



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 994**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/576** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**C12N 5/20** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99922996 .6**

(96) Fecha de presentación : **12.05.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1078006**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

(54) Título: **Diagnóstico y tratamiento de trastornos hepáticos.**

(30) Prioridad: **13.05.1998 US 78405**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.06.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.06.2009**

(73) Titular/es: **Genentech, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

(72) Inventor/es: **Fong, Sherman y**  
**Hillan, Kenneth, J.**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

## DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y tratamiento de trastornos hepáticos.

## 5 Antecedentes de la invención

## Campo de la invención

Esta invención está relacionada con procedimientos y composiciones que pueden ser utilizadas en la profilaxis, el  
10 tratamiento y la gestión de trastornos hepáticos, especialmente aquellos caracterizados por inflamación. Se describen  
también procedimientos y reactivos útiles en la prognosis y en el diagnóstico de trastornos hepáticos inflamatorios.

## Descripción de informaciones relacionadas

15 El reclutamiento y la recirculación de leucocitos procedentes de la sangre, a través del tejido, hacia el sistema  
linfático y de regreso a la sangre constituyen acontecimientos clave en el proceso inflamatorio asociado con lesión  
tisular, infección o deposición de antígeno (Springer, T., (1994), 76:301-314; Berlin *et al.*, (1995) Cell. 80:413-422;  
Schweighoffer *et al.*, (1993) J. Immunol., 151: 717-729). Estos acontecimientos son regulados a nivel molecular a  
20 través de interacciones entre diversas moléculas especializadas sobre la superficie de leucocitos circulantes y células  
endoteliales vasculares (Springer, T., (1994) *supra*). Modelos recientes indican que el reclutamiento o el asentamiento  
de leucocitos de sangre periférica, incluyendo subconjuntos de linfocitos, hacia diversos puntos tisulares procede a  
través de un proceso multipaso que comprende i) un acontecimiento de contacto transitorio primario, ii) un agente  
activador rápido que conlleva receptores de señalización unidos a proteína G y iii) la adhesión firme desencadenada  
por activación (Springer *et al.*, (1994) *supra*). La quimiotaxis y la extravasación de leucocitos hacia el tejido sigue a  
25 estos tres acontecimientos primarios.

La molécula de adhesión celular adreína de la mucosa (MAdCAM-1) está implicada en el asentamiento selectivo  
de linfocitos hacia tejidos de mucosa normal (Berlin *et al.*, (1993) Cell, 74: 185-195; Briskin *et al.*, (1997) Am. J.  
Pathol. 151:97-110). La misma es expresada en un conjunto de vasos restrictivos, que incluye venas endoteliales altas  
30 (HEVs) de los tejidos linfoides asociados a mucosa y dirige el tráfico de linfocitos hacia los parches de Peyer y la  
lámina propia intestinal (Berlin *et al.*, (1993) *supra*). En humanos, la expresión de MAdCAM-1 ha sido asociada con  
tejidos del tracto gastrointestinal (colon e intestino delgado) y con los tejidos linfoides asociados (nódulos linfáticos  
mesentéricos) (Biskin *et al.*, (1997) *supra*). Se ha detectado en el páncreas, en la vesícula biliar, en las vénulas espléni-  
cas y en el sinus marginal de la pulpa blanca esplénica (Kraal *et al.*, (1995) Am. J. Path. 147: 763-771). En escenarios  
35 inflamatorios se ha observado un incremento en la expresión de MAdCAM-1 en HEV, como vasos en el páncreas de  
ratones diabéticos no obesos (Hanninen A, *et al.*, (1993) J. Clin. Invest 92:2509), en venulas lamina propia intestinales  
procedentes de ratones con enfermedad inflamatoria del intestino inducida (Viney J, *et al.*, (1996) J. Immunol. 157:  
2488-2497; Picarella D., *et al.*, (1997) J. Immunol. 158:2099-2016) y en humanos en focos inflamatorios asociados  
con colitis ulcerosa y con la enfermedad de Crohn (Briskin *et al.*, (1997) *supra*). No se ha detectado en la mayoría de  
40 tejidos normales o de tejidos extra-intestinales inflamados (Briskin *et al.*, (1997) *supra*).

Se ha demostrado que la integrina de linfocito  $\alpha 4\beta 7$  interviene en la adhesión de linfocitos (células T memoria) a  
MAdCAM-1 (Tidwell *et al.*, J. Immunol. 159:1497-1505; Walsh *et al.*, (1996) Immunol. 89: 112-119., (1993) Cell, 74:  
185-195). Se ha demostrado que la interacción MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$  interviene en la selección independiente de selectina  
45 y en el rodamiento de linfocitos en flujo fisiológico (Berlin *et al.*, (1995) Cell, 80: 413-422).

Los anticuerpos de MAdCAM-1 y las dos subunidades  $\alpha 4$  y  $\beta 7$  de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  bloquean la unión de linfocitos  
a células que expresan MAdCAM-1 (Berlin *et al.*, (1993) Cell, 74: 185-195). Se ha demostrado que el bloqueo de  
MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$  reduce el tráfico de linfocitos y reduce la gravedad del infiltrado inflamatorio y el grado de lesión  
50 tisular en modelos experimentales de enfermedad de intestino inflamado (Picarella *et al.*, (1997) J. Immunol. 158  
(5):2099-2016; Hesterberg *et al.*, (1996) Gastroenterology III: 1373-1380). Para evitar el reclutamiento de leucocitos  
asociado a MAdCAM-1 hacia el tracto gastrointestinal, se han propuesto diversos inhibidores potentes de la interacción  
MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$  (publicación de solicitud de patente internacional N°. WO 96/24673, publicación Internacional N°.  
WO 97/25351).

## 55 Resumen de la invención

La presente invención abarca procedimientos, usos y agentes, tal y como se define en las reivindicaciones, que re-  
sultan de utilidad en la diagnosis, prognosis y tratamiento de trastornos hepáticos. Los procedimientos, usos y agentes  
60 de la invención pueden ser utilizados en la diagnosis, la prognosis y el tratamiento de una diversidad de trastornos  
hepáticos caracterizados por reclutamiento de leucocitos asociado con MAdCAM-1 hacia el hígado, el cual puede  
ser incluir cualquier enfermedad sistémica o trastorno caracterizado por la expresión de MAdCAM-1, incluyendo in-  
fecciones, especialmente infecciones víricas, trastornos autoinmunes, trastornos iatrogénicos, trastornos hereditarios,  
trastornos colestáticos, sarcoidosis, trasplante de órgano y la enfermedad de injerto frente a huésped, posterior a  
65 trasplante de médula ósea. La invención es utilizada preferiblemente para tratar la hepatitis, especialmente la he-  
patitis vírica y la hepatitis autoinmune, trastornos colestáticos, tales como la cirrosis biliar primaria y la colangitis  
esclerosante primaria y el rechazo de aloinjerto.

Los procedimientos de tratamiento a los que se refiere la presente invención comprenden la administración, a un huésped que precisa de ello, de un agente que evita la interacción de la MAdCAM-1 con la integrina  $\alpha 4\beta 7$ . Los procedimientos resultan de utilidad a la hora de evitar el reclutamiento hacia el hígado de leucocitos asociado con MAdCAM-1, al igual que para inhibir un acontecimiento primario en la respuesta inflamatoria, tal como el bloqueo de las interacciones entre las moléculas de adhesión intercelular y sus ligandos. En realizaciones preferidas, los procedimientos son utilizados para reducir o evitar la infiltración de  $\alpha 4\beta 7$  que soporta leucocitos hacia el hígado, reduciendo con ello la gravedad de la inflamación y el grado de lesión tisular en la enfermedad hepática o en el trastorno tratado.

La invención incluye agentes, tales como anticuerpos, para su utilización en el tratamiento de trastornos hepáticos, tal y como se define en las reivindicaciones.

Se describen también procedimientos, usos y agentes que resultan de utilidad en la prognosis y la diagnosis de trastornos hepáticos caracterizados por el reclutamiento hacia el hígado de leucocitos asociado con MAdCAM-1. Entre las enfermedades o trastornos susceptibles de prognosis y diagnosis bajo la presente invención se incluyen aquellas enfermedades y trastornos que son tratables dentro del contexto de la presente invención. Los procedimientos de diagnosis pueden ser utilizados para detectar la presencia de MAdCAM-1 en una muestra, especialmente en una biopsia de hígado, o la presencia de leucocitos infiltrantes que soportan un ligando para MAdCAM-1 en la muestra. Los procedimientos, usos y agentes pueden ser utilizados para detectar el trastorno o para monitorizar, escenificar o predecir el curso de la enfermedad o de la terapia utilizada para tratar el trastorno.

### Breve descripción de los gráficos

Figuras 1A-1C. La Figura 1A muestra la expresión de MAdCAM-1 (flecha) en vénulas endoteliales altas en nódulos linfáticos humanos adultos normales. La Figura 1B muestra la expresión de MAdCAM-1 (flecha) en bazo humano adulto normal. La expresión fue observada en células de forma dendrítica que rodean la pulpa blanca esplénica. La Figura 1C muestra la expresión de MAdCAM-1 (flecha) en vasos capilares en páncreas humano adulto.

Figuras 2A-2D. Muestras de enfermedades representativas. La Figura 2A muestra la expresión de MAdCAM (flecha) en vasos capilares pequeños dentro del trato del portal hepático inflamado. La Figura 2B muestra la expresión de MAdCAM-1 (flecha) en canales vasculares dilatados, dentro de los tractos portales hepáticos en humanos. La Figura 2C muestra la expresión de MAdCAM-1 (flecha) o de células de Kupffer que rodean un agregado linfoide dentro del tracto del portal hepático. La Figura 2D muestra la expresión de MAdCAM-1 (flecha) en canales vasculares dilatados en el interior de portales hepáticos inflamados en humanos.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas.

#### Definiciones

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando son utilizadas en la descripción, ejemplos y reivindicaciones.

Los términos “MAdCAM” o “MAdCAM-1” se utilizan de forma intercambiable en el contexto de la presente invención y se refieren a la proteína molécula-1 de adhesión celular adreína de la mucosa, que es un polipéptido de cadena sencilla que comprende una cola citoplásmica corta, una región transmembrana y una secuencia extracelular de tres dominios de tipo inmunoglobulina. Los cDNAs para MAdCAM-1 de murino, humano y macaco han sido clonados (Briskin *et al.*, (1993), 363: 461-464; Shyjan *et al.*, (1996) J. Immunol. 156: 2851-2857).

Por “parte o ligando de unión a MAdCAM” se quiere dar a entender una molécula que interacciona con MAdCAM. La molécula puede ser de origen natural y puede ser soluble o estar localizada en la superficie de una célula. Un conocido ligando de MAdCAM es la integrina de linfocito  $\alpha 4\beta 7$  (de ahora en adelante, “ $\alpha 4\beta 7$ ”), una estructura heterodímera que comprende una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . La subunidad  $\alpha 4$  humana (Kilger and Holmann (1995) J. Mol. Biol. 73: 347-354) se asocia con la subunidad  $\beta 7$  (Erle *et al.*, (1991) J. Biol. Chem. 266: 11009-11016) y está expresada en la mayoría de linfocitos maduros, al igual que en una pequeña población de timocitos, células de médula ósea y células mas. (Kilshaw and Murrant (1991) Eur. J. Immunol. 21:2591-2597 y Gurish *et al.*, (1992) 149: 1964-197. En humanos, el anticuerpo monoclonal ACT-1 (Lazarovits *et al.*, (1984) J. Immunol. 133 (4): 1857-1862 ha sido utilizado para identificar el heterodímero  $\alpha 4\beta 7$  en células B y en células T humanas.

El término “tratamiento”, tal y como se utiliza en el contexto de la presente invención incluye el tratamiento terapéutico y el tratamiento profiláctico o medidas supresoras para la enfermedad o el trastorno. Por tanto, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente con anterioridad o después del inicio de una enfermedad o trastorno, evitando o eliminando con ello todas las señales de la enfermedad o trastorno. Como ejemplo adicional, la administración del agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el “tratamiento” de la enfermedad. Además, la administración del agente después del inicio y después de que los síntomas clínicos se han desarrollado, cuando la administración afecta a los parámetros clínicos de la enfermedad o trastorno, tal como el grado de lesión tisular o la cantidad o extensión de tráfico de leucocitos y quizás la mejoría de la enfermedad, comprende el “tratamiento” de la enfermedad.

Entre los que se encuentran en “necesidad de tratamiento” se incluyen mamíferos, tales como humanos, que ya padecen la enfermedad o trastorno, incluyendo aquellos en los cuales tienen que evitarse la enfermedad o trastorno.

5 Las expresiones “agente”, composición y “antagonista” se utilizan dentro del campo de cobertura de la presente invención de forma intercambiable e incluyen cualquier molécula o sustancia, tal y como se ha definido en las reivindicaciones, que evita la interacción entre MAdCAM-1 y un ligando o parte de unión a MAdCAM, tal como el antígeno de superficie de leucocito  $\alpha 4\beta 7$ . Las citadas moléculas incluyen pequeñas moléculas bioorgánicas, por ejemplo, peptidomiméticos, anticuerpos, inmunoadhesinas, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, 10 polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias control de traducción y transcripcionales, y similares, sujeto a las limitaciones impuestas por las reivindicaciones.

El término “inflamación” se utiliza aquí para hacer referencia a reacciones de tanto los sistemas de defensa específicos como los no específicos. Una reacción de sistema de defensa específico es una reacción de sistema inmune específica frente a un antígeno. Entre los ejemplos de reacciones de sistema de defensa específico se incluyen respuestas de anticuerpo y de célula T frente a antígenos, tales como virus, e hipersensibilidad de tipo retardado. Una reacción de sistema de defensa no específico es una respuesta inflamatoria mediada por leucocitos, generalmente incapaz de memoria inmunológica. Entre las citadas células se incluyen macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Entre los ejemplos 20 de reacciones no específicas se incluyen el hinchamiento subsiguiente a la picadura de una abeja y la recogida de leucocitos PMN en puntos de infección bacteriana, por ejemplo, infiltrados pulmonares en neumonías bacterianas y de formación de pus en abscesos.

El término “trastorno iatrogénico” hace referencia a aquellos trastornos inducidos por la exposición a un compuesto terapéutico, que tiene la finalidad de tratar algún otro trastorno. Entre los ejemplos de enfermedades o trastornos hepáticos inducidos por fármaco se incluyen, por ejemplo, la hepatitis activa crónica asociada con la administración de Aminopetina, Clometacina, Dantroleno, Diclofenaco, Fenofibrato, por citar solo unos pocos; colestasis crónica asociada con la administración de Aceprometazina, Ajmalina y fármacos relacionados, Amitriptilina, y Ampicilina, por citar unos pocos; o granulomas hepáticos asociados con la administración de Allopurinol, Aspirina, y Diazepam, 30 por citar solo unos pocos. En este contexto, se puede hacer referencia a las Tablas 15.10, 15.8 y 15.11 de Pathology of the Liver, 3rd. Edition, (Macsean, Anthony, Scheuer, Burt y Portman, eds.) Churchill Livingstone (1994), cuya descripción se incorpora en el presente documento en su totalidad, a través de referencia.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre, específicamente, anticuerpos monoclonales 35 simples (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) y composiciones de anticuerpos con especificidad polipeptídica.

El término “anticuerpo monoclonal” (mAb), tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, a saber, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos, con la excepción de posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos frente a un punto antigénico sencillo. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos frente a determinantes diferentes (epítopes), cada uno de los mAb se dirige frente a un determinante sencillo en el antígeno. Además de su especificidad, 45 los anticuerpos monoclonales resultan ventajosos en el sentido de que pueden ser sintetizados a través de cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas.

Entre los anticuerpos monoclonales del presente documento se incluyen anticuerpos recombinantes e híbridos producidos uniendo un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos “humanizados”) de otro anticuerpo, o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena procedente de una especie con una cadena procedente de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, sin tener en cuenta las especies de origen o la clase de inmunoglobulinas o la designación de subclase, al igual que fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv), siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. (ver, por ejemplo, Cabilly *et al.*, Patente USA N°. 4.816.567. Mage and Lamoyi, en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 79-97 (Marcel Dekker, Inc. New York, 1987).). 55

Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no tiene que ser construida como que requiriere la producción del anticuerpo a través de cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que tienen 60 que ser utilizados según la presente invención pueden ser obtenidos a través del procedimiento hibridoma descrito primeramente por Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975) o pueden ser obtenidos a través de procedimientos de DNA recombinante (Cabilly *et al.*, *supra*).

Entre los anticuerpos monoclonales mencionados en el presente documento se incluyen anticuerpos “quiméricos” 65 (inmunoglobulinas), en los cuales una parte de la cadena pesada y/o de la cadena ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo,

al igual que los fragmentos de los citados anticuerpos, en tanto en cuanto muestren la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, *supra*; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos), que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos procedentes de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por restos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que presenta la deseada especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, restos marco Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada ni en las secuencias marco. Estas modificaciones se efectúan para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente todas las regiones FR corresponden a la secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones *et al.*, Nature 321: 522 (1986); Reichmann *et al.*, Nature 332: 323 (1988); y Presta, Curr. Op. Struc. Biol. 2: 593 (1992).

Un anticuerpo “aislado” es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo, tal y como se determina a través del procedimiento de Lowry y, muy preferiblemente, más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener, al menos, 15 restos de secuencia de aminoácido interno o N-terminal, mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta homogeneidad, por medio de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Entre los anticuerpos aislados se incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, dado que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, no obstante, el anticuerpo aislado se preparará a través de al menos un paso de purificación.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan el “dominio de unión” de una proteína heteróloga, por ejemplo MAdCAM (una “adhesina”, por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácido de adhesina con la especificidad de unión deseada, distinta a la del punto de unión y reconocimiento de antígeno (punto de combinación de antígeno) de un anticuerpo (a saber, es “heteróloga”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede ser obtenida a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como IgG, IgM, IgE, IgA y cualquiera de sus subclases o isotipos.

#### *Modos de llevar a cabo la invención*

##### *Enfermedades y trastornos hepáticos*

Los procedimientos, usos y agentes de la invención resultan útiles en la diagnosis, prognosis y tratamiento de una diversidad de trastornos caracterizados por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado. Por ejemplo, los procedimientos, usos y agentes de la invención resultan de utilidad en la diagnosis, prognosis y tratamiento de una diversidad de trastornos hepáticos, incluyendo aquellos que resultan de infección, trastornos iatrogénicos, trastornos hereditarios, trastornos autoinmunes, síndromes colestáticos, sarcoidosis, trasplante de órganos y similares, siempre y cuando el trastorno se caracteriza por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM para el hígado.

Dentro de las enfermedades o trastornos abarcadas por la presente invención se incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, las enfermedades y trastornos detallados en la Tabla 1.

| TABLA 1                                                                      |                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Enfermedades y trastornos sistémicos que conllevan la inflamación del hígado |                                                    |
| A                                                                            | Hepatitis                                          |
| 1.                                                                           | Cualquier inflamación del hígado, tal como ocurre, |

| TABLA 1                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Enfermedades y trastornos sistémicos que conllevan la inflamación del hígado |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                              | por ejemplo, en el caso de hepatitis aguda, hepatitis crónica, hepatitis alcohólica y cirrosis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 2                                                                            | <p>Infección</p> <p>-Cualquier inflamación del hígado que resulta de infección, especialmente de infección vírica, especialmente hepatitis vírica crónica, por ejemplo, inflamación asociada con:</p> <p>a) Hepatitis A, virus picorna</p> <p>b) Hepatitis B, virus hepadna (carcinoma hepatocelular)</p> <p>c) Hepatitis C, flavivirus</p> <p>d) Hepatitis D (A), virus RNA incompleto (requiere co-infección con hepatitis B)</p> <p>e) Hepatitis E, hebra sencilla, genoma RNA sentido positivo</p> <p>f) Hepatitis F,</p> <p>g) Hepatitis G (HGBH-C), virus RNA de hebra sencilla</p> <p>h) Virus Epstein-Barr</p> <p>i) Citelomegalovirus</p> <p>j) Adenovirus</p> <p>k) Otras infecciones víricas del hígado</p> |
| 3.                                                                           | Autoinmune                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| A                                                                            | Hepatitis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                                                              | Cualquier inflamación del hígado asociada con el inicio autoinmune de etiología conocida o desconocida, habitualmente asociada con infiltración de linfocito significativa en los tractos portal y necrosis de interfase asociada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 4.                                                                           | <p>Iatrogénica</p> <p>-Cualquier inflamación del hígado inducida por fármaco, incluyendo por ejemplo hepatitis activa crónica, colestasis o formación de granuloma.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

TABLA 1  
Enfermedades y trastornos sistémicos que conllevan la  
inflamación del hígado

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5. | Hereditaria<br>Cualquier inflamación asociada con el trato unido a<br>gen, por ejemplo cambios cirróticos en el hígado<br>asociados con degeneración hepatolenticular.<br>a) Enfermedad de Wilson<br>b) Deficiencia en $\alpha$ 1-antitripsina<br>c) Otros trastornos metabólicos heredados, por<br>ejemplo, galactosemia.          |
| B  | Síndromes colestáticos<br><br>-Cualquier inflamación de los conductos biliares<br>intrahepáticos, incluyendo aquellos que resultan de<br>la disfunción hepática y la cirrosis, como por<br>ejemplo en cirrosis biliar primaria, colangitis<br>esclerosante primaria y ductopenia idiopática en<br>adulto                            |
| C  | Transplante<br><br>-Cualquier inflamación del hígado o de los conductos<br>hepáticos incluyendo los asociados con transplante<br>hepático, lesión del hígado en injerto frente a<br>enfermedad de huésped y receptores renales y de otros<br>aloinjertos, por ejemplo, rechazo de aloinjerto<br>hiperagudo y rechazo de xenoinjerto |

Son trastornos particularmente preferidos dentro del contexto de la invención la hepatitis crónica, particularmente la hepatitis que resulta de infección, particularmente de infección vírica. En esta categoría se incluyen las categorías serológicas establecidas de hepatitis crónica, incluyendo la hepatitis vírica (HBV, HDV, HCV), la hepatitis autoinmune (de tipo lupoide clásico y subtipos), síndromes de solapamiento autoinmune, hepatitis inducida por fármaco (por ejemplo, nitrofurantoína, alfa-metildopa, isoniazida) y la denominada hepatitis "criptogénica". En este sentido, el experto en la materia hará referencia al capítulo 9, y especialmente las Tablas 9.2 y 9.3 en Pathology of the Liver, 3rd. Edition, (Macseen, Anthony, Scheuer, Burt and Portman, eds.) Churchill Livingstone (1994) cuyo contenido es incorporado en el presente documento en su integridad a través de referencia. Tal y como reconocerá el experto en la materia, algunas enfermedades crónicas del hígado no incluidas dentro de la definición de hepatitis crónica pueden presentar características histológicas de la hepatitis crónica (por ejemplo, necrosis de interfase). Estos trastornos tales como, por ejemplo, enfermedades de los conductos biliares intra o extra-hepáticos, quedan incluidos dentro de la definición del presente documento. Se sabe que la infección con un determinado número de virus da lugar a inflamación grave del hígado, incluyendo los virus de hepatitis, hepatitis A (HAV), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), hepatitis D (HDV, agente delta), hepatitis E, hepatitis F y otros virus tales como el virus Epstein-Barr, citomegalovirus, adenovirus, paramixovirus, y similares. Hasta la fecha se han identificado al menos siete tipos de virus de hepatitis (designados como A-G). De estos, uno de los más devastadores es el virus de la hepatitis C (HCV, denominado también no-A, no-B). Se estima que 3,9 millones de personas en los Estados Unidos están actualmente infectados por el HCV y se estiman entre 8.000 y 10.000 los fallecimientos anuales que resultan de enfermedades crónicas hepáticas asociadas a HCV. Las terapias actuales incluyen el  $\gamma$ -interferón, empliasize B y la ribavirina, cada una de las cuales presenta una eficacia limitada y generan graves efectos secundarios. La terapia actual incluye también el transplante, no obstante, dado que los individuos infectados permanecen infectados con el virus, los pacientes post-transplante inmunodeprimidos

muestran niveles de RNA vírico incrementados y avanzan rápidamente hacia la enfermedad hepática con el hígado nuevo.

Los síndromes colestáticos crónicos se caracterizan por la destrucción inflamatoria progresiva de los conductos biliares intra-hepáticos, dando lugar a disfunción hepática, fibrosis y cirrosis. Entre los ejemplos de este tipo de trastorno se incluyen la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria y la ductopenia idiopática.

Entre los trastornos hereditarios tratables a través de los procedimientos descritos en el presente documento se incluyen los trastornos inflamatorios asociados con un trato asociado a gen. Entre los ejemplos se incluyen la enfermedad de Wilson, la deficiencia en  $\alpha$ 1-antitripsina y los trastornos metabólicos hereditarios, tales como la galactosemia y la tirosinemia.

#### *Diagnosis y prognosis de un trastorno hepático*

Los trastornos hepáticos para prognosis y diagnosis dentro del contexto de la presente invención se han descrito anteriormente y se caracterizan por la presencia de MAdCAM en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido hepático o, sorprendentemente, una muestra libre de células, tal como suero. Por consiguiente, una realización de la presente invención va dirigida a la detección y/o medición de MAdCAM en una muestra y el uso de la citada detección o medición en la diagnosis, posicionamiento, la determinación de la gravedad y la prognosis en general de la enfermedad o trastorno hepático. Además, dado que se ha demostrado que la expresión de MAdCAM está correlacionada con la presencia de linfocitos que soportan la integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, la prognosis y la diagnosis de trastornos hepáticos dentro del contexto de la presente invención abarca la medición o la detección de la presencia de linfocitos que soportan la integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 7.

#### *A. Detección de MAdCAM soluble o exenta de células*

La presente invención incluye un procedimiento para la diagnosis y la prognosis de enfermedades y trastornos hepáticos, basados en el descubrimiento de que la MAdCAM puede ser detectada en el suero de un sujeto.

Preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre y, especialmente, una muestra de suero.

Los procedimientos proporcionados por la presente invención superan muchas de las limitaciones de los procedimientos del estado de la técnica referidos a la medición o la detección de MAdCAM, los cuales, hasta la fecha, requerían muestras que comprendían células, seguido de técnicas inmunohistoquímicas o de análisis de inmunofluorescencia directa o indirecta, por medio de microscopía i citometría de flujo. Entre las limitaciones de los procedimientos del estado de la técnica se incluyen los requisitos de disponer de: (1) muestras de tejidos bastante raros que comprenden un gran número de células, (2) tiempo de preparación amplio y (3) equipo amplio, tal como un citómetro de flujo. Los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten superar estas limitaciones.

Cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica para la medición de analitos puede ser utilizado en la práctica para la medición de MAdCAM en una muestra. Entre los citados procedimientos se incluyen, sin que ello represente una limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos de enzimas (EIA), preferiblemente el ensayo inmunosorbente vinculado a enzima (ELISA), inmunoensayos "sándwich", reacciones con precipitina, reacciones de difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación complementaria, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con Proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, por citar solo unos pocos. Para ejemplos de procedimientos de inmunoensayos preferidos ver las patentes US N°. 4.845.026 (4 julio 1989) y N°. 5.006.459 (9 abril 1991).

Para aplicaciones en diagnosis y prognosis, una parte de unión a MAdCAM, habitualmente un anticuerpo, será etiquetada con un resto detectable y utilizada para detectar MAdCAM en una muestra, tal y como se ha descrito anteriormente. Numerosas etiquetas se encuentran disponibles, las cuales pueden ser preferiblemente agrupadas en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ . La parte de unión a MAdCAM, tal como un anticuerpo, puede ser etiquetada con el radioisótopo, utilizando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs., (1991) por ejemplo y la radioactividad puede ser medida utilizando conteo de centelleo.

(b) Etiquetas fluorescentes, tales como quelatos de tierra rara (quelatos de europium) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y Texas Red se encuentran disponibles. Las etiquetas fluorescentes pueden ser conjugadas con la parte de unión a MAdCAM, tal como un anticuerpo, utilizando, por ejemplo, las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, *supra*. La fluorescencia puede ser cuantificada utilizando un fluorímetro.

(c) Se dispone de diversas etiquetas enzima-sustrato y la patente US 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de ellas. El enzima cataliza preferiblemente una alteración química del sustrato cromogénico, la cual puede ser medida utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, el enzima puede catalizar un cambio de color en un sustra-

to, el cual puede ser medido espectrofotométricamente. Alternativamente, el enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente deviene excitado electrónicamente a través de una reacción química y puede entonces emitir luz, que puede ser medida (por ejemplo, utilizando un quimioluminómetro) o donar energía a un aceptante fluorescente. Entre los ejemplos de etiquetas enzimáticas se incluyen las luciferasas (por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana; patente US N°. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tales como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido-oxidasas (por ejemplo, glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina-oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. En O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (Ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147-166 (1981) se describen técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos.

Entre los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como un sustrato, en donde la peroxidasa ácida oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o hidrocloreto de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) Fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii)  $\beta$ -3-D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

Los expertos en la materia disponen de numerosas combinaciones adicionales de enzima-sustrato, ver las patentes US N°. 4.275.149 y 4.318.980.

En los ensayos de la presente invención, una parte de unión a MAdCAM, tal como un anticuerpo, se une preferiblemente a un soporte o portador en fase sólida. Por "soporte o portador en fase sólida" se quiere dar a entender cualquier soporte que sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Entre la relación de soportes o portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas de tipo natural o modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del soporte puede adoptar virtualmente cualquier posible configuración, siempre y cuando la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración portadora puede ser esférica, como en una bola, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie exterior de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana, como una lámina, tira de ensayo, etc. Entre los soportes preferidos se incluyen las bolitas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros portadores adecuados para unión a anticuerpo o antígeno, o serán capaces de averiguar lo mismo mediante la utilización de experimentación rutinaria.

En una realización preferida, se efectúa un inmunoensayo sándwich anticuerpo-MAdCAM-anticuerpo, a saber, la MAdCAM es detectada o medida a través de un procedimiento que comprende la unión de un primer anticuerpo con el antígeno de MAdCAM y la unión de un segundo anticuerpo con la MAdCAM y la detección o medición de la inmunoespecificidad de MAdCAM unida tanto con el primer como con el segundo anticuerpo. En una realización específica, el primer y el segundo anticuerpo son anticuerpos monoclonales. En esta realización, el segundo anticuerpo monoclonal se une preferiblemente a un punto distinto del de unión con el primer anticuerpo (tal y como se refleja, por ejemplo, a través de la falta de inhibición competitiva entre los dos anticuerpos para su unión con el antígeno). En otra realización específica, el primer y el segundo anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En todavía otra realización, tanto el primero como el segundo anticuerpo son anticuerpos policlonales.

En una realización preferida se utiliza un inmunoensayo de enzima sándwich "avanzado", tal y como se describe esquemáticamente más adelante. Un anticuerpo (anticuerpo de captura, Ab1), dirigido frente a la MAdCAM, se une a una matriz en fase sólida, preferiblemente a una microplaca. La muestra es puesta en contacto con la matriz revestida con Ab1, de tal forma que cualquier MAdCAM en la muestra para la que el Ab1 resulte específico, se una a la fase sólida Ab1. Los componentes de la muestra no unidos son eliminados mediante lavado. Un segundo anticuerpo conjugado por enzima (anticuerpo de detección, Ab2), dirigido frente a un segundo epítipo de la MAdCAM, se une al antígeno capturado por el Ab1 y completa el sándwich. Después de eliminar el Ab2 no unido mediante lavado, se añade un sustrato cromogénico para el enzima y se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de enzima presente en el sándwich, lo cual refleja la cantidad de MAdCAM en la muestra. La reacción finaliza mediante la adición de solución finalizadora. El color se mide como absorbancia a una determinada longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro. Se prepara una curva estándar a partir de concentraciones conocidas de la MAdCAM, a partir de la cual pueden determinarse valores de muestras desconocidas.

Otros tipos de ensayos "sándwich" son los denominados ensayos "simultáneos" y los ensayos "inversos". Un ensayo simultáneo conlleva un paso de incubación sencillo, dado que el anticuerpo unido y el anticuerpo etiquetado son ambos añadidos al mismo tiempo a la muestra que está siendo objeto de comprobación. Una vez completada la incubación, el soporte sólido es lavado para eliminar el resto de muestra de fluido y el anticuerpo etiquetado no

complejado. La presencia de anticuerpo etiquetado asociado con el soporte sólido de determina posteriormente como se hubiera hecho en un ensayo sándwich “avanzado”.

En el ensayo “inverso”, se utiliza la inicial adición gota a gota de una solución de anticuerpo etiquetado a la muestra de fluido, seguido de la adición de anticuerpo no etiquetado unido a un soporte sólido, después de un período de incubación adecuado. Tras una segunda incubación, se lava la fase sólida de forma convencional para liberarla del resto de la muestra que está siendo objeto de comprobación y la solución de anticuerpo etiquetado no reaccionado. La determinación de anticuerpo etiquetado asociado con un soporte sólido se lleva a cabo entonces, tal y como ocurre en los ensayos “simultáneos” y “avanzados”.

#### B. Procedimientos de diagnosis y de prognosis en general

Los procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados en solitario o en conjunción con otras pruebas de diagnóstico, para la diagnosis y la detección de un trastorno hepático. Las infecciones víricas pueden ser detectadas utilizando técnicas conocidas por los expertos. La infección por hepatitis C puede ser detectada, por ejemplo, utilizando ensayos serológicos disponibles comercialmente, los cuales detectan los anticuerpos anti-HCV o ensayos moleculares que detectan los genomas RNA de HCV dentro de un paciente infectado. Los procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados en solitario o en conjunción con estas pruebas rutinarias, como ayuda en la diagnosis. Como ejemplo adicional, en muchos casos, la causa específica de un trastorno hepático se identifica en base a elevadas pruebas de función hepática o a un hígado agrandado. Los procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados en solitario o en conjunción con otras pruebas para diagnosticar una enfermedad o trastorno dentro del contexto de la presente invención. En lo que hace referencia a un nuevo ejemplo, pruebas de sangre y una biopsia de hígado se utilizan habitualmente para diagnosticar o confirmar una diagnosis, al igual que para determinar la cantidad, extensión y gravedad del daño causado al hígado. Los procedimientos de diagnosis de la presente invención pueden ser utilizados en solitario o en conjunción con estas pruebas para determinar la cantidad, extensión o gravedad del daño causado al hígado.

De forma algo más particular, pruebas de diagnosis llevadas a cabo, por ejemplo, en una muestra de suero, una muestra *in vivo* o una biopsia de hígado pueden, con la presente invención, ser extendidas a la detección de la expresión de MAdCAM en la muestra. Además, la detección de MAdCAM en la muestra puede ser utilizada para monitorizar el curso o la progresión de la enfermedad, al igual que el curso de o la eficacia de un tratamiento terapéutico.

En una realización particular, las técnicas de diagnosis descritas pueden ser utilizadas para seguir el avance de la terapia. En un sujeto sometido al tratamiento terapéutico que da lugar a un incremento o a una disminución en la cantidad de tráfico de linfocitos, la cantidad de tráfico de linfocitos puede servir como medida de utilidad para el éxito o el fracaso del tratamiento. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para monitorizar el efecto de un tratamiento terapéutico en un sujeto, que comprende la medición, a intervalos de tiempo adecuados, de la cantidad de MAdCAM expresada en una muestra de tejido hepático o, contrariamente, la cantidad o el número de linfocitos en la muestra. La cantidad total de MAdCAM o  $\alpha 4\beta 7$  es comparada con un valor “base” o “control”, el cual, en función de la enfermedad y el tratamiento, puede ser la cantidad de MAdCAM en una muestra similar procedente de un sujeto normal, procedente del paciente con anterioridad al inicio de la enfermedad o durante la remisión de la enfermedad o procedente del paciente con anterioridad al inicio de la terapia. Un experto en la materia ordinario será capaz de discernir rápidamente el valor base adecuado para utilizar en una situación particular sin la debida experimentación.

Un sujeto preferido para los procedimientos de la presente invención es un vertebrado, incluyendo, sin limitación, un mamífero, pez, anfibio, reptil, pájaro, marsupio y, muy preferiblemente, un hígado humano adulto o un hígado humano de feto. Por lo tanto, los procedimientos y kits de esta invención son aplicables a usos clínicos humanos y a usos veterinarios.

Según un aspecto particular de la presente invención, una muestra, por ejemplo una muestra de biopsia de hígado, es obtenida a partir de un sujeto a través de procedimientos rutinarios por parte de los expertos en la materia. La forma más común de obtener una muestra de hígado es a través de una biopsia de hígado, un procedimiento utilizado para obtener una pequeña cantidad de tejido hepático, la cual puede ser examinada posteriormente utilizando técnicas inmunohistoquímicas rutinarias en conjunción con los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, la muestra de hígado puede ser obtenida mediante biopsia por aguja directamente en el hígado de un sujeto o, por ejemplo, guiando la aguja hacia el interior del hígado del sujeto a través del abdomen o pecho, utilizando diversas técnicas de imagen conocidas por parte de los expertos en la materia. Menos habitualmente, las muestras pueden ser obtenidas utilizando técnicas tales como laparoscopia, biopsia de hígado transvenosa o transyugular y biopsia de hígado quirúrgica.

Tal y como se ha comentado anteriormente, cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica para la medición de analitos puede ser utilizado en la práctica de la presente invención para detectar la presencia de MAdCAM o de uno de los ligandos de la misma, tal como  $\alpha 4\beta 7$ . Los citados procedimientos incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, técnicas inmunohistoquímicas conocidas por parte de los expertos en la materia, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos, utilizando técnicas tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos con enzima (EIA), preferiblemente el ensayo inmunosorbente vinculado a enzima (ELISA), inmunoensayos “sándwich”, reacciones con precipitina, reacciones de difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de

fijación complementaria, ensayos inmuno-radiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, ensayos de inmunolectroforesis, por citar solo unos pocos.

Kits que comprenden uno o más recipientes o viales que contienen componentes para llevar a cabo los ensayos de la presente invención quedan también dentro del campo de cobertura de la invención. Por ejemplo, el citado kit puede comprender reactivos requeridos para los análisis inmunohistoquímicos de una muestra, tal como una biopsia de hígado. Los reactivos pueden incluir una o más partes de unión, por ejemplo, un anticuerpo o anticuerpos, para un antígeno, por ejemplo una integrina de leucocito u otra parte de unión a MAdCAM, o la propia MAdCAM. Para ensayos histológicos, el kit contiene el sustrato cromogénico al igual que un reactivo para detener la reacción enzimática cuando el revelado de color ha tenido lugar. El sustrato incluido en el kit es uno que resulte adecuado para enzima conjugado con una de las preparaciones de anticuerpo, tal como un anticuerpo MAdCAM anti-humano. Estos son bien conocidos en el estado de la técnica. El kit puede comprender, opcionalmente, un estándar, a saber, una cantidad conocida de MAdCAM purificada.

En otra realización, un kit puede comprender mas de un conjunto de reactivos. Por ejemplo, un kit puede comprender un par de anticuerpos u otras partes de unión, cada uno de los pares dirigido contra una molécula objetivo distinta, permitiendo de este modo la detección o la medición de una diversidad de las citadas moléculas objetivo en una muestra, por ejemplo, MAdCAM y una proteína de superficie específica de célula de hígado o MAdCAM y  $\alpha 4\beta 7$ .

#### Composiciones

Composiciones útiles en el campo terapéutico y los procedimientos de diagnóstico de la presente invención están a disposición de los expertos en la materia y pueden ser identificadas en base a su capacidad para evitar, bloquear o suprimir la adhesión celular mediada por MAdCAM. Las composiciones resultan de utilidad en el tratamiento y la diagnosis de trastornos hepáticos asociados con la adhesión, tal como la inflamación y las reacciones inmunes.

Se da por entendido que agentes apropiados que son capaces de evitar, bloquear o suprimir la adhesión celular mediada por MAdCAM pueden lograr este efecto de diversas formas. Sin estar limitados a ninguna teoría en particular, una clase de agentes se unirá a MAdCAM-1 con suficiente afinidad y especificidad como para evitar la interacción con linfocitos que expresan un ligando de origen natural para MAdCAM, tal como la integrina de linfocito  $\alpha 4\beta 7$ . Otro tipo de agentes se unirá a un ligando leucocito de origen natural para MAdCAM, tal como la integrina de linfocito  $\alpha 4\beta 7$  y evitando de este modo su interacción con MAdCAM.

Los ejemplos de agentes son anticuerpos, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, que inhiben la adhesión de leucocitos a MAdCAM. Un nuevo ejemplo de agente está constituido por una molécula MAdCAM o una molécula basada en MAdCAM, tal como una forma soluble de MAdCAM que comprende el punto de unión a integrina de MAdCAM o una inmunoadhesina MAdCAM que comprende, por ejemplo, el dominio extracelular de MAdCAM fusionado a un dominio constante de inmunoglobulina.

Como ejemplo adicional de agente, un péptido o una molécula basada en una secuencia peptídica presente en MAdCAM y necesaria para la unión de integrina puede ser utilizada como agente dentro del contexto de la presente invención. El motivo aminoácido GLDTSL conservado y presente en receptores de adhesión de tipo Ig, incluyendo MAdCAM humana, puede ser utilizado para diseñar los agentes apropiados. La publicación internacional WO 97/25351 proporciona moléculas de este tipo, las cuales imitan el motivo aminoácido conservado LDTSL o MAdCAM. Alternativamente, se ha demostrado que las integrinas pueden unirse de forma selectiva a una diversidad de ligandos que contienen Arg-Gly-Asp (RDG). Pueden prepararse inhibidores de péptido basados en RGD con diferentes estructuras, los cuales resultan ser agentes eficaces dentro del contexto de la presente invención (Jackson *et al.*, (1997) J. Med. Chem. 40: 3359-3368).

Un nuevo agente es un ácido nucleico antisentido, que es complementario, en todo o en parte, a una molécula objetivo que comprende una hebra sentido y puede hibridar hacia la molécula objetivo. Cuando el ácido nucleico antisentido se introduce en una célula puede inhibir la expresión del gen codificado por la hebra sentido. Ácido nucleico antisentido, en todo o en parte complementario a la secuencia de ácido nucleico de MAdCAM como la descrita en la publicación internacional WO 96/24673, puede ser producido para este propósito.

En una realización preferida, el agente es un anticuerpo, que presenta las propiedades deseadas de unión a MAdCAM-1 y de evitar su interacción con el ligando asociado a leucocito. El experto en la materia tiene a su disposición anticuerpos de utilidad, tales como los descritos en el presente documento o los descritos por Podolsky *et al.*, (1993) J. Clin. Invest. 92(1): 372-380; Picarella *et al.*, (1997) J. Immunol. 158: 2099-2106; y Hesterberg *et al.*, (1996) Gastroenterology 111: 1373-1380. Las siguientes técnicas pueden, sin limitación, ser utilizadas para identificar y aislar agentes adecuados para bloquear o evitar la interacción entre MAdCAM-1 y una parte de unión a MAdCAM. Las composiciones de la invención pueden ser ensayadas a través de técnicas conocidas por los expertos, con vistas a demostrar su actividad. Entre los citados ensayos se incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, las siguientes pruebas *in vitro* para determinar la capacidad de interacción con proteínas MAdCAM, para inhibir la actividad relacionada con MAdCAM o para inhibir de forma selectiva la generación de péptidos derivados de MAdCAM. Entre los procedimientos *in vitro* se incluye un ensayo basado en proteína, tal como el descrito en Berlin *et al.*, (1993) Cell 74: 185-195, en el que MAdCAM purificada se aplica a láminas de vidrio para ensayos de unión. Agentes dentro del contexto de la presente invención inhiben la unión de linfocitos normales a la MAdCAM inmovilizada.

En otro ensayo apropiado,  $\alpha 4\beta 7$  purificada es inmovilizada sobre un soporte sólido, tal como una lámina de vidrio o una placa de plástico pre-incubada con un anticuerpo para la subunidad  $\alpha 4$  que no bloquea la interacción de la integrina con MAdCAM. En este ensayo, MAdCAM o preferiblemente una quimera MAdCAM-inmunoglobulina es incubada con la integrina inmovilizada en presencia o ausencia de un supuesto agente. La unión o la ausencia de unión de MAdCAM en presencia del agente que está siendo objeto de prueba puede ser medida con un agente detector, tal como un anticuerpo anti-MAdCAM o anti-Ig.

Alternativamente, para la identificación de los agentes adecuados puede utilizarse un ensayo basado en células que utiliza una células transfectada con subunidades de integrina  $\alpha 4\beta 7$  y que expresa la integrina intacta. Por ejemplo, puede utilizarse la capacidad de anticuerpo monoclonal para inhibir la adhesión de los ligandos celulares naturales a las células que expresan MAdCAM o la integrina  $\alpha 4\beta 7$ . Habitualmente, el agente de la invención es incubado con las células que soportan MAdCAM/ $\alpha 4\beta 7$ , en presencia de las células que soportan al receptor natural/ligando, en donde las células que soportan MAdCAM han sido inmovilizadas sobre un soporte sólido. La inhibición de la adhesión celular se determina posteriormente calculando la cantidad de mAb unida o valorando las células desplazadas.

Agentes eficaces para bloquear o evitar la asociación de MAdCAM con linfocitos pueden ser identificados a través de ensayos *in vivo*, tales como un modelo que utiliza *saguinus oedipus*. Los *Saguinus Oedipus*, CTTs, son una especie de primate no humano del nuevo mundo que, en cautividad, desarrolla colitis de forma espontánea y a menudo crónica, la cual clínica e histológicamente se asemeja a la colitis ulcerosa en humanos (Madera *et al.*, (1985) (Gastroenterology 88: 13-19). Este modelo ha sido utilizado para demostrar que el anticuerpo monoclonal anti-humano mÚrido ACT-1 (Lazarovits *et al.*, (1984) J. Immunol. 133:1857) para  $\alpha 4\beta 7$  reacciona de forma cruzada con CTT  $\alpha 4\beta 7$  y reduce la densidad celular de leucocitos en mucosa de colon inflamada, atenúa la actividad histológica inflamatoria y resuelve rápidamente enfermedades clínicas. Por tanto, resultará de utilidad a la hora de identificar sustancias adicionales que interfieran con la interacción entre MAdCAM expresada hepáticamente y un ligando MAdCAM.

Un ensayo de asentamiento de linfocito, tal como el asociado con ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) en mÚrido que induce el modelo de colitis descrito en Viney *et al.*, (1996) J. Immunol. 157: 1488-2497 puede resultar apropiado para la identificación de agentes y composiciones.

La especificidad o la discriminación entre dos o más sustratos competitivos es determinada por las relaciones de unido a no unido. Por ejemplo, según un ensayo celular como los descritos en el presente documento, el producto radioetiquetado o el producto  $\alpha 4\beta 7$  etiquetado fluorescente es incubado con quimeras inmunoglobulina-receptoras de MAdCAM-1 inmovilizada, a concentraciones variables de compuesto candidato no etiquetado. Concentraciones crecientes de molécula candidato exitosa evitan de forma eficaz la unión de  $\alpha 4\beta 7$  etiquetada a quimeras de receptor inmovilizado. La concentración de agente no etiquetado a las cuales el 50% de  $\alpha 4\beta 7$  es desplazada, son identificadas como EC50 y reflejan la afinidad de unión del receptor. Por consiguiente, un compuesto candidato con una EC50 de 100nM muestra una interacción sustancialmente más débil con un receptor que un agente candidato con una EC50 de 10nM. Esta discriminación en especificidad de sustrato indica que el agente o antagonista preferido tiene utilidad en, por ejemplo, la prevención o el bloqueo de interacción de MAdCAM con antígenos de superficie de leucocitos y especialmente con  $\alpha 4\beta 7$ , en una disposición en el que se encuentran presentes el ligando natural y el así denominado agente o antagonista.

Un ejemplo de agente está constituido por un anticuerpo monoclonal que reacciona con  $\alpha 4\beta 7$  o con MAdCAM. Los anticuerpos son valorados en función de sus constantes de afinidad. Las constantes de afinidad constituyen una medida de la interacción entre un ligando en particular y su receptor conocido. La "afinidad de unión" o la medida de la fuerza de asociación de una determinada interacción ligando receptor es medida generalmente a través de constantes de afinidad para las concentraciones de equilibrio de configuraciones asociadas y disociadas de ligando y de su receptor. La presente invención contempla tal interacción entre un agente o composición y la molécula de adhesión celular endotelial MAdCAM-1. En general, las constantes de disociación de la interacción ligando/integrina en solución son relativamente débiles y oscilan entre micromolar bajo y nanomolar alto. La aditividad de interacciones adhesivas múltiples a la superficie celular o la "avidez" proporciona la necesaria energía de unión para anclar los leucocitos al endotelio vascular. Por consiguiente, en general, una composición o agente presenta una afinidad más elevada para el receptor integrina que su ligando natural. El citado antagonista bloquea o evita un elevado porcentaje de interacciones de la superficie celular involucradas en la adhesión celular mediada por la interacción  $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1. Preferiblemente, la unión del agente o antagonista debería tener lugar a una afinidad de aproximadamente  $K_a = 10^{-4}M$  o superior para resultar de utilidad para la presente invención, resultando más preferibles los valores superiores a aproximadamente  $10^{-8}M$  y, muy preferibles los valores comprendidos entre aproximadamente  $10^{-8}M$  y  $10^{-10}M$ .

Como criterios adicionales, aquellas formas de molécula que son rápidamente absorbidas por tejidos, que están protegidas del metabolismo rápido y/o que proporcionan una prolongada semivida, son seleccionadas con preferencia para producir las composiciones de la invención. Un experto en la materia puede también efectuar modificaciones que incluyen, pero que no están limitadas, el uso de un profármaco y una modificación química de la estructura primaria (Wearly L.L., 1991, Crit. Rev. In Ther. Drug Carrier Systems, 8(4): 333. A la hora de minimizar el metabolismo de la proteína, como consecuencia de ello, incrementar la cantidad eficaz de proteína, las citadas modificaciones incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, modificaciones químicas y unión covalente a un polímero (Wearley, L.L., 1991, *supra*).

*Procedimientos terapéuticos y composiciones farmacéuticas*

Sin pretender quedar vinculado a un mecanismo de acción en particular, se considera que la migración de leucocitos activados desde la corriente sanguínea hacia el interior del tejido hepático depende de la interacción de los linfocitos con la MAdCAM en el tejido hepático. El tráfico de leucocitos a través de las paredes de los vasos hacia el tejido extravascular resulta necesario para la defensa del huésped frente a organismos microbianos o antígenos extraños y para reparar los daños tisulares. En algunas circunstancias, no obstante, las interacciones leucocito-endotelio pueden acarrear consecuencias perjudiciales para el huésped. Durante el proceso de adherencia y de migración transendotelial, los leucocitos pueden liberar productos tales como oxidantes, proteasas, o citokinas que causan daños directos al endotelio o provocan daños al endotelio mediante la liberación de una diversidad de mediadores inflamatorios. La interacción de MAdCAM-1 con moléculas de la superficie de leucocitos, tales como  $\alpha 4\beta 7$ , facilita la migración de los leucocitos y contribuye a los efectos destructivos del proceso de inflamación.

Por consiguiente, de acuerdo con la presente invención, los agentes que evitan la interacción entre la MAdCAM expresada hepáticamente y ligandos tales como  $\alpha 4\beta 7$  pueden ser utilizados para tratar estos tipos de trastornos en el hígado.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser utilizadas para eliminar o bloquear la lesión que tiene lugar en hígados transplantados.

El uso terapéutico clínico y preclínico de la presente invención en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con MAdCAM se alcanzará mejor por parte de los expertos en la materia utilizando principios aceptados de diagnóstico y tratamiento. Los citados principios son conocidos en el estado de la técnica y se exponen, por ejemplo, en Braundwals *et al.*, Harrison's Principles of International Medicine, 11th Ed., Mc Graw-Hill, H.Y. (1987).

El modo de administración y el régimen de dosificación del agente más eficaz dependerá del tipo de enfermedad que tiene que ser tratada, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si los agentes son administrados como anticuerpos y de propósitos discrecionales, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta a los agentes tales como anticuerpos y de la discreción del médico que atiende al paciente. El agente es administrado adecuadamente al paciente de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Para la mayoría de aplicaciones terapéuticas, los agentes pueden ser administrados a un mamífero, preferiblemente un paciente, bajo una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, incluyendo las que pueden ser administradas a un paciente por vía intravenosa, en forma de bolus o infusión continua a lo largo de un período de tiempo que abarca minutos, horas, días, semanas o meses, por vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasínovial, intratecal o periostal o a través de la ruta oral, tópica o de inhalación.

Una dosis de agente puede ser administrada al paciente a través de una o más tomas de administración, de infusión continua, o de inyección bolus. Por ejemplo, una dosis inicial del agente es administrada al paciente a través de inyección o infusión. Para administraciones repetidas a lo largo de diversos días o períodos más largos, en función de la dolencia, se repite el tratamiento hasta que se logra la supresión pretendida de los síntomas de la enfermedad. No obstante, otros regímenes de administración pueden resultar también útiles. Según otra realización de la invención, la eficacia del agente puede ser mejorada mediante la administración del agente en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para este propósito (por ejemplo, interferón  $\gamma$ ).

Las composiciones de la presente invención pueden formar parte de un sistema de suministro, tal como liposomas. Sistemas de suministro que conllevan liposomas se discuten en la solicitud de patente internacional WO 91/02805 y en la solicitud de patente internacional WO 91/19501, al igual que la patente US nº. 4.880.635 concedida a Janofi *et al.*. Estas publicaciones y patentes proporcionan descripciones útiles de técnicas para suministro de fármaco por liposoma.

Las composiciones de la invención pueden ser administradas a un sujeto que necesite de las mismas para tratar al sujeto ya sea de forma profiláctica, evitando una enfermedad o aliviándola una vez adquirida. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas de una manera adecuada, incluyendo la administración parental, tópica, oral o local (tal como aerosol o transdérmica) o cualquier combinación de las mismas. Las composiciones son administradas preferiblemente con un soporte farmacéuticamente aceptable, difiriendo la naturaleza del soporte en función del modo de administración, por ejemplo, administración oral, utilizando habitualmente un soporte sólido y administración I.V. como soporte de solución de sal líquida.

Las composiciones de la presente invención incluyen componentes farmacéuticamente aceptables que son compatibles con el paciente y las proteínas y restos carbohidrato de las composiciones de la invención. Entre las mismas se incluyen generalmente suspensiones, soluciones y elixires y, muy especialmente, tampones biológicos, tales como solución salina tamponada con fosfato, solución salina, medio Dulbecco, y similares. Pueden utilizarse también aerosoles o soportes tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinadores, agentes desintegrantes, y similares (en el caso de preparaciones orales sólidas, tales como polvos, cápsulas y comprimidos).

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa preferiblemente que ha sido aprobado por una agencia regulatoria federal o por un gobierno estatal o listada en la U.S. Pharmacopeia u otras farmacopeas generalmente reconocidas, para su utilización en animales y, más particularmente, en humanos.

La formulación de elección puede ser lograda utilizando una diversidad de los tampones mencionados anteriormente, o incluso excipientes que incluyen por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, celulosa sacarina sódica, carbonato de magnesio, y similares. La “gelificación” de las composiciones puede ser lograda utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO92/16555, la patente USA nº. 5.122.614 concedida a Enzon y la publicación de solicitud de patente internacional WO92/00748). Las composiciones orales pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

Una cantidad suficiente de las composiciones de la invención debe ser administrada al paciente para tener la certeza de que una cantidad sustancial de interacción entre MAdCAM y una parte de unión resulta inhibida. De este modo, la inflamación hepática puede o bien ser evitada o mejorada. La selección de composiciones, la frecuencia de administración y la cantidad de composición administrada de este modo estará de acuerdo con la enfermedad en particular que está siendo tratada y con su gravedad, el tipo de agente utilizado, el procedimiento de administración, el estado global del paciente y el criterio del médico responsable. Las regiones de dosificación habituales serán análogas al tratamiento de estas enfermedades por el uso de anticuerpos y otros productos biológicos. Habitualmente, las composiciones de la presente invención contendrán entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 95% de ingrediente activo, preferiblemente entre aproximadamente el 10 y el 50%. Preferiblemente, la dosificación estará comprendida entre aproximadamente 1 y 100 mg/kg. Aproximadamente entre 1 mg y aproximadamente 50 mg serán administrados a un niño y entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1.000 mg a un adulto. Otras dosis eficaces pueden ser determinadas de forma rápida por parte de un experto en la materia, a través de pruebas rutinarias, estableciendo las curvas dosis-respuesta.

A la hora de determinar la dosis de las composiciones que tienen que ser administradas, debe tenerse en cuenta que puede que no se desee bloquear completamente a la totalidad de moléculas MAdCAM; o uno puede desear bloquear completamente a los citados receptores durante tan solo un determinado período de tiempo. Para que tenga lugar un proceso de curación normal, al menos algunos de los glóbulos blancos o neutrófilos tienen que ser aportados al tejido, en las áreas en las que la herida, la infección o la enfermedad está ubicada. Por lo tanto, la dosis de composición administrada como agente bloqueador tiene que ser ajustada con cuidado en base a las necesidades particulares del paciente, a la vez que se toma en consideración una diversidad de factores tales como el tipo de enfermedad que está siendo tratada.

Por lo tanto, una cantidad eficaz de una composición según la presente invención es una cantidad eficaz para inhibir la interacción entre MAdCAM y la parte de unión a MAdCAM.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no limitativo.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Generación de anticuerpos anti-MAdCAM*

El siguiente ejemplo describe la generación de anticuerpos específicos para MAdCAM.

Una parte de la proteína MAdCAM fue expresada como fusión con una etiqueta Hisx6, en el grupo amino terminal. Esta quimera fue expresada en *E. coli* y la proteína purificada utilizada para inmunizar conejos. Estos anticuerpos resultan de utilidad como agentes de diagnóstico y/o terapéuticos.

#### *Procedimientos*

Cebadores de PCR fueron diseñados para aislar los nucleótidos I-675 de MAdCAM humana de longitud completa (Shyjan *et al.*, (1996) J of Immunol. 156: 2851-2857. Elementos de unión clonadores (EcoR1 y BamH1) y un codón de terminación fueron añadidos al cDNA a través de PCR. El producto PCR resultante (denominado MAdCAM-2D-finalización humano) fue subclonado en los sitios EcoR1-BamH1 del vector de expresión pProEX (Gibco-BRL), para la expresión de DH5 $\alpha$  (ATCC 53868) en cepa de *E. coli*. La MAdCAM-2D-finalización humana fue expresada en células DH5 $\alpha$  después de la inducción con IPTG, según el protocolo procedente del fabricante (Gibco-BRL). Las células fueron después procesadas y la proteína Hisx6 etiquetada (BAC2D) purificada utilizando una resina Ni-NTA, también de acuerdo con el fabricante (Gibco-BRL). Se llevó a cabo un análisis SDS PAGE sobre la fracción purificada y se observó una banda de aproximadamente 25.000 Daltons (peso anticipado 26.689 Daltons). El análisis de aminoácidos del grupo amino terminal proporcionó la secuencia esperada, confirmando la identidad de la proteína.

Para generar anticuerpos, dos conejos New Zealand White fueron inmunizados con 100 g de BAC2D en adyuvante completo de Freund. Los conejos fueron estimulados con 100  $\mu$ g de BAC2D en medio adyuvante incompleto de Freund tres semanas y seis semanas más tarde. Se recogieron sueros y se aislaron anticuerpos anti-MAdCAM mediante cromatografía de afinidad en sefarsa proteína A.

Se comprobó la especificidad de los anticuerpos mediante comparación de la unión con proteínas de fusión de diversas moléculas de adhesión: MAdCAM-1-IgG, VCAM-1-IgG e ICAM-1-IgG. Microplacas de titulación (96 po-

## ES 2 321 994 T3

cillos, NUNC MAXiSorp) fueron revestidas con 100  $\mu$ l de 2  $\mu$ g/ml de cualquiera de MAdCAM-1-IgG, VCAM-1-IgG e ICAM-1-IgG, durante un período de 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron bloqueados con 200  $\mu$ l de 5 mg/ml de sueroalbúmina bovina (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (tampón BSA), durante 1 hora a temperatura ambiente. Anticuerpo anti-BAC2D de conejo o IgG de conejo control (100  $\mu$ l) fueron añadidos y diluidos en serie dos veces en tampón BAS. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual los pocillos fueron lavados tres veces con 200  $\mu$ l de Tween 0,1% en PBS (tampón de lavado). Una solución conteniendo 1:2000 anticuerpo anti-conejo de cabra-fosfatasa alcalina en PBS (Caltag Cat N°. L42008, 100  $\mu$ l) fue añadida a cada uno de los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos fueron después lavados tres veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato (p-nitrofenil-fosfato disódico). Las lecturas OD fueron tomadas a 405 nm.

### Resultados

Anti-BAC2D fue unido a pocillos revestidos con MAdCAM de modo dependiente de la concentración. No obstante, no se detectó unión alguna para el caso de VCAM-1 o ICAM-1 a cualquier concentración, indicando que el anticuerpo anti-BAC2D resultaba específico para MAdCAM.

### Generación de anticuerpos MAdCAM antihumanos monoclonales

Un grupo de ratones hembra Balb/c (Charles River Breeding Laboratories, Wilminington, MA) fueron inyectados con 10  $\mu$ g/dosis de MAdCAM y dominios 1 y 2 en 100  $\mu$ l de adyuvante Detox (RIBI ImmunoChem Res. Inc., Hamilton, MT), a través de inyección intraperitoneal durante los días 0, 7, 14, 28, 35, 42, 56, 63, 70, 77, 84 y 91. Se proporcionó una estimulación pre-fusión el día 105 a un primer animal, el día 126 a un segundo animal y el día 166 a un tercer animal. Los animales fueron sacrificados 3 días después de la estimulación pre-fusión. Se extrajo el bazo y se fusionaron los linfocitos con la línea de mieloma de ratón 653, Kearny *et al.*, J. Immunol., 123: 1548 (1979), utilizando polietilenglicol 1450(Sigma) al 50%, a través de un procedimiento establecido (Oi and Herzenberg, in Selected Methods in Cellular Immunology, B. Mishel and S. Schiigi, eds. P 351, W.J. Freeman Co., San Francisco, CA, (1980). Las células fusionadas fueron ubicadas en placas de microtitulación de 96 pocillos, a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo, seguido de selección HAT, Littlefield, J.W. Science, 145: 709 (1964)) el día 1 post-fusión.

Otro grupo de ratones hembra (Charles River Breeding laboratorios, Wilmington, MA) fueron inyectados con 5  $\mu$ g de MAdCAM purificada y dominios 1 y 2 en 100  $\mu$ l de adyuvante Detox (R101) en las plantas de las patas posteriores durante los días 0, 7, 14, 28, 35, 42, 56, 63, 70, 77, 84, 91 y 159. El día 162, la totalidad de los animales fueron sacrificados, los nódulos popliteales fueron extraídos y los linfocitos fusionados tal y como se ha indicado anteriormente.

Sobrenadantes de cultivo de hibridoma inmovilizados fueron hechos reaccionar con MAdCAM. Los pocillos positivos en relación con anticuerpos MAdCAM anti-humanos fueron expandidos para un estudio adicional. Estos cultivos permanecieron estables cuando se expandieron. Las líneas celulares fueron clonadas limitando la dilución y la criopreservación. Los cultivos parentales fueron isotipados y sometidos a ensayo para determinar su capacidad de capturar MAdCAM.

### Resultados

Se obtuvieron los siguientes anticuerpos MAdCAM anti-humanos:

#### Utilidad de inmunohistología

| Clone #           | Isotipo           | Epítipo | Función<br>Bloqueo | Congelad<br>o | Fijado |
|-------------------|-------------------|---------|--------------------|---------------|--------|
| Mmc1              | IgG1              | A1      | No                 | Si            | Si     |
| Mmc2              | IgG1              | A2      | No                 | Si            | NT     |
| Mmc3              | IgG1              | B       | Si                 | Si            | Si     |
| Mmc4              | IgG1              | C1      | No                 | Si            | Si     |
| Mmc6              | IgG <sub>2b</sub> | D       | No                 | Si            | No     |
| Mmc7              | IgG1              | C1      | No                 | Si            | Si     |
| Mmc8              | IgG1              | C2      | No                 | NT            | NT     |
| NT= no comprobado |                   |         |                    |               |        |

## ES 2 321 994 T3

La especificidad de los anticuerpos producidos a través de los hibridomas fue comprobada a través de incubación directa con MAdCAM en ELISA estándar. En este ensayo, pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos fueron revestidos durante el transcurso de una noche a 4°C con 100 µl de una solución que contiene MAdCAM purificada humana, a razón de aproximadamente 1 µg/ml de tampón carbonato, pH 9,6. La placa se bloqueó durante 1 hora con una solución de BSA al 1% en PBS y se lavó después con tampón de lavado (Tween 20 0,05% en PBS). Anticuerpo monoclonal purificado a partir de ascitos generados a partir de hibridomas, al igual que controles que satisfacían el isotipo, fueron añadidos a los pocillos y la placa fue incubada durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados y se añadió una solución que contenía aproximadamente 1 µg/ml de anticuerpos específicos anti-ratón de cabra conjugados con peroxidada de rábano (HRP) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN); BSA 0,5% y NP-40 0,25%, en tampón de lavado y las placas fueron incubadas durante un período de 2 horas. Después de efectuado un lavado, las placas fueron reveladas mediante la adición de una solución que contenía 0,4 µg/ml de dihidrocloruro de o-fenilendiamina, más 0,4 µl/ml de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 2N. Se midió el color de la reacción a 490 nm mediante un lector de placa ELISA automatizado.

Los resultados de este ensayo mostraron que el anticuerpo monoclonal procedente del hibridoma se unía específicamente a MAdCAM y no a otras proteínas de forma apreciable. La especificidad con relación a cada uno de los anticuerpos fue comprobada en experimentos similares en donde los anticuerpos fueron utilizados para bloquear la unión de cada uno de ellos. Los resultados obtenidos indicaron que se identificaron anticuerpos frente a seis distintos epítopes de MAdCAM humana y se aislaron.

### Ejemplo 2

#### 25 *Expresión de MAdCAM en tejidos hepáticos inflamados*

Los siguientes ejemplos demuestran que la MAdCAM es expresada en los vasos del trato portal del hígado durante la inflamación, pero se encuentra ausente, o por debajo de los niveles de detección, en los tejidos hepáticos normales.

#### 30 *Procedimientos*

Tejidos: Todos los tejidos, biopsias y resecciones quirúrgicas fueron fijadas en formalina tamponada al 4% y procesadas para incrustación en parafina. Para llevar a cabo el examen histológico, se cortaron secciones de 4 micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina o con anticuerpo MAdCAM anti-humano de conejo, tal y como se describe más adelante.

Las secciones de parafina fueron desparafinizadas en xileno e hidratadas en agua destilada. La actividad peroxidato endógena fue apagada mediante la cobertura de las secciones con KPL Blocking Solution (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) (diluida 1:10 en agua destilada) durante 4 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron después enjuagadas dos veces con agua destilada, a razón de 5 minutos por enjuague.

Las secciones fueron sometidas a microondas en Biogenex Citra Solution (Biogenix) durante un período de 10 minutos a 99°C y dejadas después a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las secciones fueron después bien enjuagadas con agua destilada y posteriormente con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La unión a anticuerpo no específico fue bloqueada mediante incubación de las secciones con suero de cabra al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron después incubadas con MAdCAM anti-humano de conejo (ver ejemplo 1), diluidas a 4-7 µg/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente. Secciones control fueron incubadas con control isotipo de conejo (Zymed. Cat. N°. 08 6199). Las secciones fueron después enjuagadas con PBS dos veces, a razón de 5 minutos cada una de ellas.

La unión de anticuerpo fue detectada mediante incubación de las secciones con anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado, diluido 1:200 en suero bloqueante durante 30 minutos, a temperatura ambiente, enjugado después con PBS dos veces, a razón de 5 minutos cada una de ellas. Las secciones fueron después incubadas con ABC Reagent (Vector Vectastain Elite ABC kit) durante 30 minutos a temperatura ambiente y enjuagadas dos veces con PBS, a razón de 5 minutos cada una de ellas, incubadas posteriormente con DA B (Pierce) durante 5 minutos. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, seguido de un enjuague con agua destilada.

Finalmente, las secciones fueron deshidratadas, liberadas y montadas en medios de montaje sintéticos.

### *Resultados*

Si bien no se detecta normalmente ni en el hígado humano adulto o en el de feto, la MAdCAM se expresa en los vasos del trato portal en un determinado número de trastornos hepáticos inflamatorios, incluyendo la hepatitis C crónica.

La Figura 1A muestra la expresión de MAdCAM en vénulas endoteliales altas (flecha) en nódulos linfáticos de adulto normal. La Figura 1B muestra la expresión de MAdCAM (flecha) en bazo de humano adulto normal. La expresión fue observada en células de forma dendrítica que rodean la pulpa blanca esplénica. La Figura 1C muestra la expresión de MAdCAM en vasos capilares (flecha) de páncreas humano adulto normal.

La MAdCAM fue detectada en vasos de tracto portal en trastornos hepáticos inflamatorios. La Figura 2A muestra la expresión de MAdCAM en vasos capilares pequeños dentro del tracto portal hepático inflamado. La Figura 2B muestra la expresión de MAdCAM en canales vasculares dilatados dentro de tractos portales humanos inflamados. La Figura 2C muestra la expresión de MAdCAM en células de Kupffer que rodean un agregado linfoide dentro de un tracto portal. La Figura 2D muestra la expresión de MAdCAM en canales vasculares dilatados dentro de tractos portales hepáticos humanos.

### Ejemplo 3

#### *Identificación de agentes utilizando el ensayo $\alpha 4\beta 7$ /proteína MAdCAM/proteína*

##### *(1) Aislamiento de receptores de integrina $\alpha 4\beta 7$ humana purificada*

Una línea de células de riñón humano 293, transfectada tanto con genes  $\alpha 4$  como  $\beta 7$  humanos, a un elevado número de copias de receptor ( $> 200.000$  copias de receptores integrina heterodímeros por célula) fue cultivada y escalada hasta un total de 10 litros. Las células fueron aisladas y paletizadas. Los pelets celulares fueron sometidos a lisis en 10 volúmenes de tampón de lisis conteniendo deoxicolato 0,5%, IGEPAL (NP-40) 0,5%, Tris-HCL 50 mM (pH 7,5),  $\text{Ca}^{++}$   $\text{Mg}^{++}$   $\text{Mn}^{++}$  1 mM, 10  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina y 10  $\mu\text{g/ml}$  de pepstatina A. La preparación fue homogeneizada durante 30 segundos. El homogenado fue centrifugado a 15.000 xg durante un periodo de 20 minutos, dos veces. El lisado fue filtrado a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . El filtrado fue cargado en una columna de afinidad de anticuerpo  $\beta 7$  anti-humano de rata. Las proteínas unidas fueron eluidas con tampón Pierce a pH 6,9, conteniendo  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  1 mM y dializadas frente a solución salina tamponada con Tris (pH 7,2) conteniendo  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  1 mM.

El dialisado constituye receptores integrina  $\alpha 4\beta 7$  purificados por afinidad.

##### *(2) Ensayo $\alpha 4\beta 7$ /Proteína MAdCAM-1-Proteína*

La preparación de receptor de integrina  $\alpha 4\beta 7$  a una concentración optimizada fue inmovilizada sobre la superficie de una placa de plástico sólida pre-revestida con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 4$ , el cual no bloquea la integrina  $\alpha 4\beta 7$  que se une a MAdCAM-1. Con vistas a monitorizar la unión de MAdCAM-1 a  $\alpha 4\beta 7$  se añadió una concentración optimizada de conjugado MAdCAM-1-g-peroxidasa de rábano (HRP). En este momento se añadieron inhibidores de la interacción entre  $\alpha 4\beta 7$  y MAdCAM-1. El conjugado HRP unido es detectado con sustrato peroxidada TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) mediante espectrofotometría, a una densidad óptica de 450 nm, en un lector de microplaca.

#### *Resultados*

Agentes identificados de este modo son utilizados en los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento.

### Ejemplo 4

#### *Blocage de MAdCAM*

Células JY fueron etiquetadas con 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresina (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 minutos a 37°C y resuspendidas en medio RPMI 1640 con 5 mg/ml de BSA. Las células fueron añadidas a micropocillos pre-revestidos con MAdCAM-1-Ig e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células no unidas fueron eliminadas mediante lavado y las células unidas fueron solubilizadas con SDS 0,1% en tampón de lisis Tris-HCL (pH 8,5) 50 mM. El fluorocromo liberado fue monitorizado a través de un lector de placa Cytofluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), programado a 485 nm de excitación y a 530 nm de emisión. Se determinó la intensidad de fluorescencia máxima para el número de células y se utilizó para calcular el % de adherencia celular.

#### *Resultados*

Agentes identificados de este modo pueden ser utilizados en procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento.

*Depósito de materiales*

Los siguientes cultivos se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 (ATCC):

5

|    | Hibridoma | Nº. ATCC  | Fecha de depósito |
|----|-----------|-----------|-------------------|
| 10 | Mmc3      | CRL-12530 | 13 Mayo 1998      |
|    | MMc6      | CRL-12531 | 13 Mayo 1998      |

15 Este depósito se efectúa de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest relativo al reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los efectos del procedimiento de patentes y a los reglamentos dimanantes del mismo (Tratado de Budapest). Ello asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los organismos estarán disponibles, a través de la ATCC, de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, y sometidos a un acuerdo entre Genentech Inc y ATCC., que asegura la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie de los cultivos para el público, después de la concesión de la pertinente patente USA.

20

El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo en que, si los cultivos en depósito mueren o se pierden o destruyen cuando se cultivan en las condiciones adecuadas, los mismos serán sustituidos rápidamente, cuando se reciba la notificación, por una especie viable del mismo cultivo. La disponibilidad de las cepas depositadas no tiene que ser entendida como una licencia para practicar la invención contraviniendo los derechos otorgados por la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con las leyes de patentes.

25

La precedente memoria escrita es considerada suficiente para permitir que un experto en la materia lleve la invención a la práctica. La presente invención no queda limitada en su cobertura a través de los cultivos depositados, dado que las realizaciones depositadas pretenden ser una ilustración de un aspecto de la invención y cualquier cultivo que resulte ser funcionalmente equivalente cae dentro del campo de cobertura de esta invención. El depósito de material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento resulta inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni tiene que ser construida como limitativa de la cobertura de las reivindicaciones a la ilustración específica que representa.

35

**Referencias citadas en la descripción**

40 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

45

- WO 9624673 A [0005] [0057]

- WO 9725351 A [0005] [0056]

50

- US 4816567 A, Cabilly [0021]

- US 4845026 A [0036]

- US 5006459 A [0036]

55

- US 4275149 A [0037] [0039]

- US 4737456 A [0037]

60

- US 4318980 A [0039]

- WO 9102805 A [0073]

- WO 9119501 A [0073]

65

- US 4880635 A, Janoff [0073]

- WO 9216555 A [0077]

## ES 2 321 994 T3

- US 5122614 A, Enzon [0077]

- WO 9200748 A [0077]

### 5 Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **SPRINGER**, T. *Cell*, 1994, vol. 76, 301-314 [0002]

- **BERLIN et al.** *Cell*, 1995, vol. 80, 413-422 [0002] [0004]

- **SCHWEIGHOFFER et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 717-729 [0002]

- **BERLIN et al.** *Cell*, 1993, vol. 74, 185-195 [0003] [0004] [0005] [0058]

- **BRISKIN et al.** *Am. J. Pathol.*, 1997, vol. 151, 97-110

- **KRAAL et al.** *Am. J. Path.*, 1995, vol. 147, 763-771 [0003]

- **HANNINEN A. et al.** *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 92, 2509 [0003]

- **VINEY J. et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 157, 2488-2497 [0003]

- **PICARELLA D. et al.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 2099-2016 [0003]

- **TIDWELL et al.** *J. Immunol.*, vol. 159, 1497-1505 [0004]

- **WALSH et al.** *Immunol.*, 1996, vol. 89, 112-119 [0004]

- **PICARELLA et al.** *J. Immunol.*, 1997, vol. 158 (5), 2099-2106 [0005]

- **HESTERBERG et al.** *Gastroenterology*, 1996, vol. III, 1373-1380 [0005]

- **BRISKIN et al.** *Nature*, 1993, vol. 363, 461-464 [0012]

- **SHYJAN et al.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 2851-2857 [0012]

- **KILGER; HOLZMANN.** *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 73, 347-354 [0013]

- **ERLE.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 11009-11016 [0013]

- **KILSHAW; MURANT.** *Eur. J. Immunol.*, 1991, vol. 21, 2591-2597 [0013]

- **LAZAROVITS et al.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133 (4), 1857-1862 [0013]

- *Pathology of the Liver.* 1994, 15.10, 15.8, 15.11 [0018]

- **MAGE; LAMOYI.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc.*, 1987, 79-97 [0021]

- **KOHLER; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0022]

- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984, vol. 81, 6851 [0023]

- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522 [0024]

- **REICHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323

- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593 [0024]

- *Pathology of the Liver.* 1994 [0029]

- *Current Protocols in Immunology.* Wiley-Interscience, 1991, vol. 1, 2 [0037]

- Enzyme Immunoassay, in *Methods in Enzym.* Academic press, 1981, vol. 73, 147-166 [0037]

- **JACKSON et al.** *J. Med. Chem.*, 1997, vol. 40, 3359-3368 [0056]

- **PODOLSKY et al.** *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 92 (1), 372-380 [0058]

## ES 2 321 994 T3

- **PICARELLA** *et al. J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 2099-2106 [0058]
- **HESTERBERG** *et al. Gastroenterology*, 1996, vol. 111, 1373-1380 [0058]
- 5 • **MADERA** *et al. Gastroenterology*, 1985, vol. 88, 13-19 [0061]
- **LAZAROVITS** *et al. J. Immunol.*, 1984, 1331857 [0061]
- **VINEY** *et al. J. Immunol.*, 1996, vol. 157, 1488-2497 [0062]
- 10 • Harrison's Principles of Internal Medicine. *Mc- Graw-Hill*, 1987 [0069]
- **SHYJAN** *et al. J of Immunol.*, 1996, vol. 156, 2851-2857 [0084]
- 15 • **KEARNEY** *et al. J. Immunol.*, 1979, vol. 123, 1548 [0088]
- **OI; HERZENBERG**. *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.J. Freeman Co, 1980, 351 [0088]

# REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que evita la interacción de MAdCAM con la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , para la fabricación de una composición para el tratamiento de un trastorno hepático, **caracterizada** por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, en donde el agente es seleccionado de entre el grupo que comprende:
  - a. un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a MAdCAM;
  - 10 b. un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una integrina  $\alpha 4\beta 7$ ;
  - c. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a ligando de una MAdCAM fusionada a un dominio constante de inmunoglobulina;
  - 15 d. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a MAdCAM de un ligando habilitado para ello, fusionada a un dominio constante de inmunoglobulina;
  - e. una forma soluble de MAdCAM, que comprende el punto de unión a la integrina de MAdCAM;
  - 20 f. un péptido o molécula basada en una secuencia peptídica presente en MAdCAM y necesaria para la unión a integrina;
  - g. un inhibidor peptídico basado en RGD; y
  - 25 h. un ácido nucleico antisentido, complementario en todo o en parte con la secuencia de ácido nucleico de MAdCAM.
2. Uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno hepático está **caracterizado** por inflamación.
- 30 3. Uso de la reivindicación 2, en donde el trastorno hepático está **caracterizado** por infiltración hepática de linfocitos.
4. Uso de la reivindicación 3, en donde el agente evita la interacción de MAdCAM con los linfocitos infiltrantes.
- 35 5. Uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno hepático es una infección, un trastorno iatrogénico, un trastorno hereditario, sarcoidosis, un trastorno autoinmune, una enfermedad de injerto versus huésped o un trasplante de órgano.
6. Uso de la reivindicación 5, en donde la infección es una infección vírica.
- 40 7. Uso de la reivindicación 6, en donde la infección vírica es una infección de hepatitis.
8. Uso de la reivindicación 7, en donde la infección de hepatitis es una infección de hepatitis C.
- 45 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente es un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.
10. Uso de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo monoclonal es producido a través de la línea celular de hibridoma depositada bajo número de acceso ATCC N°. CRL-12530.
- 50 11. Uso de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo monoclonal es producido a través de la línea celular de hibridoma depositada bajo número de acceso ATCC N°. CRL-12531.
12. Procedimiento para inhibir la unión *in vitro* entre una primera célula que expresa un ligando para MAdCAM y una segunda célula que expresa la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , en donde la citada segunda célula es una célula de tracto portal hepático, comprendiendo el procedimiento la puesta en contacto de una o ambas células con un agente que evita la interacción de MAdCAM con la integrina  $\alpha 4\beta 7$ .
- 55 13. Uso de una cantidad eficaz de un agente que se une a MAdCAM para la fabricación de una composición para la diagnosis *in vivo* de un trastorno hepático, **caracterizado** por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, en donde el agente es seleccionado de entre el grupo que comprende:
  - a. un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a MAdCAM;
  - 65 b. un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una integrina  $\alpha 4\beta 7$ ;
  - c. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a ligando de una MAdCAM fusionada a un dominio constante de inmunoglobulina;

- d. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a MAdCAM de un ligando habilitado para ello, fusionada a un dominio constante de inmunoglobulina;
- e. una forma soluble de MAdCAM, que comprende el punto de unión a integrina de MAdCAM;
- f. un péptido o molécula basado en una secuencia peptídica presente en MAdCAM y necesaria para la unión a integrina;
- g. un inhibidor peptídico basado en RGD; y
- h. un ácido nucleico antisentido, complementario en todo o en parte con la secuencia de ácido nucleico de MAdCAM.

14. Procedimiento para diagnosticar un trastorno hepático, **caracterizado** por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, comprendiendo el procedimiento la puesta en contacto *in vitro* de células hepáticas con un agente que se une a MAdCAM y la detección de su unión.

15. Uso del procedimiento de la reivindicación 13 ó de la reivindicación 14, en donde el agente es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.

16. Uso o procedimiento de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo número de accesoión ATCC N°. CRL-12530.

17. Uso o procedimiento de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo número de accesoión ATCC N°. CRL-12531.

18. Uso o procedimiento de la reivindicación 13 ó de la reivindicación 14, en donde el agente es un ligando MAdCAM.

19. Uso o procedimiento de la reivindicación 18, en donde el ligando MAdCAM es la integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

20. Uso o procedimiento de las reivindicaciones 13 a 19, en donde el agente es etiquetado de forma detectable.

21. Procedimiento para determinar la cantidad de MAdCAM en una muestra procedente de un sujeto, que comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto la muestra con al menos una parte de unión específica para MAdCAM, bajo condiciones que permiten la unión específica, en donde la muestra es tejido hepático; y
- (b) medir la cantidad de cualquier unión específica que tenga lugar entre un componente en la muestra y al menos una parte de unión, en donde la cantidad de unión específica indica la cantidad de MAdCAM en la muestra.

22. Procedimiento para diagnosticar una enfermedad o trastorno hepático en su sujeto, **caracterizado** por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, comprendiendo el procedimiento los pasos de:

- (a) poner en contacto una muestra de suero o e tejido hepático procedente del sujeto con al menos una parte de unión específica para una molécula MAdCAM, bajo condiciones que permitirían la unión específica;
- (b) medir la cantidad de unión específica que tiene lugar entre un componente en la muestra y al menos una parte de unión, en donde la cantidad de unión específica indica la cantidad de MAdCAM expresada en la muestra; y
- (c) comparar la cantidad de unión específica medida en el paso (b) con una cantidad base de unión específica, en donde un incremento en la cantidad de unión específica en la muestra indica la presencia de la enfermedad o trastorno hepático.

23. Procedimiento para monitorizar el efecto de un tratamiento terapéutico en un paciente que está siendo tratado de una enfermedad hepática, **caracterizado** por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, en donde una respuesta positiva a la terapia va acompañada de una disminución en la cantidad de MAdCAM o a su desaparición, comprendiendo el citado procedimiento:

- (a) medir la cantidad de MAdCAM en al menos dos muestras procedentes del paciente, según un procedimiento que comprende los siguientes pasos:
  - (1) poner en contacto la muestra con al menos una parte de unión específica para MAdCAM, bajo condiciones que permiten la unión específica, y

- (2) medir la cantidad de cualquier unión específica que tenga lugar entre un componente en la muestra y al menos una parte de unión, en donde la cantidad de unión específica indica la cantidad de MAdCAM en la muestra, habiendo sido obtenida la citada primera muestra con anterioridad al inicio del tratamiento y al menos una segunda muestra habiendo sido obtenida después del inicio del citado tratamiento; y

- (b) comparar la cantidad de la unión específica o la cantidad de MAdCAM calculada a partir de la citada unión específica en la primera muestra con al menos una segunda muestra, en donde una disminución en la cantidad de la citada unión específica o de MAdCAM después del tratamiento indica una respuesta positiva a la terapia.

24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el leucocito es un linfocito que expresa la integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

25. Procedimiento de la reivindicación 21 o de la reivindicación 22, en donde el tejido hepático es una biopsia hepática.

26. Agente que evita la interacción de MAdCAM con la integrina  $\alpha 4\beta 7$  para ser utilizado en un trastorno hepático **caracterizado** por el reclutamiento de leucocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, en donde el agente es seleccionado de entre el grupo que comprende:

- a. un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a MAdCAM;
- b. un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una integrina  $\alpha 4\beta 7$ ;
- c. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a ligando de una MAdCAM fusionada a un dominio constante de inmunoglobulina;
- d. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a MAdCAM de un ligando habilitado para ello, fusionada con un dominio constante de inmunoglobulina;
- e. una forma soluble de MAdCAM, que comprende el punto de unión a integrina de MAdCAM;
- f. un péptido o molécula basado en una secuencia peptídica presente en MAdCAM y necesaria para la unión a integrina;
- g. un inhibidor peptídico basado en RGD; y
- h. un ácido nucleico antisentido, complementario en todo o en parte con la secuencia de ácido nucleico de MAdCAM.

27. Agente de la reivindicación 26, en donde el trastorno hepático se **caracteriza** por inflamación.

28. Agente de la reivindicación 27, en donde la inflamación se **caracteriza** por infiltración hepática de linfocitos.

29. Agente de la reivindicación 28, que evita la interacción de MAdCAM con los linfocitos infiltrantes.

30. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 26-29, en donde el trastorno hepático es una infección, un trastorno iatrogénico, un trastorno hereditario, sarcoidosis, un trastorno autoinmune, la enfermedad de injerto frente a huésped o trasplante de órgano.

31. Agente de la reivindicación 30, en donde la infección es una infección vírica.

32. Agente de la reivindicación 31, en donde la infección vírica es una infección de hepatitis.

33. Agente de la reivindicación 32, en donde la infección de hepatitis es una infección de hepatitis C.

34. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 26-33, el cual es un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.

35. Agente de la reivindicación 34, en donde el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo número de acceso ATCC N°. CRL-12530.

36. Agente de la reivindicación 34, en donde el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo número de acceso ATCC N°. CRL-12531.

37. Agente que se une a MAdCAM, para ser utilizado en la diagnosis *in vivo* de un trastorno hepático **caracterizado** por reclutamiento de linfocitos asociado a MAdCAM hacia el hígado, en donde el agente es seleccionado de entre el grupo que comprende:

- a. un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a MAdCAM;
- b. un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una integrina  $\alpha 4\beta 7$ ;
- c. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a ligando de una MAdCAM fusionada a un dominio constante de inmunoglobulina;
- d. una inmunoadhesina que comprende una parte de unión a MAdCAM de un ligando habilitado para ello, fusionada con un dominio constante de inmunoglobulina;
- e. una forma soluble de MAdCAM, que comprende el punto de unión a integrina de MAdCAM;
- f. un péptido o molécula basado en una secuencia peptídica presente en MAdCAM y necesaria para la unión a integrina;
- g. un inhibidor peptídico basado en RGD; y
- h. un ácido nucleico antisentido, complementario en todo o en parte con la secuencia de ácido nucleico de MAdCAM.

38. Agente de la reivindicación 37, que es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos que se une a antígeno.

39. Agente de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo número de acceso ATCC N°. CRL-12530.

40. Agente de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo número de acceso ATCC N°. CRL-12531.

41. Agente de la reivindicación 37, el cual es un ligando MAdCAM.

42. Agente de la reivindicación 41, el cual es una integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

43. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 42, el cual está etiquetado de forma detectable.

44. Agente según cualquiera de las reivindicaciones 26-36, en donde el leucocito es un linfocito que expresa una integrina  $\alpha 4\beta 7$ .



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

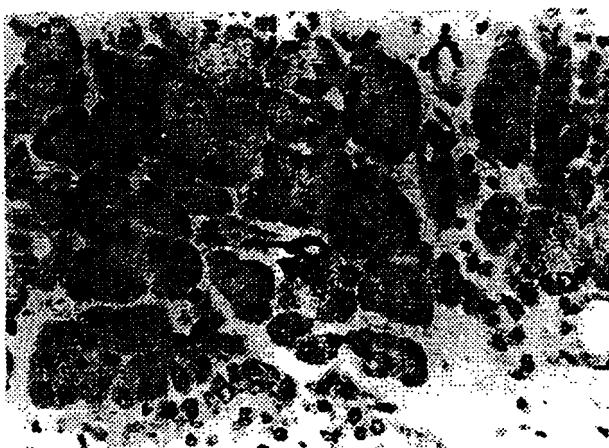


**FIG. 1C**

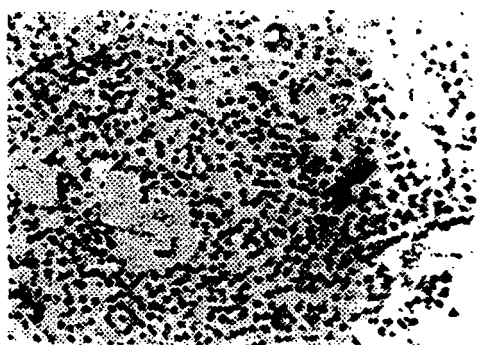


**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

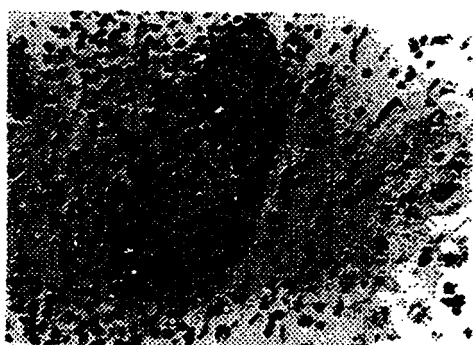


**FIG. 2C**

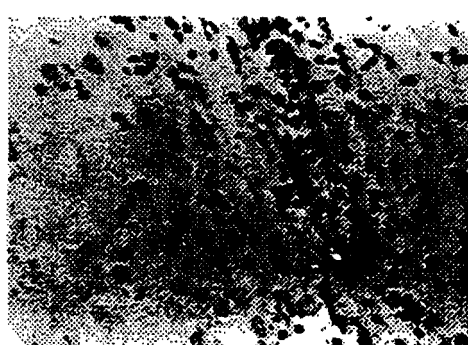


**FIG. 2D**