; y del interferón 1-b (Betaseron®) se administran 250 µg en día alternados (Durelli et al., *Lancet* 359: 1453-60, 2002). Típicamente los interferones se administran para recaídas o esclerosis múltiple remitente. Por lo tanto, en combinación con los agentes de integrina anti alfa-4 descritos aquí, los rangos preferidos de interferones pueden incluir desde alrededor de 0,1 µg hasta alrededor de 250 µg, y más preferiblemente desde alrededor de 0,5 µg hasta alrededor de 50 µg, dependiendo de la forma en la cual se administre el agente junto con los otros compuestos de integrina anti alfa-4 y composiciones descritas aquí.

Los NSAID o NS contemplados para ser usados con esta invención incluyen, pero no están limitados a, los inhibidores COX no selectivos y los inhibidores selectivos COX-2. Los inhibidores COX no selectivos, incluyen pero no están limitados a, derivados del ácido

salicílico (por ejemplo, aspirina, salicilato de sodio, trisalicilato de magnesio colina, salsalato, diflunisal, sulfasalazina, y olsalazina), derivados de para-aminofenol (por ejemplo, acetaminofén), ácido indol acético y ácido inden acético (por ejemplo, tolmetín, diclofenaco, y ketorolac), ácidos heteroaril acéticos (por ejemplo, abuprofén, naproxén, flurbiprofén, ketoprofén, fenprofén, y oxaprozín), ácidos antranílicos o fenamatos (por ejemplo, ácido mefenámico y ácido meclofenámico), ácidos enólicos (por ejemplo, oxicams tales como piroxicam y meloxicam), y alcanonas (por ejemplo, nabumetona). Los inhibidores selectivos COX-2 incluyen furanonas diaril sustituidas (por ejemplo, rofecoxib), pirazoles diaril sustituidos (por ejemplo, celecoxib), ácidos indol acéticos (por ejemplo, etodolac), y sulfonanilidas (por ejemplo, nimesulide). Los NS son a menudo suministrados en combinación con interferón para disminuir los síntomas similares a los de la gripe, que son experimentados por los pacientes que reciben, por ejemplo, Avonex®. Los agentes comunes NS incluyen naproxén, ibuprofén y ketoprofén. El paracetamol es también frecuentemente administrado a pacientes. Ver, Reess et al., 2002 *Mult. Scler.* 8: 15-8.

El acetato Glatirámero (GA, Copaxone®) es una molécula sintética que inhibe la activación de las células T reactivas a la proteína básica mielina y que inducen un repertorio de células T caracterizadas por efectos antiinflamatorios. Además, el Glatirámero puede acceder al sistema nervioso central (CNS por sus siglas en inglés), mientras que el interferón beta no puede hacerlo (Dhib-Jalbut, 2002 *Neurology* 58: S3-9; Weinstock-Guttman et al., 2000 *Drugs* 59: 401-10).

La mitoxantrona es un agente antracenodiona sintético, el cual ha mostrado ser efectivo para el tratamiento de la esclerosis múltiple progresiva secundaria (SP-MS por sus siglas en inglés). Sin embargo, el uso de esta droga está limitado nuevamente por su cardiotoxicidad acumulativa (Weinstock-Guttman et al., 2000).

El factor alfa de la necrosis tumoral (TNF- α por sus siglas en inglés) puede ser una citoquina clave en la demielinación (Walker et al., 2001 *Mult.Scler.* 7: 305-12). Por lo tanto, el uso de agentes que antagonicen a la función TNF- α o inhiban su síntesis, pueden ser útiles en combinación con los agentes y compuestos descritos aquí. Esto puede incluir a los anticuerpos anti TNF- α (por ejemplo, infliximab) así como a agentes tales como la

pirfenidona. La pirfenidona es una droga no péptido, la cual ha mostrado que reduce la síntesis de TNF- α y que igualmente bloquea los receptores del TNF- α .

El gran soporte en la mayoría de las condiciones desmielinizantes y las enfermedades ha sido el uso de ACTH, glucocorticoides y esteroides corticoides. Estos agentes son usados por sus efectos antiedema y antiinflamatorios. El ACTH se administra comúnmente a un sujeto en 80 U de forma intravenosa en 500 mL de dextrosa al 5% y agua, durante 6 a 8 horas por tres días. También puede ser administrado en forma intramuscular de 40 U/mL en una dosis de 40 U cada 12 horas por 7 días, reduciendo luego la dosis cada tres días. Ver, S. Hauser, "Multiple sclerosis and other demyelinating diseases," en *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2287-95 (13^{ava} edición, Isselbacher et al., ed. 1994). La metilprednisolona típicamente se administra lentamente en 500 mL D5W durante 6 horas, preferiblemente en la mañana. Igualmente, las dosis comunes incluyen 1.000 mg diarios durante 3 días, 500 mg diarios durante 3 días y 250 mg diarios durante 3 días. Una combinación de metilprednisolona-prednisona también se administra comúnmente. Típicamente se administran alrededor de 1.000

mg de metilprednisolona intramuscular durante tres días, seguida de prednisona oral en cantidad de 1 mg/kg por día durante 14 días. Así, para uso en combinación con los compuestos y composiciones descritas aquí, los esteroides pueden administrarse en cantidades que van desde alrededor de 1 hasta alrededor de 1.000 mg/kg durante alrededor de 1 a 14 días, de acuerdo con lo que se necesite.

Efectos secundarios en las condiciones de desmielinización tales como MS, son fatiga y la disminución de la función cognoscitiva. Agentes tales como el clorhidrato de amantadina y la pemolina han sido frecuentemente utilizados para tratar la fatiga asociada con MS (Geisler et al., 1996 *Arch Neurol.* 53: 185-8).

El beneficio de tal combinación de terapias es que estas pueden disminuir los efectos secundarios de la clase específica y del agente específico comúnmente encontrados con algunas de las drogas. Los efectos secundarios de clase específica del interferón-beta incluyen fiebre, escalofrío, mialgias, artralgias y otros síntomas como los de la gripe que comienzan 2 a 6 horas después de la inyección y que típicamente se resuelven 24 horas después

de la misma. Ocasiona^lmente, el interfe^rón-beta también induce el empeoramiento transitorio de los síntomas MS preexistentes. Los efectos secundarios de un agente específico incluyen la inyección -reacciones en el sitio con el interferón beta-1b. El manejo de estos efectos puede estar acompañado por el manejo de la dosis y el tiempo de administración, prescribiendo combinaciones apropiadas de acetaminofén, drogas antiinflamatorias no esteroidales (NS o NSAIDS) y esteroides. Ver Munschauer et al., 1997 *Clin. Ther.* 19: 883-93.

Por lo tanto, las combinaciones de drogas que puedan disminuir la cantidad administrada de una droga particular, pueden reducir los efectos secundarios adversos que experimenta un paciente.

Cuando se administra en combinación, los antagonistas del pequeño compuesto de integrina anti alfa-4 pueden administrarse en la misma formulación de estos otros compuestos o formulaciones, o en una formulación separada. Cuando se administran en combinación, los anticuerpos anti alfa-4, se hace generalmente en una formulación separada de los otros compuestos y composiciones. Cuando se administra en combinaciones, los

agentes anti alfa-4 pueden administrarse antes, enseguida, o en forma concurrente con los otros compuestos y composiciones usados para tratar, mejorar, o mitigar los síntomas.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a aquellas personas normalmente entrenadas en la técnica, una descripción y revelación completas de ejemplos representativos de cómo hacer y usar las modalidades de la presente invención, y no intenta limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni tampoco pretenden manifestar que los experimentos siguientes sean todos los que son, o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero algunos errores experimentales y desviaciones deberán ser justificados. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados, y la presión es o está cercana a la atmosférica.

EJEMPLO 1ENSAYO CONTROLADO DE NATALIZUMAB EN LA REINCIDENCIA DE LA
ESCLEROSIS MULTIPLEPoblación de Pacientes

Veintiséis centros clínicos en los estados Unidos, Canadá y el Reino Unido inscribieron a 213 pacientes desde septiembre de 1999 hasta mayo de 2000. la junta de revisión institucional, o los comités éticos locales o centrales aprobaron el protocolo. Todos los pacientes dieron su consentimiento escrito. La vigilancia del estudio corrió a cargo de un comité independiente para el seguimiento seguro de los datos.

Se solicitó que los sujetos elegibles tuvieran entre 18 y 65 años, con el criterio de Poser definido clínicamente o determinado el MS con ayuda del laboratorio, ya sea por remisión - reincidencia o por progreso secundario, (Poser et al., 1983 *Ann. Neurol.* 13: 227-31; Lublin et al., 1996 *Neurology* 46: 907-11), una historia de por lo menos dos recaídas dentro de los dos años anteriores, un nivel basal de Kurtzke Expanded Disability Status Score (EDSS) (Kurtzke, 1983 *Neurology* 33: 1444-52) entre 2 y

6,5, y un mínimo de tres lesiones sobre T₁ determinadas por MRI (por sus siglas en inglés) cerebral. Se excluyó a los pacientes si estos recibieron tratamiento inmunosupresor o inmunomodulador dentro de los últimos 3 meses, o experimentaron una recaída, o recibieron corticosteroides sistémicos dentro de los últimos 30 días.

Diseño del Estudio y Aleatorización

Los pacientes fueron asignados en forma aleatoria a uno de tres grupos de tratamiento: 3 mg/kg de natalizumab, 6 mg/kg de natalizumab o placebo, de acuerdo con un plan aleatorio en bloque generado por computador. Los pacientes recibieron seis infusiones intravenosas con intervalos de 28 días y luego tuvieron seis meses de seguimiento de seguridad. El investigador, todo el personal del estudio, y los pacientes desconocían la asignación del tratamiento.

Procedimientos del Estudio y Puntos Extremos

Los barridos cerebrales por MRI determinados sobre T₂ con densidad protónica disminuida y sobre T₁ mejorado por Gd,

se obtuvieron durante la fase de exploración (mes 1), inmediatamente antes de cada tratamiento (meses 0 a 5), y un mes después del último tratamiento (mes 6). Los barridos de seguimiento por MRI se obtuvieron a los 9 y a los 12 meses. Se obtuvieron 46 cortes axiales contiguos de 3 mm de espesor a través del cerebro. Los análisis por MRI se realizaron en un único centro, en forma ciega para los pacientes del tratamiento y para la historia. Las lesiones fueron identificadas sobre imágenes obtenidas en copia dura, por dos experimentados trabajadores clínicos en consenso.

La perspectiva primaria del éxito de la medida fue el número de nuevas lesiones que mejoran por Gd, durante el periodo de tratamiento de 6 meses, definido como el periodo de seguimiento desde la primera infusión hasta un mes después de la última infusión. Otros parámetros evaluados a partir de las MRI incluyeron: el número persistente de lesiones que mejoran por Gd (las lesiones mejoradas que también habían mejorado en el barrido mensual anterior); el volumen de lesiones que mejoran por Gd (medidas por un método de iniciación local semiautomático; Grimaud et al., 1996 *Magn. Reson. Imaging* 14: 495-505); el número de nuevas lesiones activas (esto

es, nuevas lesiones ^{que} mejoran por Gd, más las lesiones nuevas o aumentadas no mejoradas T₂); y el número de barridos activos (esto es, que contienen una o más nuevas lesiones que mejoran por Gd).

Las conclusiones clínicas incluyeron la frecuencia de las recaídas y los cambios en EDSS, y un auto reporte de la evaluación global utilizando una escala análoga visual (VAS por sus siglas en inglés). Todos los eventos adversos fueron registrados. Los pacientes fueron examinados en intervalos trimestrales programados, y en visitas no programadas por sospecha de recaídas, para el tratamiento y evaluación por neurólogos quienes fueron inadvertidamente asignados al tratamiento del paciente. El neurólogo tratante realizó una historia médica y un examen, y registró los eventos adversos. El neurólogo evaluador determinó el estado neurológico y asignó un puntaje EDSS sin conocimiento de la historia del paciente o puntajes EDSS anteriores.

Objetivamente una recaída fue definida como la ocurrencia de un episodio agudo de nuevos síntomas de MS o el empeoramiento de los mismos que duren al menos 48 horas siguientes a un período estable de al menos 30 días.

También estuvo acompañada por un incremento de al menos un punto en el puntaje del EDSS, un incremento de al menos un punto en dos puntajes del sistema funcional (FSS por sus siglas en inglés), o un incremento de al menos dos puntos sobre un FSS comparado con el nivel basal, como lo determinó el neurólogo que hizo la evaluación. Los síntomas neurológicos que no reunieron los anteriores criterios de una recaída, pero que fueron evaluados por el neurólogo tratante como constituyentes de una recaída, también fueron registrados (recaídas totales).

Sobre una escala análoga visual (VAS), los pacientes marcaron una ubicación a lo largo de una línea de 10 cm que reflejó la evaluación de su bienestar total al comienzo, y después de 3 y 6 meses de tratamiento, con altos puntajes que reflejan un mayor bienestar.

A los pacientes se les hizo seguimiento clínico hasta el mes 12. Aquellos que descontinuaron el tratamiento, pero que no alcanzaron la meta, fueron animados a retornar para evaluar el seguimiento.

Análisis Estadístico

El tamaño estimado de la muestra se basó en el número de nuevas lesiones que mejoran por Gd, que fueron observadas durante las primeras 12 semanas, después de la primera infusión en un ensayo clínico previo de natalizumab (Tubridy et al., 1999 *Neurology* 53: 466-72). Con base en los resultados de este ensayo previo, y usando un tamaño de muestra apropiado a la metodología para una comparación bilateral, bigrupo, con un nivel de significancia del 5%, con base en la estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney (Noether, 1987 *J. Amer. Stat. Assoc.* 82: 645-7), se calculó que aproximadamente 73 pacientes estaban necesitando en cada grupo una potencia del 80%.

La comparación primaria del número de lesiones que mejoran con Gd entre 6 mg/kg de natalizumab y placebo, así como los volúmenes de mejoramiento con Gd, fueron evaluados con la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los valores perdidos debido a uno o más barridos de MRI que no fueron realizados, fueron imputados reemplazando los valores perdidos con el número promedio de lesiones sobre los barridos disponibles de

ese paciente. Los barridos MRI obtenidos de pacientes que recibieron corticosteroides sistémicos dentro de los 30 días anteriores, fueron descartados y tratados como valores perdidos. La correlación estadística de Cochran-Mantel-Haenszel fue utilizada, usando puntajes igualmente espaciados para los grupos y rango de puntajes, para la variable exitosa primaria, para analizar la relación de respuesta a la dosis, tomando datos de los tres grupos.

La prueba de ji-cuadrado de Pearson fue utilizada para comparar la proporción de pacientes con recaídas. Los cambios en el nivel basal en EDSS y VAS, fueron analizados usando ANOVA de dos vías con centro de estudio y grupos de tratamiento como variables independientes.

Todos los análisis incluyeron a todos los pacientes en forma aleatoria y siguieron el principio de intención de tratamiento. Todos los valores P reportados tienen dos extremos. No hubieron diferencias significativas en las características demográficas, en la historia de la enfermedad MS, en la entrada EDSS, y en los parámetros MRI entre los tres grupos a nivel basal (Tabla 1).

**TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y DEL NIVEL BASAL
DE LOS PACIENTES TOMADOS EN FORMA ALEATORIA**

CARACTERÍSTICA	PLACEBO (N=71)	Natalizumab	
		3 MG/KG (N=68)	6 MG/KG (N=74)
Edad, años Media	42,9	42,8	44,9
Rango	22-66	22-65	30-63
Genero N (%) Masculino	25 (35,2)	21 (30,9)	15 (20,3)
Femenino	46 (64,8)	47 (69,1)	59 (79,7)
Categoría MS N (%) R-R	45 (63,4)	47 (69,1)	52 (70,3)
S-P	26 (36,6)	21 (30,9)	22 (29,7)
EDSS Media	4,40	4,21	4,32
Rango	2,0-6,5	1,0-6,5	0,0-6,5
Duración enfermedad	10,2	11,6	13,1
Media	1-32	0-40	2-39
Años			
Rango			
Número recaídas Media	3	2,9	3,1
en últimos 2 años Rango	2-12	2-10	2-8
Tiempo desde Media	6,5	7,2	6
última recaída Rango	2-17	2-24	2-22
en Meses			
Exploración de MRI determinadas sobre T₁ (Mes 1)			
Número (%) de barridos con una o más lesiones que mejoran por Gd	28 (40)	29 (43)	20 (40)

Número de lesiones cerebrales que mejoran por Gd			
Media	1,6	1,5	1,7
Rango	0-42	0-18	0-23
Nivel basal de MRI determinado sobre T₁ (Mes 0)			
Número (%) de barridos con una o más lesiones que mejoran por Gd	22 (31)	29 (43)	32 (43)
Número de nuevas lesiones cerebrales que mejoran por Gd			
Media	1,3	1,3	1,4
Rango	0-28	0-32	0-12

Resultado primario

Los pacientes en el grupo placebo exhibieron un promedio de 9,6 nuevas lesiones que mejoran por Gd durante el período de seis meses de tratamiento. Los valores correspondientes en los grupos que recibieron natalizumab fueron 0,7 para el grupo de 3 mg/kg ($P<0,0001$) y 1,1 para el grupo de 6 mg/kg ($P<0,0001$) (ver tabla 2). Esta diferencia constituyó una reducción del 93% y del 88% en las nuevas lesiones que mejoran por Gd para los grupos de

3 mg/kg y de 6 mg/kg, respectivamente. Una diferencia entre los grupos de tratamiento comparados con el placebo fue manifiesta después de la primera infusión (Fig.1).

TABLA 2: RESUMEN DE LA ACTIVIDAD MRI DURANTE EL TRATAMIENTO (MESES 1-6) Y SEGUIMIENTO (MESES 9 Y 12)

	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	VALOR P*
<u>Nuevas lesiones que mejoran M1</u>				
Media	9,6	0,7	1,1	(i) <0,0001
Mediana	2,0	0	0	(ii) <0,0001
Desviación Estándar SD	27,4	2,1	2,7	
<u>Lesiones que mejoran en forma persistente M1-6</u>				
Media	3,6	0,8	1,3	<0,0001
Mediana	1	0	0	
Desviación Estándar SD	6,5	1,9	2,6	
<u>Nuevas lesiones activas M1-6</u>				
Media	9,7	0,8	1,1	<0,0001
Mediana	2,0	0	0	
Desviación Estándar SD	27,4	2,2	3	
Barridos activos M1-6(%)	39%	9%	11%	(i) <0,0001 (ii) <0,0001
<u>Volumen de lesión que mejora M1-6 (mm³)</u>				
Media	1169,0	156	279,0	(i) 0,005
Mediana	266	0	0	(ii) 0,01
Desviación Estándar SD	2666	359,0	632,0	

<u>Nuevas lesiones que mejoran M9 y 12</u>				
Media	2,5	2,6	2,1	(i) 0,90
Mediana	1,0	0,5	0	(ii) 0,59
Desviación Estándar SD	4,37	4,58	4,96	
<u>Lesiones que mejoran en forma persistente M9 y 12</u>				
Media	0,2	0,1	0,1	0,029
Mediana	0	0	0	
Desviación Estándar SD	0,64	0,32	0,3	
<u>Nuevas lesiones activas M9 y 12</u>				
Media	2,7	2,8	2,3	0,424
Mediana	1,0	0,5	1,0	
Desviación Estándar SD	4,49	5,69	5,11	
Barridos activos M9-12(%)	42%	40%	35%	
<u>Volumen de lesión que mejora M9-12 (mm³)</u>				
Media	427,0	323	233	0,260
Mediana	88,0	31,0	0	
Desviación Estándar SD	797,0	591,0	686	

*(i) comparación del placebo vs. 3 mg/kg de

natalizumab; (ii) comparación del placebo vs. 6 mg/kg de natalizumab.

Resultados Secundarios del MRI

Hubo una significativa y marcada reducción en el número acumulado de lesiones que mejoran persistentemente,

nuevas lesiones activas, volumen total de lesiones que mejoran, y del porcentaje de barridos activos de los meses 1-6 (Tabla 2; Fig.2).

Resultados de la eficacia clínica

Durante el periodo de tratamiento de seis meses, se reportaron un total de 35 recaídas en 26 de los 71 pacientes de placebo; 18 recaídas se reportaron en 13 de los 68 pacientes que recibieron 3 mg/kg de natalizumab, y 15 recaídas se reportaron en 14 de los 74 pacientes que recibieron 6 mg/kg ($P=0,05$, placebo vs. todos los pacientes tratados con natalizumab). Aplicando el criterio más estrictamente objetivo sobre las recaídas, el efecto fue igualmente fuerte: 18 recaídas en 15 pacientes con placebo; 3 recaídas en 3 pacientes que recibieron 3 mg/kg de natalizumab; 8 recaídas en 8 pacientes que recibieron 6 mg/kg de natalizumab ($P=0,05$). Más recaídas en el grupo del placebo requirieron tratamiento con esteroides, que con los grupos con tratamiento (22 en placebo, 5 en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, y 7 en el grupo de 6 mg/kg de natalizumab, $P=0,007$, placebo vs. todos los pacientes tratados con natalizumab).

En el VAS, los pacientes en el grupo del placebo no reportaron cambios, mientras que aquellos en los grupos con natalizumab, reportaron un mejoramiento en su bienestar durante 6 meses, en cuyo lapso de tiempo la diferencia entre los grupos fue significativa ($P=0,033$, placebo vs. todos los pacientes tratados con natalizumab). No se observaron cambios significativos en EDSS en ninguno de los grupos durante el tratamiento.

Concentración de Anticuerpos y Saturación del Receptor

Se recolectaron muestras de suero de los pacientes en cada visita y se analizaron cuantitativamente los anticuerpos dirigidos específicamente contra el natalizumab, utilizando una enzima ligada al ensayo de inmunosorción (ELISA). También se midieron los niveles de natalizumab en el suero así como la ocupación del receptor por éste mismo, en un subgrupo de 12 a 14 pacientes por grupo de tratamiento, antes de cada infusión, y luego de 2 horas, 24 horas, 1,2 y 3 semanas después de la primera y de la última infusión.

Se determinaron las concentraciones de anticuerpo en el suero usando la prueba de ELISA. En resumen, se preparó una solución de 20 µg/mL de un anticuerpo de captura que enlaza específicamente con el natalizumab en una solución que contenía bicarbonato de sodio a un pH de 8,3. Se añadieron 100 µL de la solución del anticuerpo a cada pozo de una placa Costar de microtitulación de 96 pozos. La placa se cubrió con una cinta de sellamiento y se incubó a temperatura ambiente durante 12-36 horas. La placa se aspiró, y se añadieron a cada pozo 200 µL de solución amortiguadora de bloqueo (caseína al 0,25% en PBS, pH 7,4), y se incubó por una hora más a temperatura ambiente. Las placas fueron desecadas y almacenadas para un uso posterior, o se lavaron una vez con 300 µL de solución amortiguadora de lavado (TBS, pH 7,5 que contenía Tween-20 al 0,05%). Si las placas se desecaron, éstas fueron rehidratadas justo antes de ser usadas para añadirles los 300 µL de solución amortiguadora de lavado en cada pozo, y se incubaron durante 1-2 minutos. Las placas se aspiraron y se pusieron boca abajo sobre papel tissue para absorber el exceso de humedad.

Las muestras para análisis se diluyeron en caseína diluyente antes del ELISA (caseína al 0,25% en PBS, con

Tween-20 al 0,05%, pH 7,4). Típicamente son analizadas dos o tres soluciones de cada muestra, para asegurarse de la precisión de los valores de natalizumab. También se prepararon las muestras de control de dilución usando cantidades conocidas de natalizumab, para medir la precisión de las etapas restantes.

Se añadieron en cada pozo 100 μ L de estándar de referencia, la muestra de prueba, o la muestra de control de dilución, y se incubó la placa entre 60-75 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado y se removi6 la humedad residual. Se añadieron 100 μ L de fosfatasa alcalina conjugada de rat6n IgG4 anti humano, recientemente diluida, en cada pozo, y se incubaron las placas durante 60 minutos m6s a temperatura ambiente. Despu6s de la incubaci6n, las placas se lavaron cuatro veces con soluci6n amortiguadora de lavado, y se removi6 la humedad restante. Se añadieron 100 μ L de sustrato A fluorescente usando una pipeta multicanal calibrada, y se incubaron las placas durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Los niveles en cada pozo se determinaron usando un fmax Fluorescence Microplate Reader con el archivo de protocolo conc102.ppr del SOFTmax Pro Versi6n 1.3.1.

200

Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. Como se ve en ellas, los niveles de natalizumab disminuyeron entre las dosis, y entre los meses 7 a 8 (esto es, 2 a 3 meses después de la última dosis) los anticuerpos fueron indetectables en la mayoría de los pacientes.

Lo mismo que para la medición de la concentración de anticuerpos en el suero, durante el estudio de dosificación se determinaron los niveles de saturación del receptor, y específicamente los niveles de saturación de VLA-4, usando análisis FACS. La determinación de la saturación de VLA-4 se hizo por medio de un inmunoensayo indirecto utilizando citometría de flujo.

Se tomaron alícuotas aproximadamente de 1 mL de una muestra de sangre de un paciente, y se llevaron a dos tubos de polipropileno de 15 mL, a los cuales se añadió solución amortiguadora de lavado fría (suero humano [Scantibodies Laboratory, Inc. Part 3SH341] diluido al 3% en PBS) hasta la marca en el tubo de 14 mL. Los tubos se centrifugan a 2.200 rpm durante 5 minutos a 10-15°C, y el líquido es aspirado y descartado. La bolita de células se

201

resuspende en solución amortiguadora de lavado fría hasta un total de 1 mL.

Se preparan 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de un patrón estándar de referencia de natalizumab en solución amortiguadora de lavado. Se añaden 20 μL de este patrón diluido de natalizumab al primer tubo, 20 μL de solución amortiguadora de lavado al segundo tubo. Ambos tubos se incuban sobre hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Después de incubación, los tubos se llenan con solución amortiguadora de lavado hasta la marca de 14 mL, y se centrifugan a 2.200 rpm durante 5 minutos en frío. Se aspira el sobrenadante, y se repite la etapa de lavado una segunda vez. Después de este segundo lavado, las células se resuspendieron en solución amortiguadora de lavado hasta la marca de 1 mL.

Se añadieron 10 μL de R-Ficoeritrina (PE por sus siglas en inglés) conjugada anticuerpo CDw49d anti humano (Pharmlngen, Cat. 31475X) a cada tubo y se agitaron en vórtice suavemente. Los tubos se incubaron sobre hielo entre 2 y 8°C, se centrifugaron durante 5 minutos en frío, y se aspiró el sobrenadante para separarlo de la bolita de células. La bolita de células se resuspendió en 4 mL de solución amortiguadora de tinción fría, y los

tubos se centrifugaron nuevamente a 2.200 rpm en frío. El sobrenadante fue luego cuidadosamente removido, se añadieron 0,5 mL de una solución fijadora (Fijador de Ortho pH 7,6) y los tubos fueron inmediatamente agitados en vórtice para asegurar que las células se resuspendieran en el fijador. Los tubos se taparon con hoja de aluminio hasta el ensayo FACS.

Cada muestra fue entonces para saturación del receptor VLA-4, en las muestras con y sin el natalizumab analizado, utilizando el citómetro de flujo FACS Calibur y el software CellQuest™. El software CellQuest™ permite la adquisición y análisis de datos del citómetro de flujo.

Los niveles de saturación del receptor se muestran en la Figura 5. Los niveles de saturación del receptor para los meses 1 a 4 se determinaron antes de la dosis del mes. Los niveles de saturación del receptor producidos en los intervalos de dosificación de cada mes fueron consistentemente favorablemente altos, y estos niveles crónicos fueron suficientes para mantener una supresión de la inflamación patológica y asociada con los sellos fisiológicos de la enfermedad. En promedio, los niveles

de saturación se mantuvieron para un mes en una media de al menos 67% y una mediana de la menos 75%. Estos niveles fueron suficientes para la supresión de las lesiones del cerebro en los pacientes tratados (ver Figura 1). El nivel mínimo de saturación determinado en el estudio antes de la infusión entre los meses 2 a 5 (y la semana 21 después de la administración en el mes 5) es particularmente bajo comparado con los valores de la media y de la mediana debidos a un solo paciente con respuesta de anticuerpos al natalizumab.

Como los niveles de saturación del receptor descendieron en los pacientes, también lo hizo la eficacia del tratamiento. La media de los niveles de saturación del receptor del 42% y la mediana de los niveles de saturación del receptor del 41% de saturación del receptor en la población tratada, no se asociaron con la supresión de las lesiones del cerebro en la población de pacientes (Ver Figuras 2 y 5), y por lo tanto, es necesario un nivel de saturación crónico del receptor superior a éste, para una efectiva supresión de la inflamación patológica usando agentes tales como los inhibidores alfa-4.

Seguridad y Tolerabilidad

El tratamiento repetido con natalizumab, ya sea con una dosis de 3 o de 6 mg/kg, parece bien tolerado por los pacientes con MS después de un período de tratamiento de seis meses. Similar número de pacientes de cada grupo experimentó un tratamiento de emergencia por eventos adversos. Aunque no es significativo, ciertos eventos adversos ocurrieron más comúnmente con el natalizumab comparado con el placebo (Tabla 3). Se observó una linfocitosis moderada sostenida en los tratamientos con natalizumab, después del período de tratamiento de 6 meses.

Tabla 3: EVENTOS ADVERSOS MÁS COMÚNMENTE REPORTADOS EN LOS PACIENTES TRATADOS CON NATALIZUMAB VS. EL PLACEBO*

	PLACEBO (71)	3 MG/KG (68)	6 MG/KG (74)
Número total de pacientes con eventos adversos	68 (96%)	62 (91%)	70 (95%)
El cuerpo completo			
Infección	10 (14%)	14 (21%)	14 (19%)
Sistema digestivo			
Flatulencia	0	4 (6%)	0 (0%)

Sistema nervioso			
Parestesia Circumoral	1 (1%)	5 (7%)	2 (3%)
Sistema respiratorio			
Sinusitis	3 (4%)	7 (10%)	3 (4%)
Faringitis	8 (11%)	10 (15%)	15 (20%)
Piel y apéndices.			
Sarpullido	4 (6%)	6 (9%)	8 (11%)
Sistema urogenital			
Infección	10 (14%)	14 (21%)	11 (15%)

* Para ser incluido en la Tabla se requirió de una diferencia de al menos el 5% en la incidencia de eventos adversos entre el grupo del placebo y uno de los grupos con natalizumab.

No hubieron diferencias significativas en el número de eventos adversos serios (SAEs por sus siglas en inglés) reportados en los grupos placebo y con tratamiento (esto es, 7 pacientes tratados con placebo reportaron 11 SAEs, 5 pacientes que recibieron 3 mg/kg de natalizumab reportaron 5 SAEs, y 3 pacientes que recibieron 3 mg/kg de natalizumab reportaron 4 SAEs). De éstos, cuatro fueron considerados como inmunes y relacionados en el estudio de la droga. Hubo una reacción anafiláctica con urticaria y broncoespasmo en el grupo con 3 mg/kg, el cual fue rápidamente revertido con antihistaminas y tratamiento con esteroides. Hubieron tres reportes de

enfermedades causadas por la inoculación de un suero, uno en cada grupo incluido el del placebo. Solamente un evento estuvo acompañado por un cambio en los niveles de complemento, y todos ocurrieron en el mismo lugar de investigación. Entre todos, estos eventos comprometieron a menos de una por cada 250 infusiones.

No hubieron diferencias en el número de pacientes que descontinuaron el tratamiento debido a un evento adverso entre los grupos (esto es, 3 en el grupo del placebo, 4 en el grupo de 3 mg/kg, y 3 en el grupo de 6 mg/kg). Hubo una muerte en el estudio secundario por carcinomatosis pleural complicada por hemotórax en un paciente con placebo.

La tasa de formación de anticuerpos también fue evaluada. Entre todos, 15 pacientes tratados con natalizumab (11 por ciento) desarrollaron anticuerpos anti natalizumab: 13 durante el período de tratamiento, y 2 durante el período siguiente al post tratamiento. La relevancia clínica, si la hay, de la presencia de anticuerpos de anti natalizumab, no es conocida actualmente.

Las concentraciones máximas en suero de natalizumab fueron dosis dependientes y no se observó una acumulación significativa con dosificación repetida. Los pacientes que recibieron 3 mg/kg de natalizumab, mostraron una saturación mayor al 80% del receptor VLA-4 durante el período del tratamiento; la ocupación del receptor fue más alta (aproximadamente del 90%) y más prolongada en pacientes que recibían 6 mg/kg de natalizumab.

Seguimiento al post tratamiento: Meses 6 a 12

El número cumulativo de nuevas lesiones que mejoran y de barridos activos (meses 9 y 12 combinados) fue similar en los tres grupos (Tabla 2). Hubo una tendencia a menor actividad en el grupo de 6 mg/kg en el mes 9. No hubo una diferencia significativa en el número total de recaídas clínicas reportadas entre los tres grupos: 24 en el grupo del placebo, 24 en el grupo de los 3 mg/kg, y 26 en el grupo de los 6 mg/kg, o en el número de recaídas como se determinó por el criterio objetivo que se predefinió.

Este estudio es el primero en suministrar MRI sólidas y evidencia clínica en humanos de la inhibición selectiva de la adhesión y transporte de leucocitos mediado por

integrina alfa-4 y es una aproximación efectiva para el tratamiento crónico de MS. Ambos niveles de dosis de natalizumab del anticuerpo monoclonal humanizado específico de la integrina alfa-4, demostraron efectos estadísticos altamente significativos comparados con los del placebo en la supresión de las nuevas lesiones inflamatorias del cerebro que mejoran por Gd en pacientes con MS por encima del período de tratamiento de seis meses. Se observó una reducción de estas lesiones en los pacientes tratados con natalizumab un mes después de la primera infusión y se sostuvo a través del período de tratamiento. Para ambos niveles de dosis, la reducción fue aproximadamente del 90%, un efecto mayor que el porcentaje de reducción reportado del 50 al 70 por ciento con interferones beta (MS/MRI Análisis Group, 1995 *Neurology* 4: 1277-1285; jacobson et al., 1996 *Ann. Neurol.* 39: 285-294; y PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, 1998 *Lancet* 352: 1498-1504).

Además, los efectos del natalizumab sobre las MRI resultantes en esta prueba, están soportadas en observaciones clínicas. Este estudio no fue manejado con

anterioridad para mostrar efectos sobre resultados clínicos. Aún así, el tratamiento con natalizumab resultó en una reducción significativa en la tasa de recaídas y en una percepción del aumento de bienestar entre los pacientes. Cuando se consideran todos los reportes clínicos sobre las recaídas, ambos grupos tratados con natalizumab experimentaron significativamente menos recaídas que aquellos del grupo placebo durante los seis meses del tratamiento. Se observó también una significativa reducción de estos episodios usando los criterios predefinidos para las recaídas; una medida más estricta debido a que se requiere un cambio en los síntomas del objetivo. El efecto del natalizumab sobre las recaídas excede aquellas de los tratamientos actualmente aprobados para MS, los cuales muestran aproximadamente 30 por ciento de efecto (MS/MRI Análisis Group, *supra*; Jacobs et al., *supra*; PRISMS Study Group, *supra*; Jonson et al., 1995 *Neurology* 45: 1268-76).

En forma muy importante, no se observaron efectos que repercutan sobre las nuevas lesiones MRI o las recaídas en los grupos con natalizumab después de la terminación del tratamiento. Además, las infusiones mensuales de natalizumab durante seis meses, fueron bien toleradas, y

asociadas con un perfil de seguridad similar a la del placebo y aceptable para el tratamiento crónico de MS.

Los resultados de este estudio proporcionan además soporte para el papel de la integrina alfa-4, y las células inmunes que la expresan, en la patogénesis de las lesiones inflamatorias agudas del cerebro, en pacientes con MS. La reducción de las nuevas lesiones que mejoran por Gd, fue evidente después de un mes de tratamiento. Esta observación sugiere que el natalizumab actúa temprano en el desarrollo de la lesión, previniendo la aparición de nuevas lesiones.

En resumen, el natalizumab ha demostrado fuertes efectos sobre parámetros clínicamente significativos en este ensayo controlado del placebo, en pacientes con recaídas MS. La terapia fue bien tolerada durante este ensayo de seis meses. Los efectos benéficos del natalizumab sobre el surgimiento de nuevas lesiones inflamatorias CNS, la ocurrencia de recaídas clínicas y el mejoramiento en el bienestar de los pacientes observado en este estudio, indican el potencial para observar efectos sobre la desventaja en el largo plazo de los estudios actualmente en progreso.

EJEMPLO 2

ENSAYOS CONTROLADOS DEL NATALIZUMAB EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

Métodos

En un ensayo controlado doblemente a ciegas del placebo, 248 pacientes con enfermedad de Crohn (CD) activa en forma moderada o severa, recibieron en forma aleatoria dos infusiones de placebo o una infusión de 3 mg/kg de natalizumab seguida por un placebo; o dos infusiones de natalizumab de 3 mg/kg o 6 mg/kg, con un intervalo de 4 semanas. Los resultados de las mediciones incluyeron el índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (CDAI por sus siglas en inglés), calidad de vida relacionada con la salud (QOL por sus siglas en inglés), y niveles de proteína C-reactivas en suero.

El natalizumab incrementó las tasas de remisión clínica y de respuesta clínica, y mejoró la QOL en pacientes con CD activa, mientras demostraba un perfil de seguridad aceptable para el tratamiento de esta enfermedad.

Población de Pacientes

Después de recibir aprobación de los comités éticos locales, cada centro investigó pacientes femeninos y masculinos de al menos 18 años de edad que tenían evidencia clínica de CD activa de moderada a severa definida como un CDAI de al menos 220, pero menor que o igual a 450. De 311 pacientes investigados, 248 fueron repartidos en forma aleatoria entre treinta y cinco centros de estudio en Bélgica, la República Checa, Dinamarca, Alemania, Israel, los Países Bajos, Suecia, y el Reino Unido, entre septiembre de 1999 y agosto de 2000. Todos los pacientes que fueron informados, dieron su consentimiento escrito. Los pacientes que recibieron metotrexato, ciclosporina, o cualquier agente en investigación dentro de los tres meses anteriores fueron excluidos; los pacientes que reciben azatioprina o 6-mercaptopurina se les solicitó haber estado en una dosis estable al menos durante 4 meses. Otras exclusiones incluyeron tratamiento previo con anticuerpos; el uso actual de prednisolona oral en dosis mayores a 25 mg/día; el uso actual de una dieta elemental o nutrición parenteral; enfermedades infecciosas o neoplásicas del

intestino; cirugías del intestino dentro de los tres meses anteriores; presencia de una colostomía, ileostomía, o una colorectostomía con anastomosis ileorectal; síntomas debidos principalmente a la presencia de constricciones fibróticas; y la impresión clínica de que el paciente estaba cercano a requerir cirugía abdominal de emergencia.

Diseño del Estudio y Aleatorización

Los pacientes elegibles fueron asignados en forma aleatoria a uno de los cuatro regímenes de tratamiento de acuerdo con un plan aleatorio en bloque generado por computador. Cada grupo recibió dos infusiones intravenosas espaciadas en intervalos de 4 semanas. Los cuatro regímenes de tratamiento fueron dos infusiones de placebo; una infusión de 3 mg/kg de natalizumab seguida por infusión de placebo; y dos infusiones de 3 ó de 6 mg/kg de natalizumab. El investigador, todo el personal del estudio, y los pacientes desconocían la asignación del tratamiento.

Procedimientos del Estudio y Puntos Extremos

La eficiencia primaria del punto extremo fue la proporción de pacientes en remisión ($CDAI < 150$) en la semana 6. El CDAI incorpora ocho variables relacionadas: el número de evacuaciones líquidas o muy blandas por día, la severidad del dolor abdominal o retortijones, el bienestar general, la presencia de manifestaciones extra intestinales de enfermedad, la presencia de una masa abdominal, el uso de medicamentos antidiarreicos, hematocrito, y peso corporal (Best et al., 1976 *Gastroenterology* 70: 439-441; y Summers et al., 1979 *Gastroenterology* 77: 847-69). Puntuaciones menores de 150 indicaron remisión; puntuaciones entre 150 y 219 indicaron enfermedad activa leve, entre 220 y 450 indicaron enfermedad moderadamente activa, y puntuaciones mayores a 450 indicaron actividad severa. Puntos extremos adicionales en perspectiva fueron la proporción de pacientes que demostraron respuesta clínica (esto es, por lo menos una reducción de 70 puntos en CDAI), calidad de vida relacionada con la salud, como se midió por un cuestionario específico de enfermedad intestinal inflamatoria, el IBDQ (Irvine et al., 1994

Gastroenterology 106: 287-96), y niveles en suero de proteína reactiva-C.

Las evaluaciones seguras incluyen el registro de eventos adversos y el seguimiento de los laboratorios clínicos que fue dirigido a lo largo del estudio. Un comité independiente para el seguimiento seguro de los datos proporcionó un nivel adicional de acompañamiento. Las muestras de suero fueron recolectadas en cada visita y analizadas para anticuerpos contra natalizumab por un ensayo inmunsorbente ligado a una enzima (ELISA).

Análisis Estadístico

Todos los análisis de eficiencia utilizaron la última observación de la intención de tratamiento (ITT por sus siglas en inglés) que pasó a la siguiente población (LOCF por sus siglas en inglés), la cual comprendió a todos los pacientes manejados en forma aleatoria (n=248). Los pacientes usando medicamentos de socorro fueron clasificados como tratamientos malogrados. La población segura (n=244) comprendió a aquellos repartidos en forma aleatoria y que recibieron dosis. Cuatro pacientes no recibieron dosis debido a que no eran elegibles.

216

Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y con un nivel estadístico de significancia del 5%. Se realizaron tres pares de pruebas acertadas de cada tratamiento activo comparado con el placebo. Las tasas de respuesta y remisión fueron analizadas por la prueba de ji-cuadrado de Cochran-Mantel-Haenszel (asociación general) (Landis et al., 1978 *Int'l. Stat. Rev.* 46: 237-54) usando un país como estrato. El efecto de covariantes sobre la remisión y la repuesta (si o no) fue analizada en la semana 6 usando regresión logística.

El tamaño de muestra de 60 sujetos por grupo se calculó para proporcionar un 80 por ciento de potencia con un nivel de significancia del 5 por ciento para detectar una diferencia en tasas de respuesta asumiendo una tasa de respuesta del 40 por ciento en los grupos con natalizumab y un 15 por ciento de tasa de respuesta en el grupo del placebo.

El análisis de dos vías de los modelos de varianza con efectos fijos por país y por grupo de tratamiento, fue utilizado para comparar la forma en que el CDAI disminuye a partir del nivel basal. Se analizó el contraste de

comparar cada uno de los grupos de tratamiento activo con el grupo del placebo.

La proteína reactiva-C y los datos IBDQ fueron analizados usando la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, para comparar el cambio a partir del nivel basal entre cada uno de los tres grupos de tratamiento activo y el placebo. En un análisis planeado en prospectiva, fueron comparados los niveles de proteína reactiva-C, para los pacientes con un valor por encima del límite superior del rango normal de 8 mg/l del nivel basal (semana 0).

Resultados

Las características demográficas, los puntajes CDAI, el sitio de la enfermedad y los medicamentos, fueron comparables entre los grupos a nivel basal (Tabla 4). En el momento de la evaluación en la semana 0, la mayoría de los pacientes recibieron otros medicamentos para CD incluidos los compuestos 5-ASA (48 a 64 por ciento), esteroides orales (46 a 63 por ciento), o azatioprina / 6-mercaptopurina (18 a 37 por ciento) con o sin otros agentes. Veintisiete pacientes se retiraron del estudio antes de completar 12 semanas: 10 en el grupo del

placebo, y 6,5 y 6 en los grupos 3+0, 3+3, y 6+6 mg/kg de natalizumab, respectivamente.

TABLA 4: CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y MEDICACIONES EN NIVEL BASAL

 CARACTERÍSTICA	PLACEBO	3+0 MG/KG	3+3 MG/KG	6+6 MG/KG
Pacientes distribuidos en forma aleatoria	63	68	66	51
Edad media y rango(años)	34(18-68)	36(18-66)	36(19-64)	35(19-62)
Duración media de la enfermedad y rango(años)	8,9(0,3-64,3)	8,4(0,5-27,5)	8,1(0,5-22)	7,8(0,6-29)
Media del nivel basal del CDAI y rango*	300(186-447)	288(211-427)	298(219-442)	296(210-429)
Sitio de la enfermedad:				
Iliaca	15(24%)	9(13%)	17(26%)	12(24%)
Colónica	11(17%)	16(24%)	16(24%)	16(31%)
Ileocolónica	37(59%)	43(63%)	33(50%)	23(45%)
Género: Femenino	33(52%)	41(60%)	36(55%)	26(51%)
Peso medio y rango (kg)	68(42-100)	66(41-95)	64(44-97)	69(44-98)
Medicamentos				
Concomitantes				
No de medicamentos concomitantes* para la enfermedad de Crohn	12(19%)	11(16%)	9(14%)	5(10%)
Compuestos 5 ASA	30(48%)	40(59%)	42(64%)	30(59%)
Esteroides orales	31(49%)	31(46%)	37(56%)	32(63%)
Azatioprina o 6-MP (+/- esteroides)	2(3%)	25(37%)	17(26%)	9(18%)

*Ocho de los 248 pacientes tenían una puntuación del CDAI <220 en el nivel basal. Cinco de esos 8 pacientes eran elegibles (CDAI≥220) sobre la base de su exploración de

hematocritos, el cual era el valor disponible para la distribución aleatoria, pero tenía puntajes <200 cuando posteriormente se recalculó usando el nivel basal de los hematocritos. Los puntajes CDAI para los otros tres pacientes fue incorrectamente calculada al momento de la distribución aleatoria.

*5 ASAs, esteroides, o inmunosupresores.

Respuestas Clínicas, Remisiones, y Puntajes de la Media del CDAI

La proporción de pacientes que logran una respuesta clínica (esto es, al menos una reducción de 70 puntos en el CDAI a partir del nivel basal) fue estadísticamente significativamente mayor que para el placebo en los tres grupos del natalizumab en las semanas 4, 6 y 8 (Tabla 5 y Figura 6), y este efecto persistió hasta la semana 12 en los dos grupos que recibieron 2 infusiones de natalizumab. Se observó una tendencia a la mejora en las tasas de respuesta clínica tan pronto como en la segunda semana después del primer tratamiento, y el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab demostró una diferencia del placebo estadísticamente significativa para ese momento. Los resultados que muestran una disminución en los puntajes

de la media para el CDAI a partir del nivel basal (Tabla 6), están de acuerdo con las tasas de respuesta encontradas.

TABLA 5: TASAS DE REMISIÓN Y DE RESPUESTA CLÍNICA EN LA POBLACIÓN ITT

PUNTO DE PARTIDA	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG NATALIZUMAB (N=51)
REMISIÓN (CDAI<150)				
No. DE PACIENTES				
Semana 2	6(10)	10(15)	13(20)	6(12)
Valor P		0,328	0,127	0,745
Semana 4	9(14)	21(31)	19(29)	15(29)
Valor P		0,02	0,027	0,028
Semana 6	17(27)	20(29)	29(44)	16(31)
(punto extr.primario)				
Valor P		0,757	0,030	0,533
Semana 8	10(16)	19(28)	27(41)	22(43)
Valor P		0,107	<0,001	<0,001
Semana 12	17(27)	19(28)	28(42)	21(41)
Valor P		0,992	0,042	0,091
RESPUESTA (≥70 PUNTO DE INTERRUPCIÓN)				
No. DE PACIENTES (%)				
Semana 2	19(30)	31(46)	36(55)	22(43)
Valor P		0,081	0,004	0,136
Semana 4	18(29)	32(47)	41(62)	27(53)

Valor P		0,029	<0,001	0,006
Semana 6	24 (38)	40 (59)	47 (71)	29 (57)
Valor P		0,022	<0,001	0,039
Semana 8	22 (35)	38 (56)	44 (67)	28 (55)
Valor P		0,018	<0,001	0,028
Semana 12	27 (43)	34 (50)	40 (61)	33 (65)
Valor P		0,503	0,033	0,018

La negrilla resalta los resultados estadísticamente significativos cuando se compararon con el placebo.

TABLA 6: DISMINUCIÓN EN EL PUNTAJE DE LA MEDIA DEL CDAI A PARTIR DEL NIVEL BASAL

PUNTO DE PARTIDA	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG NATALIZUMAB (N=51)
DECRECIMIENTO DE LA MEDIA EN EL PUNTAJE DEL CDAI A PARTIR DEL NIVEL BASAL (SD)				
Semana 2	39,3 (73,5)	63,5 (74,8)	80,0 (68,9)	60,5 (68,3)
Valor P vs. placebo		0,061	0,001	0,103
Semana 4	37,3 (88,8)	79,9 (89,5)	100,7 (76,4)	84,2 (90,5)
Valor P vs. placebo		0,004	<0,001	0,003
Semana 6	49,3 (97,8)	81,5 (86,1)	119,4 (79,1)	97,2 (94)
Valor P vs. placebo		0,042	<0,001	0,004
Semana 8	49,7 (99,5)	82,4 (87,2)	117,8 (90,7)	106,9 (102,9)

Valor P vs.

placebo		0,053	<0,001	0,001
Semana 12	63,1(103,9)	70,1(91,7)	119,2(111)	112,5(96,4)

Valor P vs.

placebo		0,729	0,001	0,008
---------	--	-------	-------	-------

La disminución a partir del nivel basal se define como
(semana 0 - semana n).

SD = desviación estándar

La negrilla resalta los resultados estadísticamente
significativos cuando se compararon con el placebo.

Cuatro semanas después del primer tratamiento, y antes de que los pacientes recibieran el segundo tratamiento, los tres grupos del natalizumab tenían una tasa de remisión estadísticamente significativamente alta comparada con la de los pacientes en el grupo del placebo (Tabla 5 y Figura 7). Sin embargo, en la semana 6, el punto extremo primario definido en forma prospectiva, la proporción de los pacientes en remisión clínica, era estadísticamente significativamente mayor solamente en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab comparado con el placebo. En la semana 8, los dos grupos que recibieron las dos infusiones d natalizumab (ya sea 3 o 6 mg/kg) demostraron tasas de remisión estadísticamente significativamente altas comparadas con el placebo. En la semana 12, el

grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab continuó demostrando un beneficio estadísticamente significativo sobre el placebo con respecto a la remisión clínica, mientras que el grupo de 6+6 mg/kg demostró una fuerte tendencia de beneficio sobre el placebo con este resultado.

Pronosticadores de Remisión o de Respuesta

Usando los resultados de la semana 6, se llevó a cabo un análisis para identificar las variables del nivel basal que puedan predecir una remisión o una respuesta clínica. Las variables examinadas incluyeron el sitio de la enfermedad, la duración de la enfermedad, los puntajes del CDAI del nivel basal, el uso concomitante de esteroides orales, el uso concomitante de azatioprina o 6-mercaptopurina, y los síntomas extraintestinales. El puntaje del CDAI del nivel basal fue un pronosticador de remisión significativo ($P < 0,001$); los pacientes con un nivel basal mayor del CDAI tenían una menor probabilidad de lograr remisión. Sin embargo, el nivel basal del CDAI no predijo la probabilidad de respuesta. Ninguna de las otras variables analizadas fueron pronosticadores significativos de remisión o de respuesta.

Calidad de Vida

Se observó un mejoramiento estadísticamente significativo en los puntajes de la media de IBDQ, en todos los grupos de tratamiento con natalizumab en la semana 6, comparado con el placebo. Para la semana 12, solamente los grupos de tratamiento que recibieron dos infusiones de natalizumab continuaron teniendo puntajes de IBDQ que eran significativamente mayores que los del grupo del placebo (Tabla 7).

TABLA 7: PUNTAJES DE LA MEDIA DE IBDQ

PUNTO DE PARTIDA	PLACEBO (N=63)	3+0 MG/KG NATALIZUMAB (N=68)	3+3 MG/KG NATALIZUMAB (N=66)	6+6 MG/KG NATALIZUMAB (N=51)
PUNTAJE IBDQ, MEDIA (RANGO)				
Semana 0	130 (66-192)	130 (52-188)	136 (79-194)	123 (55-194)
Semana 6	142 (61-219)	157 (81-221)	163 (99-211)	155 (67-224)
Valor P		0,008	<0,001	<0,001
Semana 12	145 (61-217)	151 (81-221)	163 (86-221)	153 (64-215)
Valor P		0,486	0,021	0,014

225

La negrilla resalta las mejoras en el puntaje del IBDQ cuando se los comparó con cada nivel basal de tratamiento.

Proteína reactiva-C

Los pacientes que habían elevado los niveles de proteína reactiva-C en el nivel basal, recibieron evaluación periódica de los mismos durante la prueba. Aquellos que recibieron dos infusiones de natalizumab mostraron una declinación significativa a partir del nivel basal de los niveles en suero de la proteína reactiva-C, comparado con los pacientes en el grupo placebo (Figura 8). La mejora se mantuvo durante las 12 semanas en pacientes que recibieron dos infusiones de 3 mg/kg de natalizumab.

Seguridad y Tolerabilidad

El tratamiento con natalizumab en todos los niveles de dosis fue bien tolerado durante las 12 semanas del período de estudio. Un número similar de pacientes de cada grupo se retiró del estudio por eventos adversos (esto es, 2 en el grupo del placebo, 1 en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, 2 en el grupo de 3+3 mg/kg de

natalizumab, y 3 en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab). En total, 31 pacientes reportaron eventos adversos serios durante la fase principal del estudio (esto es, 9 en el grupo del placebo, 8 en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, 8 en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab, y 6 en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab). No se evaluaron eventos adversos serios relacionados con la droga en estudio, y ninguno fue fatal; la mayoría de ellos fueron hospitalizados por complicaciones o por síntomas asociados con CD. El número de pacientes que experimentaron un tratamiento de emergencia por efectos adversos fue similar en los diferentes grupos de tratamiento: 52 (83 por ciento) en el grupo placebo, 51 (78 por ciento) en el grupo de 3 mg/kg de natalizumab, 57 (88 por ciento) en el grupo de 3+3 mg/kg de natalizumab, y 41 (80 por ciento) en el grupo de 6+6 mg/kg de natalizumab. La Tabla 8 muestra eventos adversos no relacionados con CD con una incidencia al menos 5 por ciento mayor en un grupo del natalizumab, comparado con el grupo placebo. Ninguno de estos diversos tipos de eventos adversos fue estadísticamente significativamente diferente del placebo, y no se considera que ninguno presente un perfil de seguridad

227

inaceptable por el uso de natalizumab en pacientes con CD moderada o severa.

TABLA 8: EVENTOS ADVERSOS NO RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD DE CROHN, CON UNA INCIDENCIA <5% SOBRE EL PLACEBO Y OTROS EVENTOS DE INTERÉS

TERMINO PREFERIDO	PLACEBO N=63 (%)	3+0 N=65	3+3 N=65	6+6 N=51
Dolor de pecho	0 (0)	2 (3)	2 (3)	4 (8)
Conjuntivitis	0 (0)	2 (3)	5 (8)	0 (0)
Vértigo	0 (0)	6 (9)	3 (5)	0 (0)
Fiebre	1 (2)	4 (6)	3 (5)	4 (8)
Síndrome de gripe	6 (10)	9 (14)	7 (11)	10 (20)
Dolor de cabeza	20 (32)	19 (29)	27 (42)	14 (27)
Dolor	4 (6)	4 (6)	4 (6)	11 (22)
Sinusitis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
OTROS EVENTOS:				
Reacción a la infusión*	0 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (2)
Pts con anticuerpos anti natalizumab	0 (0)	8 (13)	4 (6)	1 (2)

* Lleva a interrupción o cesación de infusión.

Se detectaron anticuerpos anti-natalizumab en 13 pacientes tratados con natalizumab (7 por ciento) en la semana 12. En general los pacientes con anticuerpos anti-natalizumab detectables no tuvieron más posibilidad de experimentar un evento adverso o evento adverso serio que aquellos que no tuvieron anticuerpos anti-natalizumab.

Dos pacientes experimentaron reacciones de infusión; en ambos, el evento ocurrió durante la segunda infusión. Un paciente en el grupo natalizumab 3+3 mg/kg experimentó síntomas de prurito suave y eritema, y posteriormente se encontró ser positivo para anticuerpos anti-natalizumab. Un paciente en el grupo natalizumab 6+6 mg/kg experimentó síntomas de prurito suave y tos. Estos síntomas se resolvieron sin tratamiento, y posteriormente se encontró ser negativo para anticuerpos anti-natalizumab.

Aunque el punto terminal de la eficacia primaria definida anticipada (remisión clínica definida como CDAI<150 en la semana 6) fue significativa estadísticamente superior al placebo solo para el grupo natalizumab 3+3 mg/kg, se observó un beneficio significativo sobre el placebo para

este resultado en 4 puntos de tiempo separados para el grupo (semanas 4, 6, 8, y 12) y dos puntos de tiempo para el grupo 6+6 mg/kg (semanas 4 y 8, con una tendencia al beneficio en la semana 12). Combinado con los resultados que las proporciones de pacientes que experimentaron una respuesta clínica (definido como al menos una gota del punto 70 en CDAI de la información de base) fue significativamente superior al placebo para todos los tres grupos natalizumab en los puntos de tiempo de la semana 4, 6 y 8, y en el punto de tiempo de la semana 12 para los dos grupos de tratamiento que recibieron dos infusiones de tan, estos datos suministraron fuerte evidencia para la eficacia del natalizumab en el tratamiento de CD moderado a severamente activo. Además, los efectos benéficos del natalizumab sobre la respuesta clínica y las tasas de remisión basadas en mejoras en el CDAI se corroboraron mediante mejoras significativas la salud relacionadas con QOL, medidas por el IBDQ, y mejoramiento en suero de proteína reactiva C, un reactivo de fase aguda para cuantificar la inflamación generalizada..

Los niveles de dosis de saturación del receptor en el encado CD son comparables a las dosis del ensayo MS, y

así los niveles de saturación del receptor deben ser comparables en el ensayo CD. Los niveles de saturación del receptor en el ensayo CD son así asociados con niveles de decrecimiento de la inflamación, como se demostró mediante los niveles de proteína reactiva C y en la mejora total del bienestar del paciente, como se demostró mediante el CDAI.

No se identificaron inquietudes de seguridad serias para cualquiera de los grupos de tratamiento. El porcentaje de pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-natalizumab fue bajo, y no hubo eventos adversos serios asociados con anticuerpos anti-natalizumab.

El presente estudio suministra evidencia que impone la efectividad y tolerabilidad del antagonismo de la integrina alfa-4 mediante el natalizumab en el tratamiento de los signos y síntomas clínicos de CD activo moderado o severo. Adicionalmente, la evidencia de estos datos suministra que el antagonismo de la integrina alfa-4 es un mecanismo efectivo para tratar CD eleva la posibilidad de que esta modalidad puede ser más ampliamente aplicable al tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

EJEMPLO 3

EL EFECTO DEL NATALIZUMAB SOBRE LA CIRCULACIÓN DE
LEUCOCITOS ACTIVADOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL
INTESTINO

El tráfico de subconjuntos de leucocitos está implicado en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Debido a que las integrinas alfa-4 son mediadores clave de migración a través del endotelio vascular, es que ellos se expresan en todos los leucocitos excepto los neutrófilos, los efectos de una infusión de natalizumab 3 mg/kg sencilla (Antegren®) sobre los subconjuntos de leucocitos base que circula, células asesinas naturales (NK) y células T activadas en pacientes activos con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). También se ha visto previamente que una infusión sencilla de 3 mg/kg de natalizumab produjo un incremento sostenido de los leucocitos de la sangre que circulan por la periferia en animales y voluntarios saludables ("un estudio de toxicidad intravenosa semanal durante seis meses con Antegren™ en monos cynomolgous con recuperación de seis semanas", *Athena Report* 1998, No.

723-013-098). Sin embargo, era desconocido si natalizumab podía tener efectos diferenciales sobre los subconjuntos de leucocitos, dado que todos los leucocitos excepto los neutrófilos expresan las integrinas alfa-4.

Métodos

Los leucocitos extraídos de la sangre periférica de 30 pacientes con la enfermedad de Crohn (CD; 18 natalizumab, placebo 12) y 10 con colitis ulcerativa (UC; todos recibieron natalizumab - sin placebo) pre-, 1-, 2-, 4-, 8- y 12- semanas post infusión fueron analizados mediante el separador de células activado por fluorescencia (FACS). Los niveles de suero natalizumab y los resultados de actividad de la enfermedad fueron medidos en cada punto de tiempo.

Comparado con la línea basal ($p < 0,05$) y correlaciones se ensayaron mediante los ensayos Wilcoxon y Spearman respectivamente. La prueba Wilcoxon de los signos para análisis de cambios en subconjuntos de leucocitos se comparó con la línea basal dentro de los grupos de tratamiento ($p < 0,005$ denota significancia). Se utilizó el coeficiente de correlación por rangos de Spearman para

evaluar la correlación entre los parámetros de actividad de la enfermedad, los niveles de natalizumab y los subconjuntos de leucocitos en aquellos pacientes que reciben natalizumab.

La sangre venosa fue tomada inmediatamente antes para infusión de natalizumab/placebo y de nuevo en una, dos, cuatro, ocho y doce semanas post-infusión. El método Lymphoprep[™] (Nycomed, Dinamarca) se utilizó para aislar los linfocitos de la sangre periférica (PBLs) antes de análisis mediante separador de células activado por fluorescencia multi-color (FACS; Becton Dickinson, Oxford, UK) en conjunción con el software Consort 30 (Amlot et al., 1996 *Clin. Exp. Immunol.* 105: 176-82). Los porcentajes de PBL que expresan los siguientes marcadores se midieron utilizando análisis FACS: CD19 (célula B), TCR $\alpha\beta$ (célula T), CD3 (célula pan-T), TCR $\gamma\delta$ (célula T), CD4 (célula T auxiliar/Th-1), CD8 (célula T citotóxico/supresor) y CD16 (célula NK).

Los porcentajes de células TCR $\alpha\beta$ que expresan la activación de antígenos CD38, CD25 (cadena α de receptor de interleucina-2), CD26, CD69 y HLA-DR se midieron,

adicionalmente al naive (CD45RA) y memoria (CD45RO) subconjuntos de células T y "células T-NK" (CD57⁺/CD3⁺). El porcentaje de células T citotóxicas/supresoras (CD8⁺) que expresan la activación de los antígenos CD28 y HLA-DR también se midieron.

② **Resultados.** Los conteos de Eosinófilo, monocito, células B y T todos se elevaron significativamente para ≥ 1 semana post-natalizumab. Los conteos totales de linfocitos, tanto de células B y T, se incrementaron significativamente con respecto a los niveles de la línea basal. Los conteos de neutrófilos y basófilos no se cambiaron. Las células T que expresan los marcadores de activación CD25, CD26, HLA-DR, CD8DR, CD8, CD28, CD45RO y CD45RA se elevaron significativamente con respecto a la línea basal en ≥ 4 y 1 semana en pacientes con UC y CD respectivamente. Las células T CD38⁺ y CD69⁺ se incrementaron en >1 semana solo en pacientes con UC. Las células NK no fueron cambiadas post-infusión en todos los pacientes y las células T tipo NK (CD57⁺) se incrementaron en 1 semana solo en pacientes con CD. No se encontraron cambios significativos en células T gamma delta ($\gamma\delta$) en pacientes con CD/UC. Los cambios en los

subconjuntos de células no se correlacionó con la actividad de la enfermedad o los niveles de suero natalizumab. No se detectaron cambios en leucocitos encontrados post-natalizumab luego del placebo.

Los conteos de linfocitos seguían elevados a 4 semanas de post-infusión tanto en pacientes con enfermedad de Crohn ($p=0,002$) como en aquellos pacientes con colitis ulcerativa ($P=0,02$), antes de volver a los valores de pretratamiento en la semana 8 (Gordon et al., 2002 *Aliment. Pharm. & Ther.* 16: 699-706; y Gordon et al., 2001 *Gastroenterology* 121: 268-74).

El efecto del natalizumab sobre los eosinófilos y monocitos que circulan se muestra en las figuras 9A y 9B. Se observaron los conteos neutrófilo y basófilo para permanecer sin cambio en todos los grupos de pacientes estudiados. Las figuras 10 y 11 demuestran los efectos de la administración del natalizumab sobre los subconjuntos de células T específicos que circulan y las células asesinas naturales en pacientes con la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Las barras de error denotan estándares de desviación en cada gráfico.

No se detectaron cambios significativos en subconjuntos de leucocitos básicos luego de la infusión de placebo. La Administración del placebo a los 11 pacientes placebo se muestra en la tabla 9. Algunos cambios en linfocitos que expresan antígenos de activación se detectaron solo en puntos de tiempo aislados en pacientes con la enfermedad de Crohn (Tabla 10).

Tabla 9:

SUBCONJUNTO DE LEUCOCITOS EN PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE CROHN TRATADOS CON PLACEBO

Sub conjunto de células $\times 10^6/\text{mL}$	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 4		Semana 8	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Linfocitos	.60	.33	.55	.36	.82	.67	.48	.29	.51	.31
Neutrófilos	.21	.75	.18	.48	.86	.36	.61	.26	.91	.15
Eosinófilos	.19	.16	.17	.13	.15	.13	.20	.12	.14	.10
Basófilos	.19	.30	.14	.09	.09	.07	.09	.03	.08	.05
Monocitos	.60	.33	.55	.36	.82	.67	.48	.51	.29	.31

Tabla 9 Media (SD) valores de subconjunto de leucocito post-placebo; no hay diferencias significativas comparadas con cualquier grupo comparado con los valores de la línea basal (semana 0).

Tabla 10:

MARCADORES DE CÉLULAS T Y NK EN PACIENTES CON LA
ENFERMEDAD DE CROHN TRATADOS CON PLACEBO

Subconjunto De células por 10 ⁶ /ml	Semana 0 Media SD		Semana 1 Media SD		Semana 2 Media SD		Semana 4 Media SD		Semana 8 Media SD		Semana 12 Media SD	
Linfocitos	,36	,57	,12	,57	,83	,08	,34	,98	,28	,74	,62	,84
TCR αβ	,99	,53	,81	,56	,28	,88	,98	,84	,95	,79	,17	,81
CD25+	,18	,11	,12	,07	,27	,22	,17	,17	,18	,15	,22	,17
CD26+	,49	,32	,38	,27	,80	,61	,54	,49	,54	,55	,58	,43
CD45RA+	,74	,41	,57	,39	,95	,69	,68	,59	,68	,57	,84	,56
CD45RO+	,42	,20	,31	,18	,50	,27	,39	,24	,42	,35	,50	,33
CD38+	,42	,29	,31	,23	,46	,38	,35	,27	,33	,25	,40	,25
CD69+	,14	,20	,67	,71	,13	,12	,05	,04	,12	,22	,10	,08
HLA-DR+	,19	,10	,15	,08	,25	,20	,16	,11	,17	,10	,22	,16
CD8+	,11	,09	,09	,06	,16	,15	,09	,07	,08	,05	,12	,11
CD8+CD28+	,21	,11	,16	,11	,30	,20	,22	,21	,20	,18	,23	,14
CD8+DR+	,11	,09	,09	,06	,16	,15	,09	,07	,08	,05	,12	,11
CD57+CD3+	,08	,06	,06	,05	,10	,10	,07	,04	,07	,05	,10	,15
CD16+CD3	,11	,09	,12	,09	,16	,18	,09	,04	,12	,12	,17	,19
TCRγδ+	,11	,16	,08	,09	,18	,28	,10	,13	,09	,09	,11	,10
KappaMAb+	,02	,02	,03	,05	,05	,08	,07	,09	,03	,04	,10	,01

Tabla 10 Las columnas muestran conteos medios (SD) de subconjuntos de células T y células tipo NK estudios de placebo de pacientes con enfermedad de Crohn comparados con los valores (Prueba Wilcoxon de los signos; $p < 0,05$). Diferencias significativas compradas con la línea basal se muestran en negrilla. Las desviaciones

estándar para cada media se muestran en números en cursiva.

No hubo correlación significativa entre los conteos de linfocitos totales y los resultados de la actividad de la enfermedad en ya sean pacientes con enfermedad de Crohn o pacientes con colitis ulcerativa. (Tablas 11 y 12), ni se encontró ninguna correlación significativa entre subconjuntos de linfocito individuales y actividad de la enfermedad. No se detectó correlación significativa entre niveles de suero natalizumab y cambios en subconjuntos de leucocitos en una, dos o cuatro semanas post-infusión. El natalizumab fue no detectable en casi todos los pacientes en ocho semanas. Así las correlaciones no se calcularon para este punto de tiempo.

Tabla 11:

VALORES SPEARMAN R QUE COMPARAN LOS SUBCONJUNTOS
LINFOCITO Y LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

Subconjuntos	Enfermedad de Crohn			Colitis Ulcerativa		
	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 1	Semana 2	Semana 4
Linfocitos	0,16	-0,37	-0,01	-0,63	-0,19	0,03
TCR $\alpha\beta$	0,26	-0,29	0,05	-0,59	-0,39	0
CD 25	0,44	0,07	0,13	-0,39	-0,46	0,17
CD 26	0,31	-0,22	-0,11	-0,39	-0,29	0,10
CD 45 RA	0,29	-0,25	0,19	-0,54	-0,30	0,51
CD 45 RO	0,32	-0,27	0,34	0,18	-0,17	-0,05
CD38	0,31	-0,08	0,01	-0,57	0,03	-0,05
CD 69	-0,32	0,12	0,12	-0,15	0,28	0,12
HLA-DR	0,19	-0,05	-0,01	0,12	-0,13	0,15
CD8CD28	0,01	-0,17	-0,13	-0,18	-0,04	-0,17
CD8DR	0,11	-0,19	-0,18	-0,1	0,07	0,24
CD57	0,19	-0,08	-0,04	0,21	-0,15	0,15
CD16	-0,08	-0,3	-0,15	-0,19	0,1	-0,32
TCR $\gamma\delta$	0,34	0,14	-0,31	-0,63	-0,47	-0,66
Kappa Mab	-0,11	-0,02	-0,2	0,05	-0,27	0,19

TABLA 11 No se encontró correlación significativa entre los conteos de subconjunto de linfocito y CDAI (Pacientes con Enfermedad de Crohn) o resultados Powell-Tuck (colitis ulcerativa).

240

Tabla 12:

VALORES SPEARMAN R QUE COMPARAN SUBCONJUNTOS DE LINFOCITO
CON SUERO NATALIZUMAB

Subconjuntos	Enfermedad de Crohn			Colitis Ulcerativa		
	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 1	Semana 2	Semana 4
Linfocitos	0,03	0,49	0,64	0,1	-0,02	0,18
TCR $\alpha\beta$	-0,11	0,35	0,51	-0,04	0,28	-0,11
CD 25	-0,09	0,03	0,26	0,25	-0,07	-0,25
CD 26	-0,07	0,28	0,61	0,20	0,22	-0,14
CD 45 RA	0,19	0,29	0,62	-0,12	-0,25	-0,32
CD 45 RO	-0,16	0,32	0,34	0,37	0,08	0,39
CD38	0,06	0,18	-0,34	-0,01	-0,45	-0,43
CD 69	0,02	0,26	0,57	0,2	-0,22	0,14
HLA-DR	0,05	0,13	-0,25	0,08	0,27	-0,07
CD8CD28	-0,18	0,16	0,41	0,25	0,07	0,32
CD8DR	0,4	0,16	0,004	0,08	0,3	-0,18
CD57	0,1	-0,06	-0,31	-0,08	-0,03	0
CD16	0,22	0,19	-0,5	0,13	0,37	0,25
TCR $\gamma\delta$	0,002	-0,16	-0,2	0,21	0,61	0,6
Kappa Mab	-0,07	-0,27	0,29	0,41	0,45	-0,41

Tabla 12: No se encontró ninguna correlación significativa entre la actividad de la enfermedad y los subconjuntos de linfocitos, excepto para conteos de linfocitos totales en la semana 4 ($p=0,004$).

Basado en los datos anteriores, una infusión de natalizumab 3 mg/kg produjo un incremento en los niveles de circulación de la mayoría, pero no de todos, los subconjuntos de leucocitos en pacientes con IBD activo. Los conteos de eosinófilo, monolito y linfocito que circulan se elevaron significativamente sobre los valores de línea basal durante al menos cuatro semanas post-infusión en la mayoría de pacientes.

Un amplio rango de subconjuntos de células T Se incrementó significativamente sobre valores de pretratamiento, particularmente aquellos que expresan antígenos de activación. Sin embargo, los conteos de células NK (CD16⁺/CD3-) no se afectaron por natalizumab, y células T CD57⁺ se afectaron en un alcance mucho menor por natalizumab que otros subconjuntos de células T. Los linfocitos que expresan el receptor de la célula $\gamma\delta$ T tampoco se afectaron por el natalizumab, que sugiere que las integrinas alfa-4 son cualquiera no expresado, o son expresados en un nivel inferior en estas células.

Así, en pacientes activos IBD, el natalizumab puede limitar el tráfico y mantener en circulación muchos subconjuntos de leucocitos y linfocitos activados. Las células NK, las células γδ neutrófilos y basófilos parecen no afectarse por la administración del natalizumab, el cual puede sugerir que ellos son mediadores menos importantes en el tráfico de éstos tipos de células.

Mientras la presente invención ha sido descrita con referencia a las modalidades específicas de esta, debe ser entendido por aquellos expertos en la técnica que se pueden hacer varios cambios y los equivalentes pueden ser sustituidos sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Adicionalmente, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación particular, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de procesos, para el objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Todas tales modificaciones estén dentro de l alcance de la invención.

La solicitud provisional U.S. Nos. 60/360,134 y 60/374,501 presentadas el 25 de Febrero de 2002 y el 23

243

de Abril de 2002 respectivamente se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Todas las referencias citadas aquí se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir crónicamente la inflamación patológica en un paciente en necesidad de esto que comprende administrar crónicamente un agente al paciente que inhibe la integrina alfa.4 o inhibe un dímero que comprende la integrina alfa-4 en una cantidad efectiva terapéuticamente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la administración crónica es durante un periodo de al menos 6 meses.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la administración crónica es durante un periodo de al menos 12 meses.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el agente se administra repetidamente en una forma para unir a la integrina alfa-4 o un dímero que comprende integrina alfa-4, y en donde la administración mantiene la saturación del receptor integrina alfa-4 en un nivel

suficiente para suprimir crónicamente la inflamación patológica en el paciente.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el agente se administra repetidamente de tal forma que la saturación del receptor integrina alfa-4 es de a cerca de al menos 65% a cerca de 100% en el paciente.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la saturación es de al menos 75%.
7. El método de la reivindicación 5, en donde la saturación es de al menos 80%
8. El método de cualquiera de la reivindicaciones 1 ó 4, en donde el agente se une a los dímeros de integrina alfa-4.
9. El método de cualquiera de la reivindicaciones 1 ó 4, en donde el agente es un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo inmunológicamente de este.

10. El método de la reivindicación 9 en donde el anticuerpo monoclonal es natalizumab.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el dímero de integrina alfa.4 es alfa-4 beta-1
12. El método de la reivindicación 4, en donde el agente se administra en una cantidad suficiente para saturar al menos un receptor dímero de integrina alfa-4 por eso inhibe la inflamación patológica.
13. El método de la reivindicación 12, en donde los receptores dímeros son alfa-4 beta-1 o alfa-4 beta-7, y la inflamación patológica se originó por esclerosis múltiple.
14. El método de la reivindicación 12, en donde los receptores dímeros son alfa-4 beta-1 o alfa-a beta-7 y la inflamación patológica se originó por una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.

247

15. El método de la reivindicación 14, en donde la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal es la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa o enfermedad inflamatoria del intestino.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde la inflamación patológica se origina por una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.
17. El método de la reivindicación 16 en donde la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal es la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, o enfermedad inflamatoria del intestino.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde la inflamación patológica se origina por esclerosis múltiple.
19. un método para determinar la eficacia de un régimen de administración crónico para tratar la inflamación patológica en un sujeto, en

donde la inflamación patológica se modula mediante una integrina alfa-4 que comprende medir la saturación de la integrina alfa-4 o un dímero que comprende la integrina alfa-4.

20. El método de la reivindicación 19, en donde el dímero de integrina alfa-4 es alfa-4 beta-1 ó alfa -4 beta-7
21. El método de la reivindicación 190 en donde la inflamación patológica se originó por la enfermedad de Crohn y la medición de la proteína reactiva C y/o CDAI en la saturación de las medidas del paciente de integrina alfa-4.
22. El método de la reivindicación 19, en donde la inflamación patológica se origina por esclerosis múltiple
23. El método de la reivindicación 1, en donde la inflamación patológica es una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal y comprende administrar crónicamente una dosis

efectiva terapéuticamente de natalizumab o un fragmento activo inmunológicamente de esta a un paciente en necesidad de esta suficiente para tratar o mejorar la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal en el paciente.

24. El método de la reivindicación 23, en donde la enfermedad del tracto gastrointestinal es la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa
25. El método de cualquiera de la reivindicaciones 23 ó 24, en donde el natalizumab se administró mediante infusión cada cuatro semanas durante al menos 6 meses en una cantidad de a cerca de 1 mg/ kg por paciente a cerca de 20 mg/kg por paciente.
26. El método de la reivindicación 25, en donde las infusiones se administraron durante al menos 12 meses.
27. El método de la reivindicación 1, en donde la inflamación patológica es esclerosis múltiple y

comprende administrar crónicamente una dosis efectiva terapéuticamente de natalizumab o un fragmento activo inmunológicamente de esta, a un paciente en necesidad de esta suficiente para aliviar los síntomas de la esclerosis múltiple.

28. El método de la reivindicación 27, en donde el natalizumab se administró mediante infusión cada cuatro semanas durante al menos 6 meses en una cantidad de a cerca de 1 mg/kg por paciente a cerca de 20 mg/kg por paciente.
29. El método de la reivindicación 28, en donde las infusiones se administraron durante al menos 12 meses.
30. Una composición para tratamiento crónico de inflamación patológica en un paciente que comprende un agente en una cantidad suficiente para aliviar los síntomas de la inflamación patológica en el paciente en necesidad de esta.

31. La composición de la reivindicación 30 en donde el agente inhibe la actividad de la integrina alfa-4 y/o la actividad del dímero de integrina alfa-4.
32. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31, en donde la composición comprende además un estabilizador, un portador y/o u excipiente
33. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31 en donde el agente es natalizumab.
34. El método de la reivindicación 33, en donde el natalizumab se formula para infusión intravenosa en una cantidad de cerca de 1mg/kg por paciente a cerca de 20 mg/kg por pacienten para administración cada cuatro semanas durante al menos 6 meses.
35. La composición de la reivindicación 33, en donde la inflamación patológica se originó por esclerosis múltiple.

36. La composición de la reivindicación 33, en donde la inflamación patológica se originó por una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.
37. La composición de la reivindicación 36, en donde la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal es la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa o enfermedad inflamatoria del intestino.
38. Una terapia de combinación para el tratamiento crónico de inflamación patológica en un paciente, en donde la terapia de combinación comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 30-33 y un compuesto que mejora la inflamación patológica.
39. La terapia de combinación de la reivindicación 38 en donde la inflamación patológica se origina por una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.

40. La terapia de combinación de la reivindicación 39 en donde la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal es colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino o enfermedad de Crohn, y el compuesto es un 5-aminosalicilato, un glucocorticoide, un derivado de tioguanina, metotrexato, ciclosporina, un anticuerpo monoclonal que se une al TNF, o un antibiótico.

41. La terapia de combinación de la reivindicación 38, en donde la inflamación patológica se origina por esclerosis múltiple.

42. Un uso del inhibidor de integrina alfa-4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento crónico de una inflamación patológica en un paciente en necesidad de este.

43. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 42, en donde la condición patológica se origina por esclerosis múltiple.

44. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 42, en donde la condición patológica se origina por una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.
45. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 44, en donde el inhibidor de integrina alfa-4 es natalizumab, y la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal es enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino o colitis ulcerativa.
46. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 42, en donde el medicamento es formulado de tal forma que los receptores de integrina alfa-4 están saturados en un nivel suficiente para suprimir la inflamación patológica cuando se administra el medicamento al paciente.
47. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 46, en donde cuando se administra el medicamento a un paciente suministra la

saturación del receptor de integrina alfa-4 de cerca de al menos 65% a cerca de 100%.

48. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 47, en donde la saturación es de al menos 75%.

49. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 47, en donde la saturación es de al menos 80%.

50. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de cualquiera de las reivindicaciones 42-47, en donde el inhibidor se une a los dímeros de integrina alfa-4.

51. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de cualquiera de las reivindicaciones 42-47, en donde el inhibidor es un anticuerpo monoclonal.

52. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 51, en donde el anticuerpo monoclonal es natalizumab o un fragmento activo inmunológicamente de este.

53. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 50, en donde el inhibidor se une a alfa-4 beta-1.
54. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 42, en donde el agente se administra en una cantidad suficiente para saturar uno o más receptores dímero por ello inhibe la inflamación patológica.
55. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 44, en donde el medicamento comprende además un compuesto que mejora una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.
56. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 55, en donde el compuesto es 5-aminosalicilato, un glucocorticoide, un derivado de tioguanina, metrotexato, una ciclosporina, un anticuerpo monoclonal que se une al TNF, un antibiótico, un analgésico, un antidiarreico, o un anticolinérgico.

257

57. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de cualquiera de las reivindicaciones 42-56, en donde el inhibidor es natalizumab y se formula en una cantidad de cerca de 1 mg/kg ,por paciente a cerca de 20 mg/kg por paciente para infusión intravenosa al paciente en necesidad de esta cada cuatro semanas durante al menos 6 meses.

58. El uso del inhibidor de integrina alfa-4 de la reivindicación 57, en donde el inhibidor se formula para infusión intravenosa al paciente durante al menos 12 meses.

258

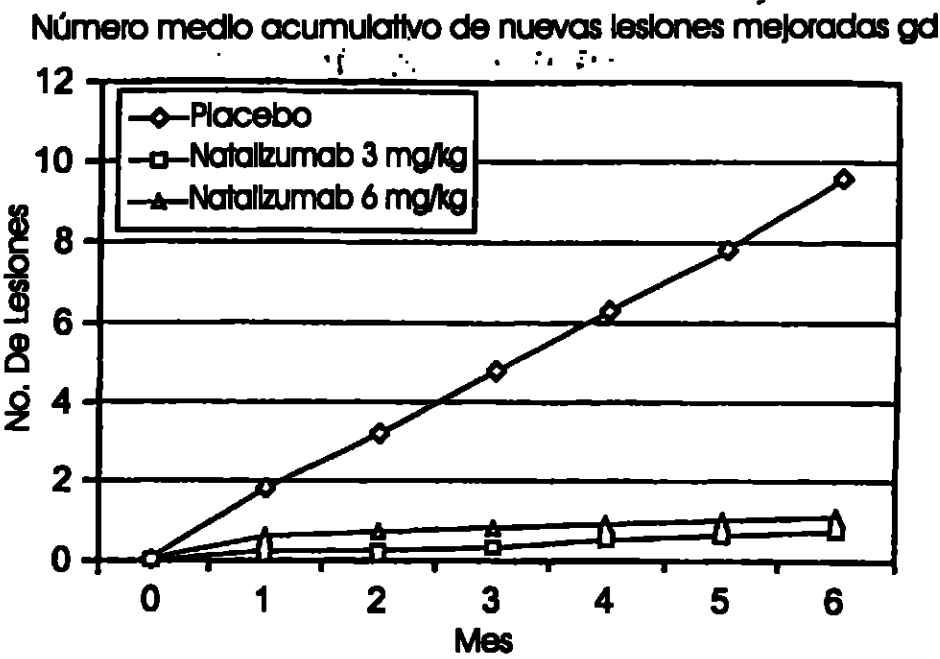


FIG. 1

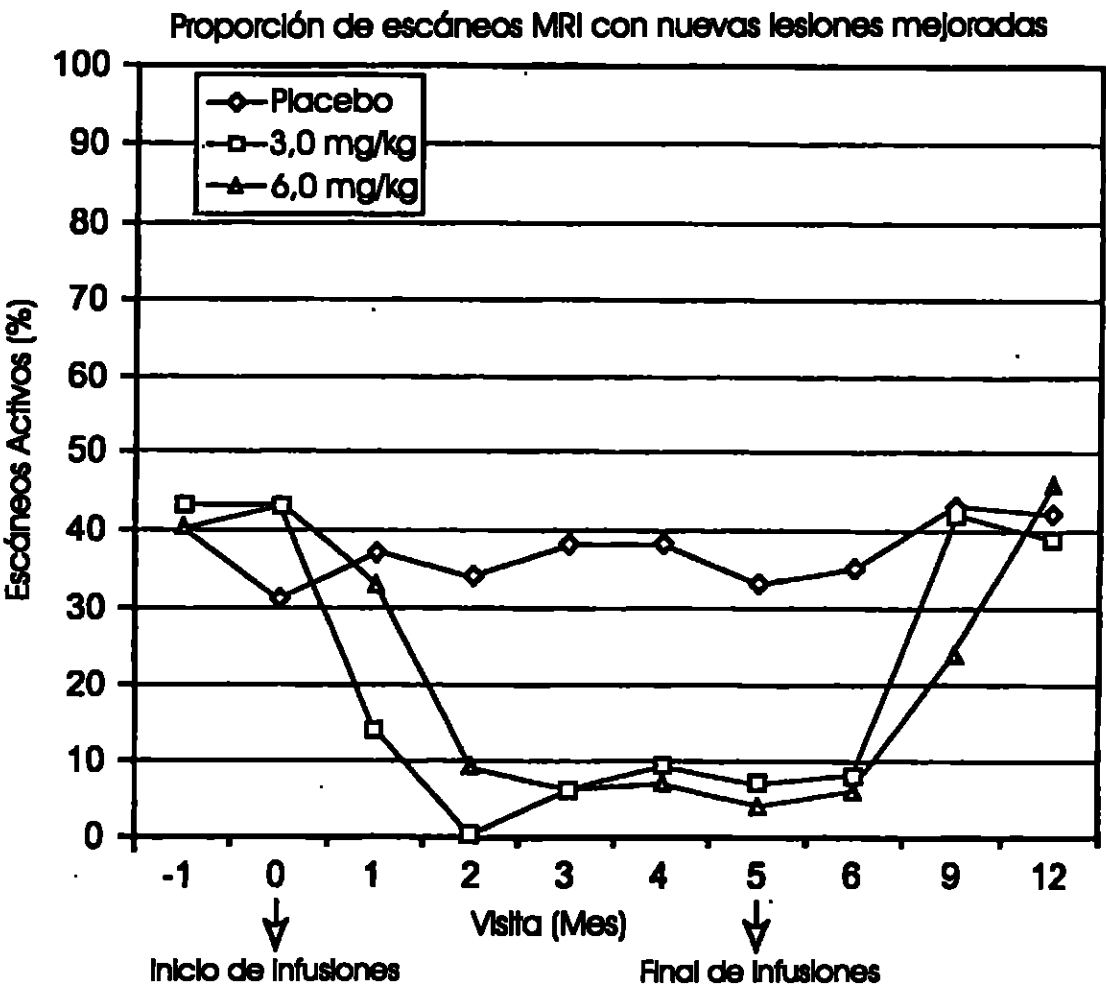


FIG. 2

Resumen de Concentraciones de Suero Natulizimab para 3,0 mg/kg de Natulizimab

Paciente	Mes 0				Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
	Pre-Infusión	60 min	2 hrs	24 hrs				
01	<0,13	65,0	74,7 µg/ml	43,4 µg/ml	11,6 µg/ml	4,6 µg/ml	4,9 µg/ml	2,3 µg/ml
02	<0,13	56,1	72,2	39,2	17,7	11,2	ND	3,6
03	<0,13	58,5	60,0	34,4	10,6	5,8	3,6	1,3
04	<0,13	77,9	97,3	54,1	16,2	7,2	2,3	0,2
05	<0,13	75,6	67,5	42,0	17,3	10,7	8,0	5,4
06	<0,13	72,0	73,7	ND	10,7	4,0	1,5	1,6
07	<0,13	16,9	30,7	23,7	13,0	ND	ND	3,5
08	<0,13	54,3	58,4	49,0	15,7	9,9	6,7	4,0
09	<0 13	82,7	74,2	62,6	18,6	ND	3,5	2,2
10	<0 13	84,3	84,1	64,2	22,7	10,7	7,3	3,9
11	<0 25	62,5	72,6	42,0	14,3	6,8	4,1	2,2
12	<0 25	102,7	80,6	82,1	25,5	13,7	5,8	3,5
13	<0 13	76,0	67,8	44,3	13,7	8,6	5,3	2,7
14	<0,13	66,4	70,2	36,5	11,0	6,3	3,9	2,0
	Mes 0				Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
	Pre-Infusión	60 min	2 hrs	24 hrs				
N	14	14	14	13	14	12	12	14
Media	0,0	67,9	70,3	47,5	15,6	8,3	4,7	2,7
SD	0,00	19,60	14,96	15,18	4,50	2,98	1,97	1,33

FIG. 3A

Resumen de Concentraciones de Suero Natulizimab para 3,0 mg/kg de Natulizimab

Paciente	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5			
				Pre-infusión	60 min	2 hrs	24 hrs
01	2,4 µg/ml	1,4 µg/ml	1,9 µg/ml	ND	ND	ND	ND
02	7,1	8,0	11,1	7,8	65,1	82,3	50,5
03	2,3	2,9	2,7	1,2	53,9	54,7	40,6
04	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	24,6	21,4	2,5
05	8,1	11,4	1,8	0,2	ND	ND	ND
06	1,4	1,8	1,9	2,0	81,9	90,3	51,9
07	1,7	2,5	2,2	2,6	36,0	62,7	22,2
08	4,5	5,7	2,0	4,7	76,0	65,0	ND
09	3,4	3,9	3,3	3,3	59,7	64,8	48,5
10	2,9	3,3	6,1	4,5	82,0	79,6	59,9
11	2,7	4,6	5,5	3,0	82,6	79,3	55,6
12	2,0	1,9	1,9	3,6	68,8	ND	65,2
13	4,3	4,3	3,6	5,0	74,9	55,4	47,0
14	2,1	1,6	1,9	3,0	70,3	63,0	35,5
				Mes 5			
SRN	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Pre-infusión	60 min	2hrs	24 hrs
N	14	14	14	13	12	11	11
Media	3,2	3,8	3,3	3,1	64,7	65,3	43,6
SD	2,19	2,98	2,74	2,11	18,51	18,61	18,03

FIG. 3B

3/19

Resumen de Concentraciones de Suero Natulizimab para 3,0 mg/kg de Natulizimab

Paciente	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	33,8	21,4	10,3	8,1	0,4	<0,13	<0,13	ND	ND
03	21,3	9,4	4,7	5,1	<0,25	<0,13	<0,13	ND	ND
04	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,25	<0,13	<0,13	ND	ND
05	ND	ND	ND	0,2	<0,25	<0,13	<0,13	ND	ND
06	21,5	7,6	3,9	2,4	<0,13	<0,13	<0,13	ND	ND
07	ND	11,0	6,2	3,7	0,3	<0,13	ND	ND	ND
08	19,1	13,2	9,6	5,3	0,4	<0,13	<0,13	<0,13	ND
09	33,7	13,1	6,1	3,8	<0,13	ND	ND	ND	ND
10	29,9	16,8	ND	7,4	0,5	ND	ND	ND	ND
11	ND	18,4	10,5	6,6	0,7	<0,13	ND	ND	ND
12	ND	9,9	6,3	3,5	<0,13	<0,13	ND	ND	ND
13	22,1	13,3	9,1	4,6	<0,13	<0,13	ND	ND	ND
14	14,1	8,2	9,4	4,7	<0,13	ND	ND	ND	ND
SRN	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
N	9	12	11	13	13	10	6	1	0
Media	21,7	11,9	6,9	4,3	0,2	0,0	0,0	0,0	
SD	10,57	5,61	3,25	2,44	0,25	0,00	0,00		

FIG. 3C

Resumen de Concentraciones de Suero Natulizimab para 6,0 mg/kg de Natulizimab

Paciente	Mes 0				Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
	Pre-infusión	60 min	2 hrs	24 hrs				
01	<0,25	104,8	155,3 µg/ml	110,0 µg/ml	36,3 µg/ml	16,8 µg/ml	11,4 µg/ml	11,0 µg/ml
02	<0,13	102,8	135,0	81,8	37,5	18,7	11,0	3,9
03	<0,13	121,1	96,3	68,4	22,9	19,9	11,4	6,6
04	<0,13	136,0	141,2	86,6	26,0	20,9	13,7	9,8
05	<0,13	163,8	138,6	84,4	29,4	17,5	14,0	9,6
06	<0,13	145,7	173,7	94,8	29,3	16,5	14,0	9,7
07	<0,25	173,5	164,0	110,0	33,9	ND	ND	ND
08	<0,13	135,8	143,0	105,8	20,9	17,6	15,0	10,9
09	<0,13	97,3	127,9	66,8	27,0	8,3	7,8	4,8
10	<0,13	149,2	111,2	103,2	37,0	21,4	11,9	4,8
11	<0,25	111,6	142,5	88,9	20,8	20,7	9,7	8,6
12	<0,13	147,6	135,0	95,5	43,9	28,0	19,4	9,9
13	<0,25	183,9	168,6	113,2	52,0	31,7	20,9	12,1
14	<0,13	140,2	129,2	109,9	36,9	21,0	12,2	7,9
	Mes 0				Semana 1	Semana 2	Semana 3	Mes 1
	Pre-infusión	60 min	2 hrs	24 hrs				
N	14	14	14	14	14	13	13	13
Media	0,0	136,7	140,1	94,2	32,4	19,9	13,3	8,4
SD	0,00	26,72	21,18	15,38	8,97	5,61	3,63	2,64

5/19

FIG. 4A

262

Resumen de Concentraciones de Suero Natulizimab para 6,0 mg/kg de Natulizimab

Paciente	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5			
				Pre-Infusión	60 min	2 hrs	24 hrs
01	10,7 µg/ml	ND µg/ml	2,4 µg/ml	ND	ND	ND	ND
02	6,8	8,2	9,6	10,3	ND	ND	ND
03	8,6	9,9	10,5	7,8	92,6	97,5	85,9
04	11,8	16,4	17,1	15,8	200,1	161,1	135,6
05	9,3	11,6	16,9	19,5	190,4	168,3	104,4
06	11,7	14,5	16,8	18,2	171,3	153,0	112,7
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	14,6	12,9	14,2	18,4	145,2	172,5	99,2
09	8,5	8,4	12,0		103,0	107,5	44,9
10	9,0	16,3	18,1	10,9	114,3	141,4	103,0
11	11,8	14,2	13,3	14,5	135,7	109,4	93,8
12	11,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	1,6	<0,13	1,9	7,5	187,0	141,8	124,6
14	11,2	12,6	12,8	11,8	152,4	124,0	114,6
SRN	Mes 5						
	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Pre-Infusión	60 min	2hrs	24 hrs
N	13	11	12	10	10	10	10
Media	9,8	11,4	12,1	13,5	149,2	137,7	101,9
SD	3,18	4,71	5,39	4,43	37,96	26,82	24,75

FIG. 4B

6/19

263

264

W/O 03/07/2040

Resumen de Concentraciones de Suero Natulizimab para 6,0 mg/kg de Natulizimab

Paciente	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
03	43,2	17,2	15,5	10,1	1,3	<0,13	<0,13	ND	ND
04	59,1	38,6	25,1	19,3	3,4	0,2	<0,13	ND	ND
05	46,0	29,3	21,3	24,8	6,5	0,3	0,2	ND	ND
06	78,9	42,9	25,1	17,4	2,9	<0,13	<0,13	ND	ND
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	50,1	26,0	24,7	21,2	ND	0,7	<0,13	<0,13	ND
09	32,2	30,2	16,6	9,3	1,1	<0,13	<0,13	ND	ND
10	50,7	34,3	17,0	13,1	2,1	<0,13	<0,13	<0,13	ND
11	34,0	30,0	23,7	22,5	4,6	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	48,1	31,9	19,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	44,8	32,3	15,5	13,6	2,6	ND	ND	ND	ND
SRN	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
N	10	10	10	9	8	7	7	2	0
Media	48,7	31,3	20,4	16,8	3,1	0,2	0,0	0,0	
SD	13,20	6,93	4,08	5,56	1,79	0,26	0,08	0,00	

7/19

FIG. 4C

PCT/US03/05421

264

Niveles de Saturación del Receptor mantenidos en el estudio MS					
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Mes 0	Pre-Infusión	N	14	13	14
		Media	9.82	8.06	7.56
		SD	5.331	2.192	3.135
		Mediana	8.3	7.7	6.7
		Mínimo	4.7	5.9	3.1
		Máximo	24.9	14.4	13.3
Mes 0	2 hr Post-Infusión	N	14	14	14
		Media	8.21	99.11	100.97
		SD	3.567	10.557	4.884
		Mediana	7.5	102.4	102.1
		Mínimo	5.2	74.9	93.2
		Máximo	18.6	110.8	110.7
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Mes 0	24 hr Post-Infusión	N	12	12	13
		Media	9.30	99.09	98.93
		SD	7.328	9.052	12.079
		Mediana	6.7	99.9	97.4
		Mínimo	5.6	81.5	81.2
		Máximo	31.9	109.4	117.5
Semana 1		N	14	14	14
		Media	7.92	93.41	99.61
		SD	2.579	5.656	12.011
		Mediana	8.3	94.3	94.9
		Mínimo	3.5	82.8	83.5
		Máximo	13.3	100.9	120.8

FIG. 5A

265

WO 03/072040

8/19

PCT/US03/05421

265

267

Niveles de Saturación del Receptor mantenidos en el estudio MS

Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3 0 mg/kg (n=68)	Antegren 6 0 mg/kg (n=74)
Semana 2		N	12	14	13
		Media	8 98	88,28	97 37
		SD	2,991	7,494	14,377
		Mediana	8,4	88 0	97 9
		Mínimo	4,1	75 9	78,3
		Máximo	13,4	101 4	131 7
Semana 3		N	13	13	12
		Media	8,17	80 99	92 79
		SD	2,242	19 150	9 767
		Mediana	8 8	85,5	92,3
		Mínimo	4,9	24 5	74,7
		Máximo	12,0	99,3	110,9
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3 0 mg/kg (n=68)	Antegren 6 0 mg/kg (n=74)
Mes 1		N	14	13	13
		Media	8,87	82 48	85,58
		SD	3,808	11 272	8 491
		Mediana	8,4	84 1	84 6
		Mínimo	3 1	56,1	68 6
		Máximo	17 3	100,2	96,1
Mes 2		N	12	14	13
		Media	9 41	79,15	93,21
		SD	3 846	22,779	9,194
		Mediana	9,4	87,1	94,0
		Mínimo	4,7	7 3	75 8
		Máximo	19 5	96,6	104,2

FIG. 5B

267

W/O 03/07/2040

10/19

PCT/US03/05421

267

Niveles de Saturación del Receptor mantenidos en el estudio MS					
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Mes 3		N	12	14	12
		Media	6,97	79,47	83,32
		SD	2,720	23,459	18,333
		Mediana	6,5	81,6	88,9
		Mínimo	3,3	8,9	29,2
		Máximo	11,4	104,5	96,3
Mes 4		N	10	14	11
		Media	8,38	77,81	95,51
		SD	3,400	25,375	15,794
		Mediana	7,1	76,0	93,6
		Mínimo	4,9	7,9	78,3
		Máximo	16,9	117,4	139,0
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Mes 5	Pre-infusión	N	9	13	11
		Media	9,48	70,88	91,94
		SD	2,606	26,535	10,720
		Mediana	9,1	75,1	94,8
		Mínimo	6,1	9,0	75,4
		Máximo	15,6	115,0	106,9
Mes 5	2 hr Post-infusión	N	9	11	10
		Media	11,03	92,09	99,19
		SD	6,203	8,267	10,200
		Mediana	7,6	95,0	97,4
		Mínimo	4,9	79,7	82,5
		Máximo	21,7	103,4	114,6

FIG. 5C

268

Niveles de Saturación del Receptor mantenidos en el estudio MS					
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Mes 5	24 hr Post-Infusión	N	8	12	10
		Media	7.50	92.04	89.08
		SD	2.660	15.256	32.364
		Mediana	6.4	94.6	95.9
		Mínimo	4.7	49.5	4.8
		Máximo	12.8	106.4	123.2
Semana 21		N	8	12	11
		Media	8.06	80.25	92.27
		SD	2.217	24.078	11.557
		Mediana	8.2	86.2	88.9
		Mínimo	4.3	5.1	77.3
		Máximo	11.7	94.6	112.9
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Semana 22		N	7	12	10
		Media	8.67	84.98	90.44
		SD	2.471	25.744	18.174
		Mediana	8.7	90.5	81.6
		Mínimo	5.1	6.2	73.5
		Máximo	12.0	101.7	127.8
Semana 23		N	7	10	10
		Media	9.16	82.89	97.24
		SD	2.950	27.649	23.374
		Mediana	8.7	90.2	90.9
		Mínimo	4.6	6.1	78.8
		Máximo	14.0	100.5	154.8

FIG. 5D

269

W/O 03/072040

Niveles de Saturación del Receptor mantenidos en el estudio MS					
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3 0 mg/kg (n=68)	Antegren 6 0 mg/kg (n=74)
Mes 6		N	10	13	9
		Media	8,65	67,32	80,59
		SD	3,574	29,838	27,738
		Mediana	8,2	80,2	85,4
		Mínimo	4,4	6,4	10,0
		Máximo	16,7	102,5	106,2
Mes 7		N	10	12	8
		Media	7,69	42,10	80,46
		SD	1,281	24,011	27,664
		Mediana	7,7	41,1	67,2
		Mínimo	5,1	4,7	62,5
		Máximo	10,4	88,0	145,2
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3 0 mg/kg (n=68)	Antegren 6 0 mg/kg (n=74)
Mes 8		N	10	13	8
		Media	7,60	14,09	34,16
		SD	1,726	10,214	21,619
		Mediana	6,9	12,1	29,6
		Mínimo	6,0	6,2	11,8
		Máximo	10,7	45,0	59,6
Mes 9		N	5	7	7
		Media	9,52	5,88	9,45
		SD	2,701	2,246	4,644
		Mediana	9,0	5,6	7,7
		Mínimo	6,3	3,7	5,5
		Máximo	13,5	10,4	18,0

FIG. 5E

12/19

PCT/US03/05421

269

270

W/O 03/07/2040

Niveles de Saturación del Receptor mantenidos en el estudio MS					
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Mes 10		N	2	3	4
		Media	7.78	8.65	9.17
		SD	2.029	0.635	1.655
		Mediana	7.8	8.6	9.3
		Mínimo	6.3	8.0	7.1
Mes 12		Máximo	9.2	9.3	11.0
		N	1	1	1
		Media	8.80	6.04	6.61
		SD			
		Mediana	8.8	6.0	6.6
		Mínimo	8.8	6.0	6.6
		Máximo	8.8	6.0	6.6
Visita	Tiempo de Muestra	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3.0 mg/kg (n=68)	Antegren 6.0 mg/kg (n=74)
Terminación temprana		N	0	1	1
		Media		94.51	32.29
		SD			
		Mediana		94.5	32.3
		Mínimo		94.5	32.3
		Máximo		94.5	32.3

13/19

FIG. 5F

PCT/US03/05421

270

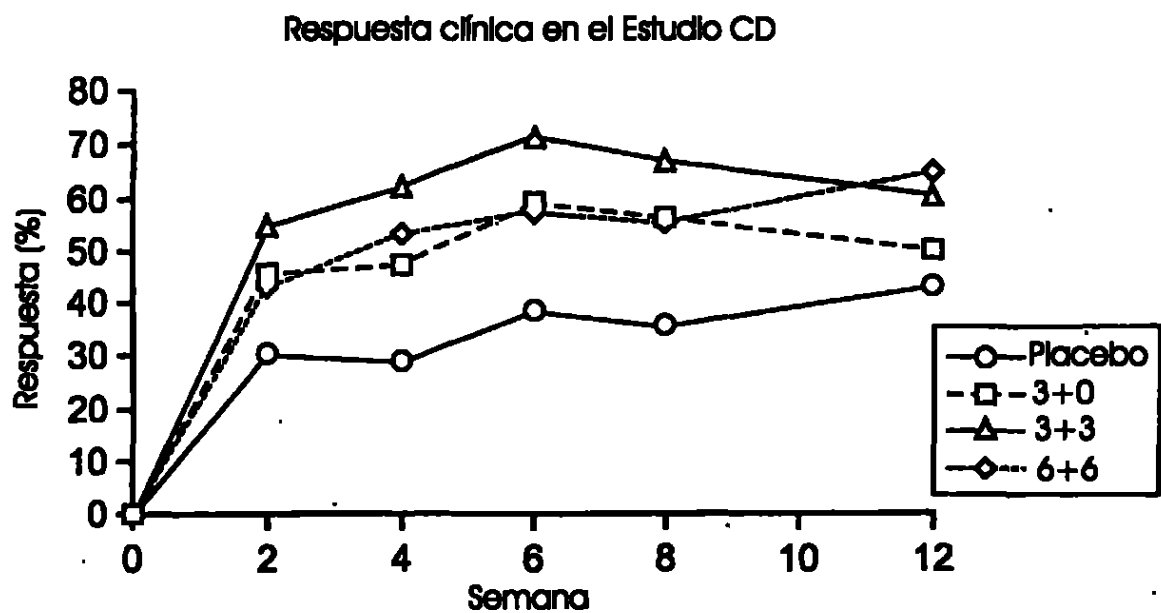


FIG. 6

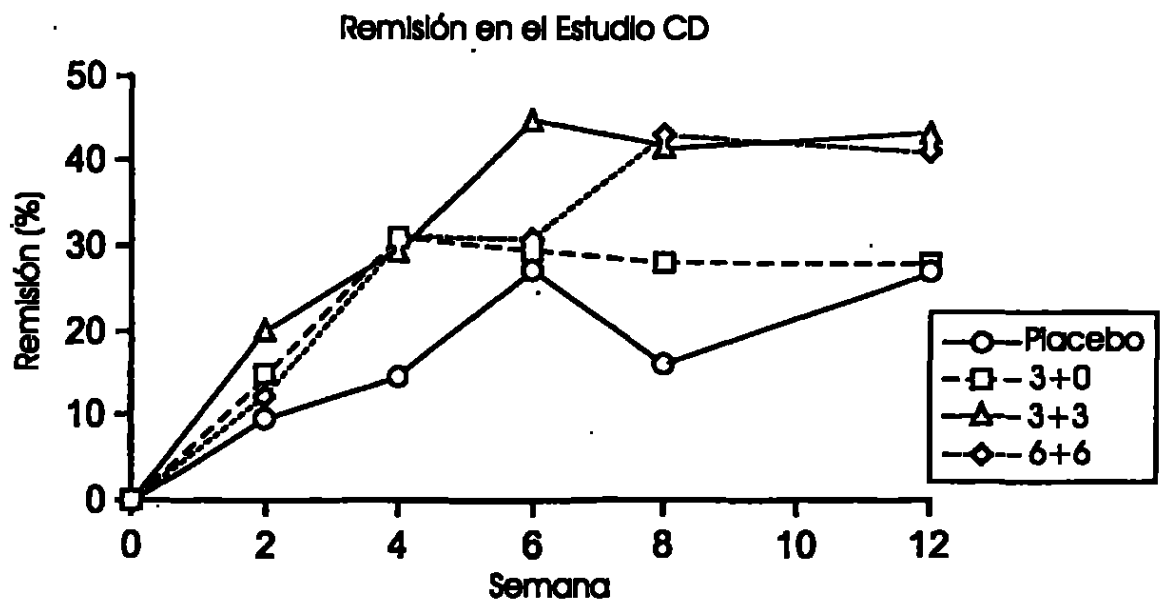


FIG. 7

272

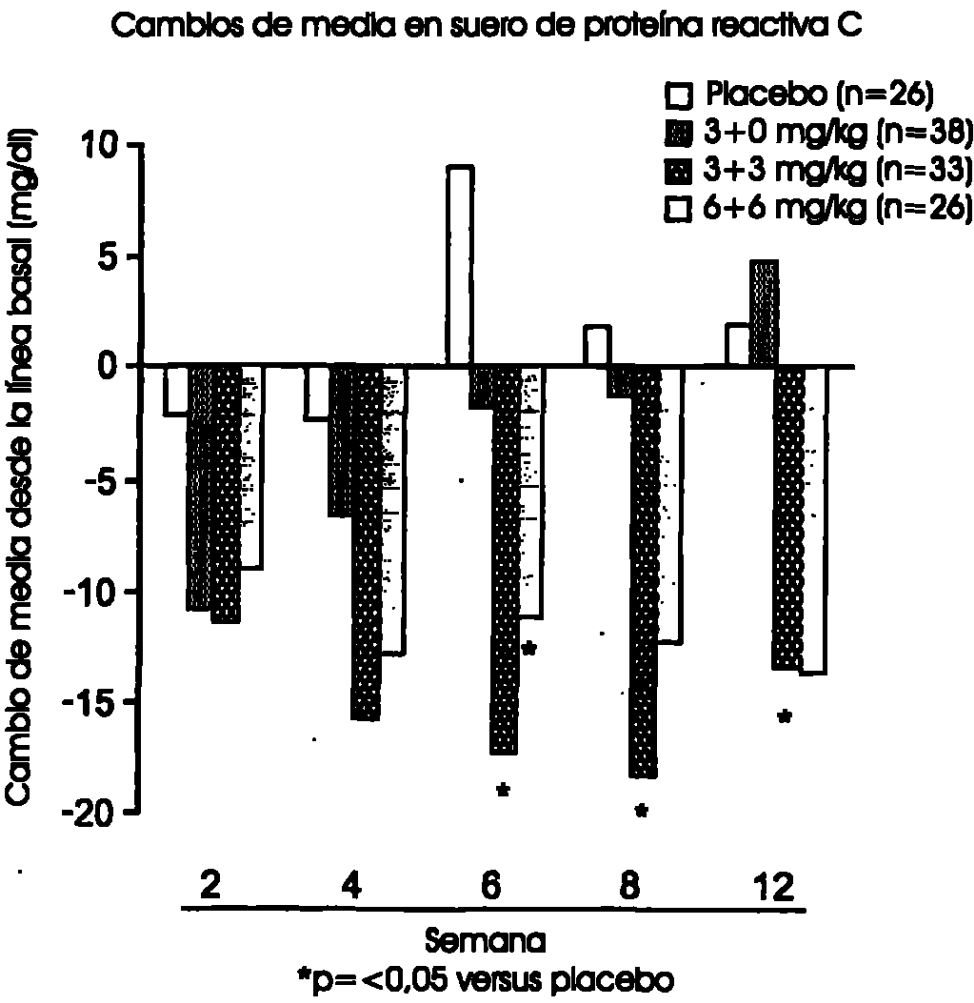


FIG. 8

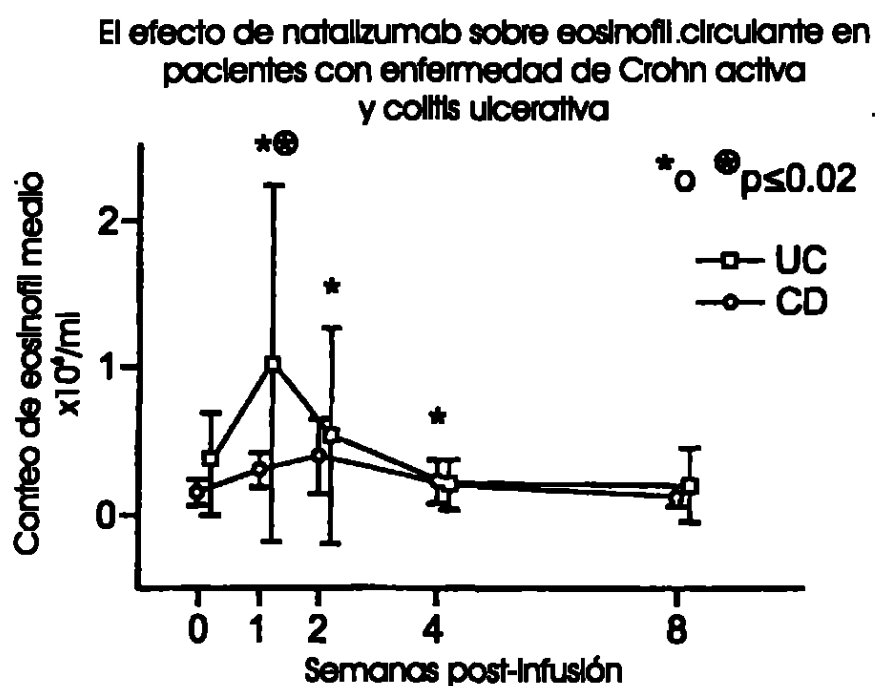


FIG. 9A

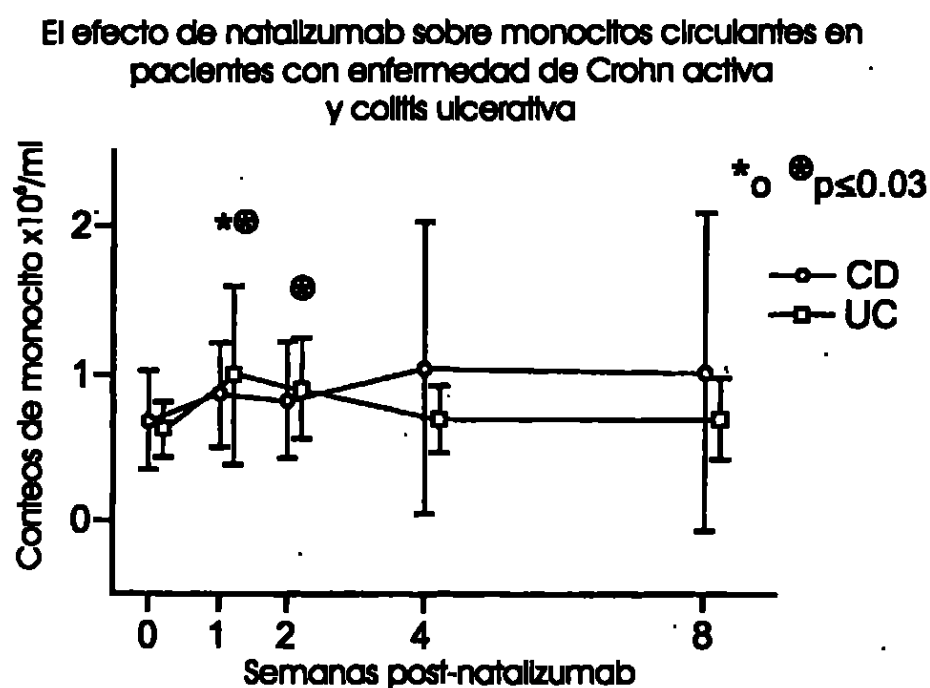


FIG. 9B

Los efectos de natalizumab sobre células TCRαβ⁺ que expresan
antígenos de activación en pacientes con enfermedad
de Crohn activa.

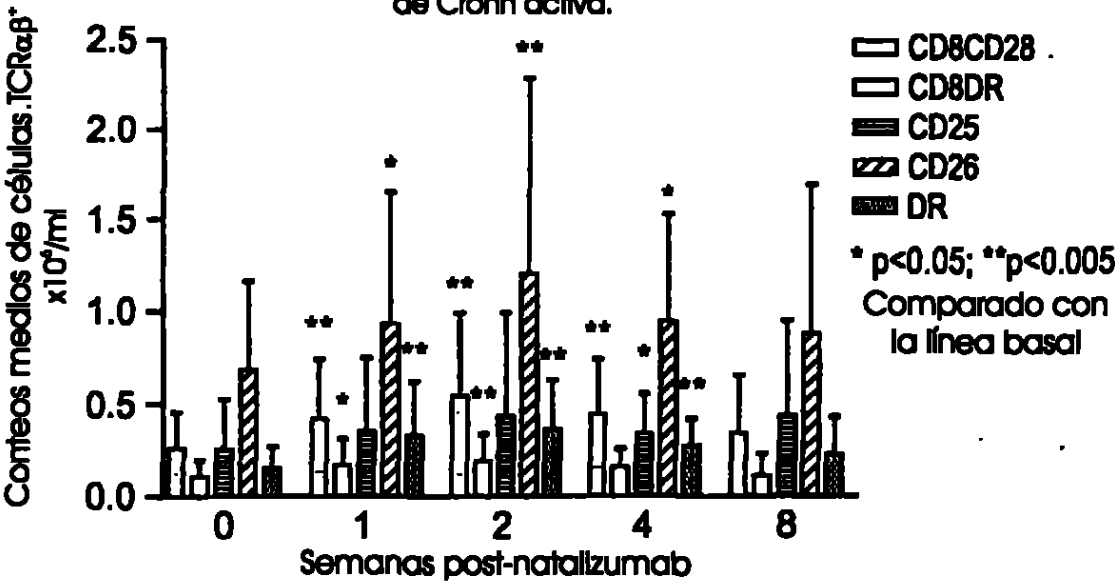


FIG. 10A

Los efectos de natalizumab sobre células TCRαβ⁺ que expresan
antígenos de activación en pacientes con colitis ulcerativa activa.

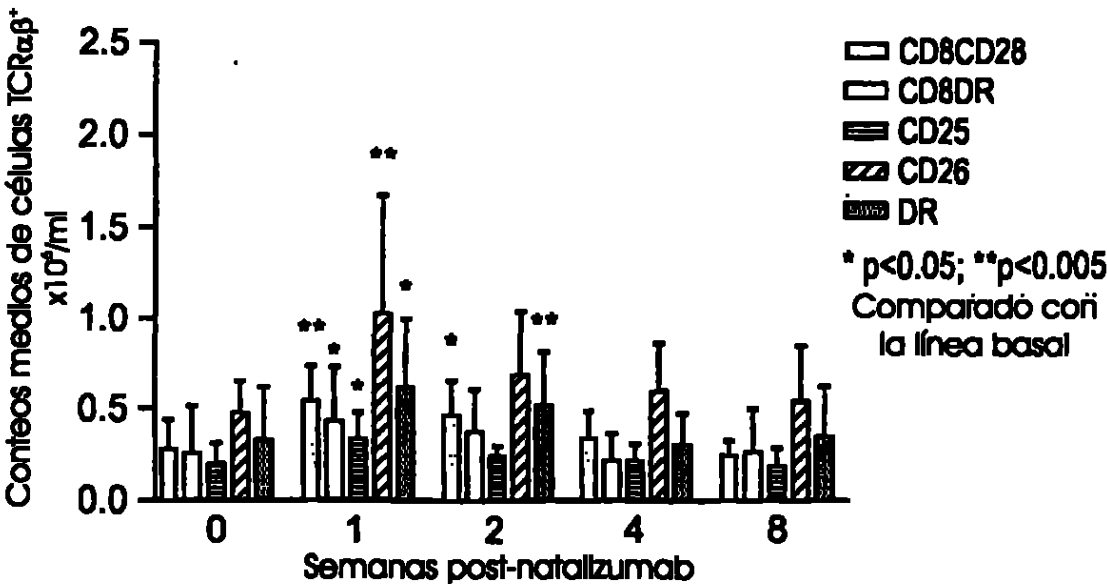


FIG. 10B

Los efectos de natalizumab sobre células TCR $\alpha\beta$ ⁺ que expresan antígenos de activación, memoria y marcadores sencillos en pacientes con enfermedad de Crohn activa.

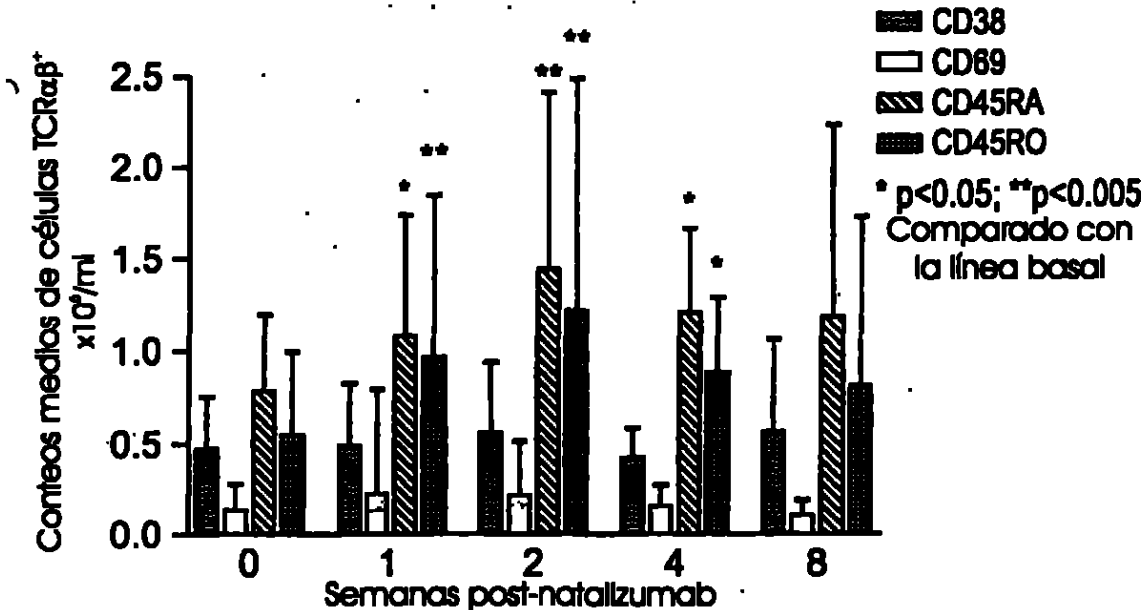


FIG. 10C

Los efectos de natalizumab sobre células TCR $\alpha\beta$ ⁺ que expresan antígenos de activación, memoria y marcadores sencillos en pacientes con colitis ulcerativa activa.

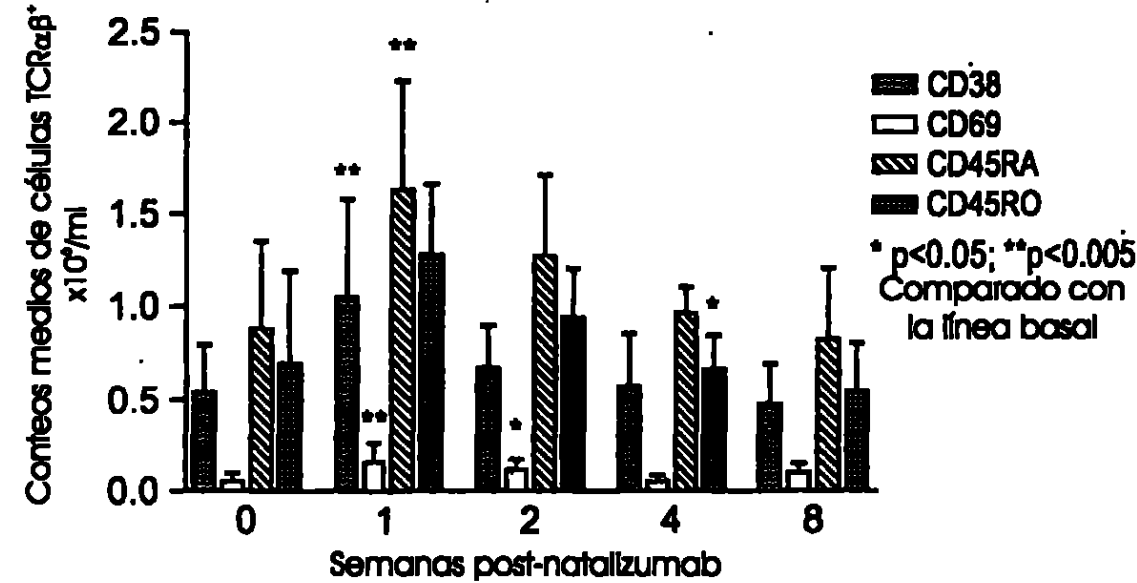


FIG. 10D

Los efectos de natalizumab sobre células TCR $\gamma\delta$ ⁺ circulantes y células tipo NK en pacientes con enfermedad de Crohn activa.

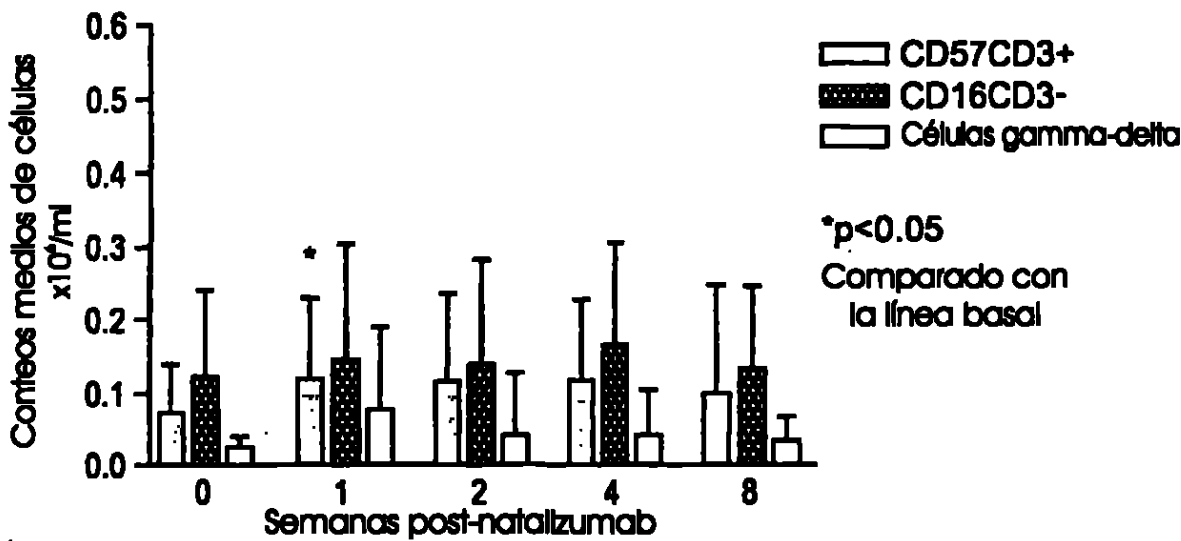


FIG. 11A

Los efectos de natalizumab sobre células TCR $\gamma\delta$ ⁺ circulantes y células tipo NK en pacientes con colitis ulcerativa.

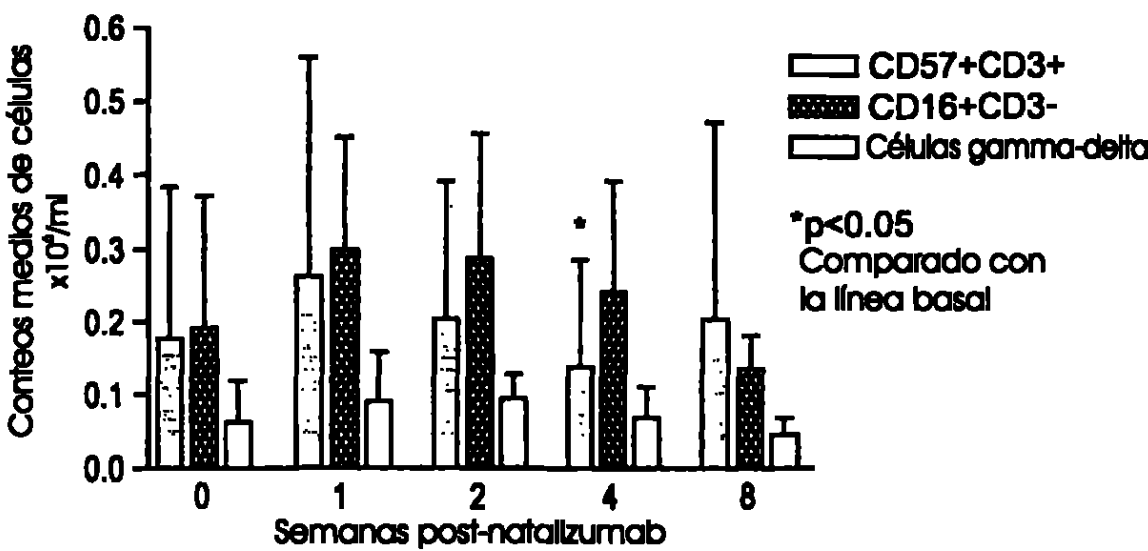


FIG. 11B

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

To:

TERESA STANEK REA
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.
P.O. BOX 1404
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313-1404

Date of mailing
(day/month/year)

17 MAY 2004

Applicant's or agent's file reference

002040-767

034008-038

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US03/05421

International filing date (day/month/year)

25 Feb 2003

Priority date (day/month/year)

25 Feb 2002

Applicant

ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

24 Sep 2003

(24.09.03)

2. That date of receipt is:



the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).



the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).



the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐

ATTENTION: That date of receipt is **AFTER** the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II.



(If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230
Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

Authorized officer
Barbara Fridie

Telephone No. 703-3053

BARBARA MATHIS
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.
RECEIVED

MAY 18 2004

DOCKETED

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ US

CHAPTER II

PCT DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:

The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND
------------------------	---------------------------

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference 002010-797	
International application No. PCT/US03/05421	International filing date (day/month/year) 25 February 2003 (25.02.03)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 25 February 2002 (25.02.02)	
Title of invention ADMINISTRATION OF AGENTS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATION			
Box No. II APPLICANT(S)			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) ELAN PHARMACEUTICALS, INC. 800 Gateway Boulevard South San Francisco, CA 94080 United States of America		Telephone No.: (650) 877-0900	
		Facsimile No.: (650) 553-7165	
		Teleprinter No.:	
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) TAYLOR, Julie 1506 7th Avenue San Francisco, CA 94122 United States of America			
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) YEDNOCK, Ted A. 184 Arroyo Road Forest Knolls, CA 94933 United States of America			
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US	
☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Form PCT/IPEA/401 (first sheet) (July 1998; reprint January 2000)

See Notes to the demand form

(05/03)

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The following person is ☒ agent ☐ common representative and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination. ☐ is hereby appointed any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked. ☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.	
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)</i> REA, Teresa Stanek; MEYER, Mercedes K.; and WILLIAMS, Jay F. BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P. P.O. Box 1404 Alexandria, Virginia 22313-1404 United States of America	Telephone No.: (703) 836-6620 Facsimile No.: (703) 836-2021 Teleprinter No.:
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	
Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION	
Statement concerning amendments:* 1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of: ☒ the international application as originally filed the description ☒ as originally filed ☐ as amended under Article 34 the claims ☒ as originally filed ☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement) ☐ as amended under Article 34 the drawings ☒ as originally filed ☐ as amended under article 34 2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed. 3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). <i>(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)</i> * Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendment to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.	
Language for the purposes of international preliminary examination: ENGLISH ☒ which is the language in which the international application was filed. ☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search. ☐ which is the language of publication of the international application. ☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.	
Box No. V ELECTION OF STATES	
The applicant hereby elects all eligible States <i>(that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)</i> excluding the following States which the applicant wishes not to elect:	

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

For International Preliminary
Examining Authority use only

- | | | | |
|----|--|---|--------|
| 1. | translation of international application | : | sheets |
| 2. | amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. | copy (or, where required, translation) of
amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. | copy (or, where required, translation) of
statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. | letter | : | sheets |
| 6. | other (specify) | : | sheets |

received not received

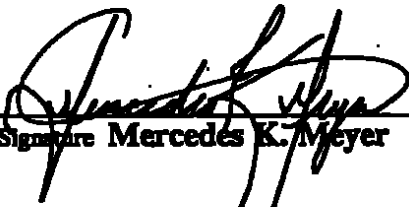
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 4. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ separate signed power of attorney | 5. ☐ nucleotide and or amino acid sequence listing in
computer readable form |
| 3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | 6. ☐ other (specify): |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).


Signature Mercedes K. Meyer Registration No. 44,939

For International Preliminary Examining Authority use only

- | | |
|---|--|
| 1. ☐ Date of actual receipt of demand | |
| 2. ☐ Adjusted date of receipt of demand due
to CORRECTIONS under Rule 60.1(b): | |
| 3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months
from the priority date and Item 4 or 5, below, does not apply. | ☐ The applicant has been informed
accordingly. |
| 4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule
80.5. | |
| 5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is
EXCUSED pursuant to Rule 82. | |

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PCT

CHAPTER II

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Demand for international preliminary examination

International application No. PCT/US03/05421 Applicant's or agent's file reference 002010-797 Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al. Calculation of prescribed fees <table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%;">1. Preliminary examination fee</td><td style="width: 10%; text-align: center;">490.00</td><td style="width: 10%; text-align: center;">P</td><td style="width: 30%;"></td></tr><tr><td>2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>)</td><td style="text-align: center;">172.00</td><td style="text-align: center;">H</td><td></td></tr><tr><td>3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box</td><td style="text-align: center;">662.00</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td style="text-align: center;">TOTAL</td><td></td><td></td></tr></table> Mode of Payment <table style="width: 100%;"><tr><td>☒ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)</td><td>☐ cash</td></tr><tr><td>☒ cheque</td><td>☐ revenue stamps</td></tr><tr><td>☐ postal money order</td><td>☐ coupons</td></tr><tr><td>☐ bank draft</td><td>☐ other (specify):</td></tr></table>	1. Preliminary examination fee	490.00	P		2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>)	172.00	H		3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	662.00				TOTAL			☒ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	☐ cash	☒ cheque	☐ revenue stamps	☐ postal money order	☐ coupons	☐ bank draft	☐ other (specify):	For International Preliminary Examining Authority use only Date stamp of the IPEA
1. Preliminary examination fee	490.00	P																							
2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>)	172.00	H																							
3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	662.00																								
	TOTAL																								
☒ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	☐ cash																								
☒ cheque	☐ revenue stamps																								
☐ postal money order	☐ coupons																								
☐ bank draft	☐ other (specify):																								
Deposit Account Authorization (<i>this mode of payment may not be available at all IPEAs</i>) The IPEA/ <u>US</u> ☐ is hereby authorized to charge the total fees indicated above to my deposit account ☒ (<i>this check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit</i>) is hereby authorized to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above to my deposit account. 02-4800 Deposit Account Number 24 September 2003 Date (day/month/year) Signature Mercedes K. Meyer Registration No. 44,939																									

Form PCT/IPEA/401 (Annex) (July 1998)

See Notes to fee calculation sheet

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
GERALD F. SWISS
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP
P.O. BOX 1404
ALEXANDRIA, VA 22313-1404

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing
(day/month/year)

16 APR 2004

Applicant's or agent's file reference
002010-797

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US03/05421International filing date
(day/month/year)

25 February 2003 (25.02.2003)

Applicant
ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

- 1.
- ☒
- The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

- 2.
- ☐
- The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

- 3.
- ☐
- With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Phillip Gambel

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 002010-797	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/05421	International filing date (day/month/year) 25 February 2003 (25.02.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 25 February 2002 (25.02.2002)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/05421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/28

US CL : 424/130.1, 133.1, 141.1, 143.1, 144.1, 153.1, 154.1, 173.1; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.2, 388.22.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/130.1, 133.1, 141.1, 143.1, 144.1, 153.1, 154.1, 173.1; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.2, 388.22.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Confirmation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	U.S. 5,932,214 A (LOBB ET AL.) 03 August 1999, see entire document.	1-58
Y	U.S. 5,840,299 A (BENDIG ET AL.) 24 November 1998, see entire document.	1-58
Y	TILLEY ET AL., VLA-4 Antagonists. Drugs of the Future 2001, Vol. 26, No. 10, pages 985-998, see entire document.	1-58

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier applications or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document number of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2003 (19.10.2003)

Date of mailing of the international search report

16 APR 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Phillip Gambel

Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05421

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST
search terms: alpha 4, via-4, natalizumab, infliximab, ibd, crohn, colitis, multiple sclerosis,

RECEIVED

PCT/US2003/005421

ATENT COOPERATION TREATY

TSR/MXN/DHY

JUN 04 2004

BURNS DOANE
SWECKER & MATHIS, LLP

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

286

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

SWISS, Gerald, F.
Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP
P.O. Box 1404
Alexandria, VA 22313-1404
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 25 May 2004 (25.05.2004)		
Applicant's or agent's file reference -002010-797 034008-038		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/US2003/005421	International filing date (day/month/year) 25 February 2003 (25.02.2003)	Priority date (day/month/year) 25 February 2002 (25.02.2002)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI,
SK, TR

National : BG, CA, CN, DE, GB, IL, JP, KP, KR, MN, NO, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC,
EE, ES, FI, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MW, MX, MZ, NZ, OM, PH, PT, SC, SD, SE, SG, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 38(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 38(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Luis DA COSTA (Fax 338-71-30)
Facsimile No. (41-22) 338.71.30	Telephone No. (41-22) 338 8221

Form PCT/IB/332 (September 1997)

16/4/04 288880

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

SWISS, Gerald, F.
Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP
P.O. Box 1404
Alexandria, VA 22313-1404
ETATS-UNIS D'AMERIQUE**RECEIVED**

SEP 15 2003

SEP 15 2003

BURNS DOANE
SWECKER & MATHIS, LLP

Date of mailing(day/month/year)

04 September 2003 (04.09.03)

Applicant's or agent's file reference

002010-797

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US03/05421 ✓

International filing date(day/month/year)

25 February 2003 (25.02.03)

Priority date(day/month/year)

25 February 2002 (25.02.02)

Applicant

ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DE, DZ, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 September 2003 (04.09.03) under No. 03/072040

4. **TIME LIMITS** for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Judith Zahra

Facsimile No.(41-22) 740.14.35

Telephone No.(41-22) 338.91.11

. ATENT COOPERATION TRE. . IV

TSE/mxm/amy

288

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SWISS, Gerald, F.
Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP
P.O. Box 1404
Alexandria, VA 22313-1404
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 05 May 2003 (05.05.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 002010-797	
International application No. PCT/US03/05421 ✓	International filing date (day/month/year) 25 February 2003 (25.02.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 25 February 2002 (25.02.02)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
25 Febr 2002 (25.02.02)	60/360,134	US	07 April 2003 (07.04.03)
23 April 2002 (23.04.02)	60/374,501	US	08 April 2003 (08.04.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Luis DA COSTA
Facsimile No. (41-22) 740-1435	Telephone No. (41-22) 338 8221

Form PCT/IB/304 (July 1998)

117 88 03

005818218

POA Due 6/15/03

5/22/03

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SWISS, Gerald, F.
Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP
P.O. Box 1404
Alexandria, VA 22313-1404
United States of America

Date of mailing (day/month/year)
28 April 2003 (28.04.03)

Applicant's or agent's file reference.
002010-797

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US03/05421 ✓

International filing date (day/month/year)
25 February 2003 (25.02.03)

International publication date (day/month/year)
Not yet published

Priority date (day/month/year)
25 February 2002 (25.02.02)

Applicant

ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
25 Febr 2002 (25.02.02)	60/360,134	US	07 April 2003 (07.04.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740-1435

Authorized officer

ALI SOLEIMAN

Telephone No. (41-22) 338 8554

Form PCT/IB/304 (July 1998)

005804892

PATENT COOPERATION TREATY

TSR/MXM

From the INTERNATIONAL BUREAU

290

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

SWISS, Gerald, F.
Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP
P.O. Box 1404
Alexandria, VA 22313-1404
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 16 April 2003 (16.04.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 002010-797	International application No. PCT/US03/05421 ✓

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

ELAN PHARMACEUTICALS, INC. (for all designated States except US)
TAYLOR, Julie et al (for US)

International filing date : 25 February 2003 (25.02.03)

Priority date(s) claimed : 25 February 2002 (25.02.02)

23 April 2002 (23.04.02)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 07 April 2003 (07.04.03)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZWnm
5/6/03

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: SUAREZ Javier
Facsimile No. (41-22) 740-1435	Telephone No. (41-22) 338 9898

Form PCT/IB/301 (April 2002)

005590020

DML
5/6/03

Continuation of Form PCT/IB/30

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

291

Date of mailing (day/month/year) 16 April 2003 (16.04.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 002010-797	International application No. PCT/US03/05421

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- ☐ confirmation of precautionary designations (if applicable)
- ☒ requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

292

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office where a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 18 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19928, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(e) before the expiration of 15 months from the priority date (this time limit may not be extended). If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. The Notice of confirmation and payment must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 18 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 18-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 18-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 18-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT REQUEST

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.01.2003)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	002010-797
I	Title of invention	ADMINISTRATION OF AGENTS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATION
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
II-5	Address:	800 Gateway Boulevard South San Francisco, CA 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	(650) 877-0900
II-9	Facsimile No.	(650) 553-7165
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	TAYLOR, Julie
III-1-5	Address:	1506 7th Avenue San Francisco, CA 94122 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

002010-787

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 02:08:58 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	YEDNOCK, Ted, A.
III-2-5	Address:	184 Arroyo Road Forest Knolls, CA 94933 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SWISS, Gerald, F.
IV-1-2	Address:	Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP P.O. Box 1404 Alexandria, VA 22313-1404 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(703) 836-6620
IV-1-4	Facsimile No.	(703) 836-2021
IV-1-5	Agent's registration No.	30,113
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	REA, Teresa, Stanek(30,427); MEYER, Mercedes, K.(44,939); WILLIAMS, Jay, F.(48,036)
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT SE SI SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

PCT REQUEST

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	25 February 2002 (25.02.2002)
VI-1-2	Number	60/360,134
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	23 April 2002 (23.04.2002)
VI-2-2	Number	60/374,501
VI-2-3	Country	US
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)

PCT REQUEST

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	2	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

297

PCT REQUEST

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

VIII-2-1 (i)	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)). In a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name:	in relation to this international application ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1 (ii)		ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled as employer of the inventor, TAYLOR, Julie
VIII-2-1 (iii)		ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled as employer of the inventor, YEDNOCK, Ted, A.
VIII-2-1 (ix)	This declaration is made for the purposes of:	all designations except the designation of the United States of America

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(II) and 51bis.1(a)(II)): Name:	in relation to this international application ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 06/374,134 by virtue of the following:
VIII-3-1 (II)		ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled as employer of the inventor, TAYLOR, Julie
VIII-3-1 (II)		ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled as employer of the inventor, YEDNOCK, Ted, A.
VIII-3-1 (ix)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

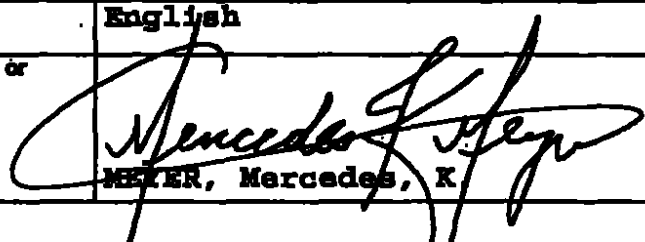
VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(II) and 51bis.1(a)(II)); Name:	in relation to this international application ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 60/374,501 by virtue of the following:
VIII-3-2 (II)		ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled as employer of the inventor, TAYLOR, Julie
VIII-3-2 (II)		ELAN PHARMACEUTICALS, INC. is entitled as employer of the inventor, YEDNOCK, Ted, A.
VIII-3-2 (ix)	This declaration is made for the purposes of:	all designations

300

PCT REQUEST

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	8	-
IX-2	Description	61	-
IX-3	Claims	7	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	19	-
IX-7	TOTAL	96	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-18	Other (specified):	Transmittal Letter, Receipt Cards and Check	-
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	7	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	HEISER, Mercedes, K	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

301

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only			
0-1	International Application No.			
0-2	Date stamp of the receiving Office			
0-4	Form - PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.01.2003)		
0-8	Applicant's or agent's file reference	002010-797		
2	Applicant	ELAN PHARMACEUTICALS, INC., et al.		
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (USD)	
12-1	Transmittal fee T	⇒	240	
12-2-1	Search fee S	⇒	700	
12-2-2	International search to be carried out by	US		
12-3	International fee			
	Basic fee			
	(first 30 sheets) b1	407		
12-4	Remaining sheets	66		
12-5	Additional amount (X)	9		
12-6	Total additional amount b2	594		
12-7	b1 + b2 = B	1,001		
12-8	Designation fees			
	Number of designations contained in international application	94		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 5)	5		
12-10	Amount of designation fee (X)	88		
12-11	Total designation fees D	440		
12-12	PCT-EASY fee reduction R	-125		
12-13	Total international fee (B+D-R) I	⇒	1,316	
12-14	Fee for priority document			
	Number of priority documents requested	2		
12-15	Fee per document (X)	20		
12-16	Total priority document fee P	⇒	40	
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	⇒	2,296	
12-18	Mode of payment	cheque		
12-20	Deposit account instructions			
	The receiving Office:	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)		
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓		

302

2/2

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

002010-797

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.02.2003 12:02:18 PM

12-21	Deposit account No.	02-4800
12-22	Date	25 February 2003 (25.02.2003)
12-23	Name and signature	MEYER, Mercedes, K. 

VALIDATION LOG AND REMARKS

13-2-7	Validation messages Contents	Yellow! The power of attorney or a copy of the general power of attorney will need to be furnished unless all applicants sign the request form.
--------	---------------------------------	---

303



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

COMMISSIONER FOR PATENTS
UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. 20231
www.uspto.gov

APPLICATION NUMBER	FILING DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY. DOCKET NO	DRAWINGS	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
80/374,501	04/23/2002		180	002010-716	22		

CONFIRMATION NO. 5182

21839

BURNS DOANE SWECKER & MATHIS L L P
POST OFFICE BOX 1404
ALEXANDRIA, VA 22313-1404

FILING RECEIPT



OC00000008213478

Date Mailed: 05/31/2002

Receipt is acknowledged of this provisional Patent Application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. If an error is noted on this Filing Receipt, please write to the Office of Initial Patent Examination's Filing Receipt Corrections, facsimile number 703-746-9195. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).

Applicant(s)

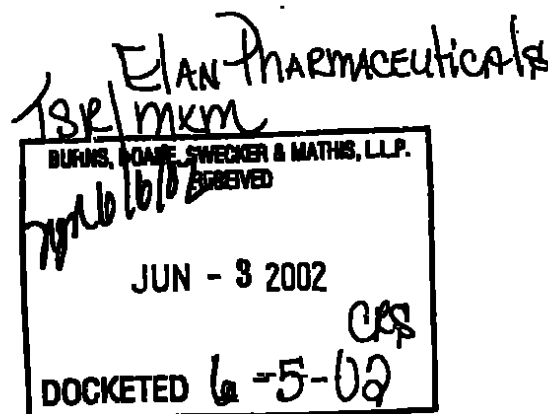
Julie Taylor, San Francisco, CA;
Ted A. Yednock, Forest Knolls, CA;

If Required, Foreign Filing License Granted 05/31/2002

Projected Publication Date: Not Applicable

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No



Title

Administration of agents for the treatment of inflammation

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER
Title 35, United States Code, Section 184
Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15

GRANTED

JUN 1 2002

304

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Office of Export Administration, Department of Commerce (15 CFR 370.10 (j)); the Office of Foreign Assets Control, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

306

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

USUARIO RADICACION

PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD

- Indicacion de que se solicita la concesion de una patente () ()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud () ()
- Descripcion de la invencion () ()
- Dibujos de ser estos pertinentes () ()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial () ()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud () ()
- Representacion grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseno () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO

- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado () ()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud () ()
- Representacion grafica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

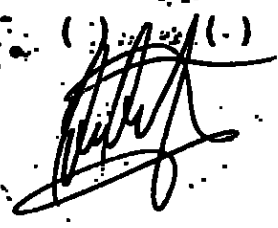
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 0495478 00000000

Folios: 304

Firma Responsable: Fecha (AMB): 2004-05-24 17:23:46

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PALENTAR
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Fecha:

2020

Bogotá D C

306

Doctor(a)
DILIA MARIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN
Apoderado
ELAN PHARMACEUTICALS

Oficio N° **09336**

ASUNTO:

Radicación N°	04-95478
Solicitud internacional	PCT/US03/05421
Fecha inicio fase nacional	2004-09-25
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, porque la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA GESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
08 OCT. 2004
202063