

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 873**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 17163411 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3202789**

54 Título: **Anticuerpos anti-VLA-4**

30 Prioridad:

16.04.2010 US 324944 P

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

15.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LUGOVSKOY, ALEXEY A.;
TAYLOR, FREDERICK R. y
MCLACHLAN, KAREN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 805 873 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-VLA-4

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/324.944, depositada el 16 de abril de 2010.

10 Campo de la invención

Esta invención se refiere a anticuerpos de unión a alfa-4 y fragmentos de unión a alfa-4 de los mismos.

Antecedentes de la invención

15

Los anticuerpos humanizados se pueden usar como agentes terapéuticos en lugar de anticuerpos murinos para evitar la respuesta inmunitaria no deseable en seres humanos denominada respuesta HAMA (anticuerpo humano antimurino). Los anticuerpos humanizados se construyen generalmente sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano con las CDR de otra especie, normalmente un anticuerpo de

20 ratón.

VLA-4 (también denominado $\alpha 4\beta 1$) es un miembro de la familia de integrinas $\beta 1$ de receptores de la superficie celular. El VLA-4 contiene una cadena $\alpha 4$ y una cadena $\beta 1$ y está implicado en las interacciones intercelulares. Su expresión se limita principalmente a las células linfoides y mieloides. VLA-4 se une al ligando de células endoteliales VCAM-1

25

(molécula de adhesión a las células vasculares 1) y puede mediar la fijación de los linfocitos T y B al fragmento de unión a heparina II de la fibronectina plasmática humana.

El documento WO 2006/096653 describe un anticuerpo anti-VLA-4 denominado HP1/2 y variantes humanizadas del mismo que usan una estructura de aceptor variable de la cadena pesada de IGHV1-f.

30

Resumen de la invención

En base a la descripción que está contenida en esta solicitud, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, que

35

(a) la cadena pesada variable comprende la secuencia de la estructura de la cadena pesada variable de IGHV1-f y las CDR de la cadena VH del anticuerpo murino HP1/2, donde CDR1 comprende la secuencia GFNIKDTYM, CDR2 comprende la secuencia RIDPASGDTKYDPKFQV y CDR3 comprende la secuencia GMWVSTGYALDF, y los residuos de aminoácidos en las posiciones de la estructura 24 y 94 de la cadena pesada variable, según el esquema de numeración de Kabat, están sustituidos, donde el residuo sustituido en la posición de la estructura 24 es alanina (A) y el residuo sustituido en la posición de la estructura 94 es ácido aspártico (D);

40

(b) la cadena ligera variable comprende la secuencia de la estructura de la cadena ligera variable de IGKV4-1 y las CDR de la cadena VL del anticuerpo murino HP1/2, donde CDR1 comprende la secuencia KASQSVTNDVA, CDR2 comprende la secuencia YASNRYT y CDR3 comprende la secuencia QQDYSSPYT, y los residuos de aminoácidos en las posiciones de la estructura 1, 67 y 87 de la cadena ligera variable, según el esquema de numeración de Kabat, están sustituidos, donde el residuo sustituido en la posición de la estructura 1 es serina (S), el residuo sustituido en la posición de la estructura 67 es tirosina (Y) y el residuo sustituido en la posición de la

50

y donde la molécula de anticuerpo recombinante o el fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo se une a VLA-4.

La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

55

Los inventores han descubierto que las estructuras de la región variable de la estirpe germinal se pueden usar para optimizar los anticuerpos de unión a alfa-4 injertados con CDR, tales como los anticuerpos anti-VLA-4. Por consiguiente, la invención presenta las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de anti-VLA-4 y moléculas de anticuerpo que incluyen tales estructuras.

60

En un aspecto, la descripción presenta una cadena VH de anticuerpo anti- $\alpha 4$ que tiene CDR de un anticuerpo anti- $\alpha 4$ donante, p. ej., un anticuerpo anti- $\alpha 4$ descrito en esta solicitud, y una estructura de la VH que tiene las regiones 1, 2, 3 y 4 de la secuencia de, o que no tiene más de 5, 10 o 15 diferencias con, una secuencia de la región variable de la estirpe germinal para la cadena VH. En una realización, la región de estructura variable 4 (FR4) es una secuencia de consenso humana. En una realización, están presentes las regiones de estructura de la cadena VH completas FR1, FR2, FR3 y FR4. En otra realización, la cadena es un fragmento de unión al antígeno de una región VH.

En una realización, la secuencia de la estirpe germinal es IGHV1-f humana (SEQ ID NO: 2), representada en la FIG.

1. En ciertas realizaciones, la secuencia de la estructura de la VH puede diferir en al menos uno, pero en no más de 2, 3, 4, 5, 10 o 15 residuos de aminoácidos, de una secuencia de la estirpe germinal, p. ej., SEQ ID NO: 2. En una realización, la estructura de la VH incluye residuos distintos de los residuos humanos correspondientes. Por ejemplo, la cadena VH incluye residuos no humanos, en una o más de las posiciones de la estructura 24, 67, 76, 80 y 94 (numeración de Kabat) de la SEQ ID NO: 2.

15 En una realización, al menos una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los dominios variables se obtienen de un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ no humano donante. En una realización, las regiones de unión al antígeno del dominio variable de la cadena pesada injertada con CDR incluyen las CDR correspondientes a las posiciones 26-34 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3) (numeración de Kabat; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., vol. 4, 1991, Departamento de Salud y Servicios Humanos, NIH, EE. UU.).

20 Por tanto, en una realización, la estructura de la cadena pesada variable (VH) tiene una secuencia de aceptor obtenida de la secuencia de la estirpe germinal de anticuerpo humano IGHV1-f.

En otra realización, al menos un amino ácido, y menos de 2, 3, 4, 5, o 10 residuos de aminoácidos, de la región FR1 de la VH es distinto del residuo de la estirpe germinal humana correspondiente. Uno o más de tales residuos pueden ser, por ejemplo, idénticos a la región de la estructura del anticuerpo no humano de la que se obtienen las secuencias de CDR. En una realización, el residuo de aminoácido en la posición de Kabat 24 se muta para que sea idéntico a la región de estructura del anticuerpo no humano.

30 En otra realización, al menos un amino ácido, y menos de 2, 3, 4, 5, o 10 residuos de aminoácidos, de la región FR2 de la VH es distinto del residuo de la estirpe germinal humana correspondiente. Uno o más de tales residuos pueden ser, por ejemplo, idénticos a la región de la estructura del anticuerpo no humano de la que se obtienen las secuencias de CDR.

35 En otra realización más, al menos un amino ácido, y menos de 2, 3, 4, 5, o 10 residuos de aminoácidos, de la FR3 de la cadena VH es distinto del residuo de la estirpe germinal humana correspondiente. Uno o más de tales residuos pueden ser, por ejemplo, idénticos a la región de la estructura del anticuerpo no humano de la que se obtienen las secuencias de CDR. En una realización, el residuo de aminoácido en la posición de Kabat 94 es idéntico a la región de estructura del anticuerpo no humano. En una realización, los residuos de aminoácidos en las posiciones de Kabat 67, 76, 80 y 94 son idénticos a la región de estructura del anticuerpo no humano.

En ciertas realizaciones, la cadena VH del anticuerpo tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

45 En un aspecto, la descripción presenta una cadena VL de anti-VLA-4 que tiene CDR de un anticuerpo anti-VLA-4 donante, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 descrito en esta solicitud, y una estructura de la VL que tiene las regiones 1, 2, 3 y 4 de la secuencia de, o que no tiene más de 5, 10 o 15 diferencias (indistintamente por región o en total) con, una secuencia de la región variable de la estirpe germinal para la cadena VL. En una realización, la región de estructura variable 4 (FR4) es una secuencia de consenso humana. En una realización, están presentes las regiones de estructura de la cadena VL completas FR1, FR2, FR3 y FR4. En otra realización, la cadena es un fragmento de unión al antígeno de una región VL.

En otra realización, la secuencia de la estirpe germinal es IGV4-1 (SEQ ID NO: 7), representada en la FIG. 2. En otras realizaciones más, la secuencia de la estructura de la VL puede diferir en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 10 o 15 residuos de aminoácidos, de una secuencia de la estructura de la estirpe germinal, p. ej., SEQ ID NO: 7. En otra realización, la VL incluye además residuos distintos de los residuos de aminoácidos humanos correspondientes. Por ejemplo, la cadena VL incluye además residuos no humanos en una o más de las posiciones de la estructura 1, 73 y 87 (numeración de Kabat) de la SEQ ID NO: 7.

60 En una realización, la secuencia es AAH7035.1 (SEQ ID NO: 12) o su versión modificada genéticamente de la estirpe

germinal (SEQ ID NO: 13), representada en la FIG. 2. En algunas realizaciones, la secuencia de la estructura de la VL puede diferir en al menos uno, pero no más de 5, 10, 15, 20, o 25 residuos de aminoácidos, de una secuencia de la estructura modificada genéticamente de la estirpe germinal, p. ej., SEQ ID NO: 13. En otra realización, la cadena VL incluye residuos distintos de los residuos de aminoácidos humanos correspondientes. Por ejemplo, la cadena VL
 5 incluye residuos no humanos en una o más de las posiciones de la estructura 1 y 87 (numeración de Kabat) de la SEQ ID NO: 12. En otra realización, la VL incluye sustituciones de aminoácidos en las regiones de estructura para asemejarse a una secuencia de la estructura de la estirpe germinal humana diferente, tal como de secuencia de la estirpe germinal IGKV4-1. En ciertas realizaciones, la secuencia de la estructura de la VL se altera para que sea idéntica a la secuencia de la estirpe germinal IGKV4-1 en las posiciones 1-3, 5-23, 35-37, 39-42, 45-49, 57, 59-61, 63-
 10 64, 70-72, 74-84, 86-88, 99-106 (numeración de Kabat) de la SEQ ID NO:12.

En una realización, al menos una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los dominios variables se obtienen de un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ no humano donante. En otra realización, las regiones de unión al antígeno del dominio variable de la cadena pesada injertada con CDR incluyen las CDR correspondientes
 15 a las posiciones 24-31 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3) (numeración de Kabat). Por tanto, en una realización, la estructura de la VL tiene una secuencia de aceptor construida a partir de la secuencia de la estirpe germinal IGKV4-1, a partir del anticuerpo AAH70335.1 o a partir del anticuerpo modificado genéticamente de la estirpe germinal AAH70335.1.

20 En otra realización más, al menos un aminoácido, y menos de 2, 3, 4, 5, 10 o 15 residuos de aminoácidos, de la FR1 de la cadena VL es distinto del residuo humano correspondiente. Uno o más de tales residuos pueden ser, por ejemplo, idénticos a la región de la estructura del anticuerpo no humano de la que se obtienen las secuencias de CDR. En una realización, el residuo de aminoácido en la posición aminoterminal de la FR1 se muta para que sea idéntico a la región de estructura del anticuerpo no humano.

25 En otra realización más, al menos un aminoácido, y menos de 2, 3, 4, 5, 10 o 15 residuos de aminoácidos, de la FR2 de la cadena VL es distinto del residuo humano correspondiente. Uno o más de tales residuos pueden ser, por ejemplo, idénticos a la región de la estructura del anticuerpo no humano de la que se obtienen las secuencias de CDR.

30 En otra realización más, al menos un aminoácido, y menos de 2, 3, 4, 5, 10 o 15 residuos de aminoácidos, de la FR3 de la VL es distinto del residuo humano correspondiente. Uno o más de tales residuos pueden ser, por ejemplo, idénticos a la región de la estructura del anticuerpo no humano de la que se obtienen las secuencias de CDR. En otra realización, el residuo de aminoácido en la posición de Kabat 87 se muta para que sea idéntico a la región de estructura del anticuerpo no humano. En otra realización más, los residuos de aminoácidos en las posiciones de Kabat 67 y 87
 35 se mutan para que sean idénticos a la región de estructura del anticuerpo no humano. En otra realización más, los residuos de aminoácidos en las posiciones de Kabat 67, 73 y 87 de la SEQ ID NO: 7 se mutan para que sean idénticos a la secuencia de la estructura del anticuerpo no humano.

En otras realizaciones, la cadena VL del anticuerpo tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:
 40 10 o SEQ ID NO: 11.

En una realización, las CDR de las secuencias de la estructura de aceptor de la VH y VL se seleccionan para que se asemejen a las secuencias de CDR de una secuencia de anticuerpo no humano (p. ej., murino), donde el anticuerpo no humano se une a la integrina alfa-4 o un fragmento de la misma. En otra realización, las secuencias de las CDR se
 45 seleccionan para que se asemejen a las secuencias de las CDR de un anticuerpo no humano que se une al epítipo B1 de la cadena $\alpha 4$ de VLA-4. En una realización, las CDR se seleccionan para que se asemejen a un anticuerpo monoclonal murino, p. ej., HP1/2, HP2/1, HP2/4, L25, P4C2 o 21.6 (Pulido y col., J. Biol. Chem. 266:10241-10245, 1991; patente de EE. UU. n.º 6.033.665). Modificación puede significar, p. ej., la escisión e inserción o alteración, p. ej., mediante mutagénesis dirigida.

50 En otro aspecto, la descripción presenta un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que incluye:

- una cadena VL de anti-VLA-4 descrita en esta solicitud, p. ej., una cadena VL de anti-VLA-4 que tiene CDR de un anticuerpo anti-VLA-4 donante, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 descrito en esta solicitud, y una estructura de la VL
 55 que tiene las regiones de estructura de la LC 1, 2 y 3 de la secuencia de, o que no tiene más de 5, 10 o 15 diferencias con, una secuencia de la región variable de la estirpe germinal para la cadena VL. En una realización, la región variable 4 es una secuencia de consenso humana; y
- una cadena VH de anti-VLA-4 descrita en esta solicitud, p. ej., una cadena VL de anti-VLA-4 que tiene CDR de un anticuerpo anti-VLA-4 donante, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 descrito en esta solicitud, y una estructura de la VL
 60 que tiene las regiones de estructura de la LC 1, 2 y 3 de la secuencia de, o que no tiene más de 5, 10 o 15 diferencias

con, una secuencia de la región variable de la estirpe germinal para la cadena VL. En una realización, la región variable 4 es una secuencia de consenso humana.

En una realización, el anticuerpo se une a una o ambas de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$.

5

En otro aspecto, una cadena VL o VH, o un anticuerpo, o un fragmento del mismo, descritos en esta solicitud están marcados de forma detectable.

En otro aspecto más, la descripción presenta un vector que contiene ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, descritos en esta solicitud. En algunas realizaciones, el ADN del vector codifica una VH que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5.

10

En otro aspecto más, la descripción presenta un vector que contiene ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, descritos en esta solicitud. En algunas realizaciones, el ADN del vector codifica una cadena VL que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

15

En otro aspecto más, la descripción presenta un vector que contiene ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, descritos en esta solicitud y una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, descritos en esta solicitud.

20

En otro aspecto, la descripción presenta una célula hospedadora que contiene un vector descrito en esta solicitud, p. ej., uno capaz de expresar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cadena pesada y/o ligera descritas en esta solicitud.

25

En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para fabricar un anticuerpo anti- $\alpha 4$ recombinante, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, proporcionando una célula hospedadora transfectada con (a) una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo descrita en esta solicitud, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, y (b) una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, y cultivando la célula transfectada para producir la molécula de anticuerpo anti- $\alpha 4$ recombinante o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo. El ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de anticuerpo se puede producir en el mismo vector o en vectores diferentes.

30

En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para fabricar un anticuerpo anti- $\alpha 4$ recombinante, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, proporcionando una célula hospedadora transfectada con (a) una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, p. ej., donde la secuencia de ADN tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, 4 o 5, y (b) una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, p. ej., donde la secuencia de ADN tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8, 9, 10 u 11, y cultivando la estirpe celular transfectada para producir la molécula de anticuerpo anti- $\alpha 4$ recombinante o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo. El ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de anticuerpo se puede producir en el mismo vector o en vectores diferentes.

35

40

En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para tratar una enfermedad o un trastorno mediados por una integrina $\alpha 4$, p. ej., una integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) o $\alpha 4\beta 7$, administrando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra $\alpha 4$ descritos en esta solicitud, o una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o fragmento, a un sujeto con necesidad de tal tratamiento. El sujeto puede tener, o estar en riesgo de desarrollar, por ejemplo, trastornos inflamatorios, inmunitarios o autoinmunitarios (p. ej., inflamación del sistema nervioso central tal como esclerosis múltiple, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcoidosis, vasculitis del SNC, encefalitis y mielitis transversa), rechazo de injertos de tejidos u órganos o enfermedad de injerto contra hospedador, lesión aguda del SNC, tal como accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico (TCE) o lesión medular (LM); enfermedad renal crónica; alergia, p. ej., asma alérgico; diabetes sacarina de tipo 1; enteropatía inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; miastenia grave; fibromialgia; trastornos artríticos, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica; trastornos cutáneos inflamatorios/inmunitarios, tales como psoriasis, vitiligo, dermatitis, liquen plano; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; neoplasias hematológicas malignas, tales como mieloma múltiple, leucemia, linfoma; neoplasias malignas sólidas, tales como sarcomas o carcinomas, p. ej., de pulmón, mama, próstata, cerebro; y trastornos fibróticos, tales como fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis semilunar, nefropatía diabética y fibrosis intersticial renal.

50

55

En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para tratar a un paciente administrando al paciente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a $\alpha 4$. En una realización, el paciente tiene una neoplasia maligna, tal

60

como un tumor sólido o una neoplasia hematológica maligna. Por ejemplo, un paciente tratado con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a $\alpha 4$ puede tener leucemia mielógena aguda (LMA) o mieloma múltiple (MM).

5 En otra realización, el paciente tiene un trastorno inflamatorio, tal como la esclerosis múltiple, asma (p. ej., asma de moderado a grave), artritis reumatoide, diabetes o enfermedad de Crohn. En otra realización, la composición se administra como una pauta posológica. En otra realización más, el procedimiento incluye además seleccionar un paciente adecuado para el tratamiento con la composición. Un paciente adecuado para el tratamiento, por ejemplo, ha presentado un signo o síntoma indicativo de comienzo de la enfermedad, tal como un signo o síntoma indicativo de EM.

10

En otra realización más, el procedimiento incluye además administrar al paciente un segundo agente terapéutico, tal como un agente quimioterápico, un agente trombolítico, un agente neuroprotector, un agente antiinflamatorio, un esteroide, una citocina o un factor de crecimiento.

15 En una realización, se administra al paciente un anticuerpo anti-VLA-4 humanizado, o un fragmento del mismo, descrito en esta solicitud, tal como HuHP1/2, H1L1, H1L2 o H1L3.

20 En una realización, la composición que contiene un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ se administra como una pauta posológica, tal como a intervalos regulares. Por ejemplo, la composición se puede administrar una vez al día, a la semana o al mes; una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o más; o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o más.

25 En una realización, la administración se puede ajustar según la tasa de eliminación de un paciente de una administración anterior de anticuerpo anti- $\alpha 4$. Por ejemplo, en una realización, no se administrará a un paciente una segunda dosis o dosis de continuación antes de que la concentración de anticuerpos anti- $\alpha 4$ en el sistema del paciente haya caído por debajo de una concentración predeterminada. En una realización, se ensaya una muestra de un paciente (p. ej., muestra de plasma, suero, sangre u orina) para determinar la presencia de anticuerpos anti- $\alpha 4$ y, si la concentración de anticuerpos anti- $\alpha 4$ es superior a una concentración predeterminada, no se administrará al paciente una segunda dosis o dosis de continuación. Si la concentración de anticuerpos anti- $\alpha 4$ en el sistema del paciente es inferior a una concentración predeterminada, entonces se administrará al paciente una segunda dosis o dosis de continuación.

30 En una realización, la composición se administra de forma continua, p. ej., a lo largo de un período superior a 30 minutos, pero inferior a 1, 2, 4, o 12 horas. La composición que contiene el anticuerpo y el segundo agente se puede administrar mediante cualquier procedimiento apropiado, p. ej., por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

35 En algunas realizaciones, cada uno de ellos, el anticuerpo y el segundo agente, se administra en la misma dosis que se prescribe para monoterapia. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra en una dosis que es igual o inferior a una cantidad necesaria para que sea eficaz si se administra solo. Asimismo, el segundo agente se puede administrar en una dosis que es igual o inferior a una cantidad necesaria para que sea eficaz si se administra solo.

Otro aspecto presentado en la descripción es un procedimiento para evaluar a un paciente determinando si el paciente cumple un criterio preseleccionado y, si el paciente cumple el criterio preseleccionado, aprobando, proporcionando, prescribiendo o administrando una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4 descrita en esta solicitud al paciente.

45 En una realización, el criterio preseleccionado es la incapacidad del paciente para responder adecuadamente a un tratamiento o una pauta posológica alternativa, p. ej., para el tratamiento de la EM. En otra realización, el criterio preseleccionado es la ausencia de cualquier signo o síntoma de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) o la ausencia de cualquier diagnóstico de LMP. En algunos casos, la selección se basa en la ausencia de un factor de riesgo para la LMP, por ejemplo, el sujeto no es positivo para ADN del virus JC o no es positivo para anticuerpos contra el virus JC. En otra realización, el criterio es como se describe en el documento PCT/US07/75577 (publicado como WO2008/021954), que describe procedimientos y sistemas para la distribución de fármacos y para el suministro de fármacos a los pacientes.

50 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para distribuir una composición descrita en esta solicitud. La composición contiene un anticuerpo de unión a alfa-4. El procedimiento incluye proporcionar a un destinatario (p. ej., un usuario final, un paciente, un médico, una farmacia minorista o mayorista, un distribuidor, o departamento de farmacia de un hospital, un dispensario de una residencia de ancianos o un seguro médico de oferta restringida) un envase que contiene suficientes dosis unitarias del fármaco para tratar a un paciente durante al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses. En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para evaluar la calidad de un envase o lote de envases (p. ej., para determinar si ha caducado) de una composición descrita en esta solicitud que contiene un

60

anticuerpo de unión a alfa-4. El procedimiento incluye evaluar si el envase ha caducado. La fecha de caducidad es al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses, p. ej., superior a 24 o 36 meses, a partir de un acontecimiento preseleccionado, tal como la fabricación, el ensayo o el envasado. En algunas realizaciones, se toma una decisión o medida como resultado del análisis. Por ejemplo, en función del análisis oportuno, el anticuerpo del envase se usa o se desecha, se clasifica, se selecciona, se libera o se retiene, se envía, se traslada a una nueva ubicación, se libera al mercado, se vende, o se ofrece para la venta, se retira del mercado o se deja de ofrecer para la venta, en función de si el producto ha caducado.

En otro aspecto, la descripción presenta un envase que contiene al menos dos dosis unitarias de una composición acuosa que contiene un anticuerpo de unión a $\alpha 4$. En una realización, todas las dosis unitarias contienen la misma cantidad de anticuerpo, y en otras realizaciones hay dosis unitarias de dos o más cantidades de principio activo, o dos o más formulaciones diferentes, p. ej., que tienen cantidades de principio activo o propiedades de liberación diferentes.

En otro aspecto, la descripción incluye un procedimiento para informar a un destinatario sobre la administración de una formulación que contiene anticuerpo de unión a $\alpha 4$. El procedimiento incluye informar al destinatario (p. ej., un usuario final, un paciente, un médico, una farmacia minorista o mayorista, un distribuidor, o un departamento de farmacia de un hospital, un dispensario de una residencia de ancianos o un seguro médico de oferta restringida) de que el anticuerpo se debe administrar a un paciente según una pauta posológica descrita en esta solicitud. El procedimiento también puede incluir informar al destinatario de que el anticuerpo se debe administrar antes de la fecha de caducidad. La fecha de caducidad es al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses, p. ej., superior a 24 o 36 meses, a partir de un acontecimiento preseleccionado, tal como la fabricación, el ensayo o el envasado. En una realización, el destinatario también recibe un suministro del anticuerpo, p. ej., un suministro de dosis unitarias del anticuerpo.

En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para fabricar un anticuerpo que incluye CDR de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano, p. ej., un anticuerpo murino, y una o ambas estructuras de la región variable de la cadena pesada y ligera obtenidas de una o más regiones de estructura de la región variable de la estirpe germinal humana. El procedimiento incluye uno o ambos de 1 y 2, donde 1 y 2 son los siguientes:

1. identificar o seleccionar una estructura variable de la cadena pesada de aceptor humano estable que tiene los mismos residuos que la cadena pesada de donante no humano en uno o más de los residuos de uno o más de a), b) y c):

- a) n.º de Kabat 2, 4, 24, 26, 27, 29, 36, 38, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 69, 71, 78, 93 y 94 de la VH, que, sin ceñirnos a la teoría, se cree que son importantes para mantener las conformaciones de las CDR;
- b) n.º de Kabat 1, 2, 27, 28, 30, 43, 66, 68, 70, 72, 73, 74 y 75 de la VH, que, sin ceñirnos a la teoría, se cree que son importantes para interactuar con el antígeno; y
- c) n.º de Kabat 37, 39, 44, 45, 47, 91, 93 y 103 de la VH, que, sin ceñirnos a la teoría, se cree que son importantes para la integridad de la interfaz VH/VL; y

2. identificar o seleccionar una estructura variable de la cadena ligera de aceptor estable que tiene los mismos residuos que la cadena ligera de donante en uno o más de los residuos de uno o más de a), b) y c):

- a) n.º de Kabat 2, 4, 38, 43, 44, 48, 58, 64, 71 y 73 de la VL, que, sin ceñirnos a la teoría, se cree que son importantes para mantener las conformaciones de las CDR;
- b) n.º de Kabat 1, 2, 49, 57, 60, 63, 65, 66, 67, 68, 69 y 70 de la VL, que, sin ceñirnos a la teoría, se cree que son importantes para interactuar con el antígeno; y
- c) n.º de Kabat 36, 38, 43, 44, 46, 49, 87 y 98 de la VL, que, sin ceñirnos a la teoría, se cree que son importantes para la integridad de la interfaz VH/VL; y

3. proporcionar una región variable que tiene CDR del donante y teniendo la estructura de la estirpe germinal seleccionada residuos emparejados identificados en 1 o 2, tal como seleccionando una secuencia de la estirpe germinal y retromutando además residuos adicionales identificados en 1 o 2 de la estirpe germinal a la secuencia murina para maximizar adicionalmente el emparejamiento en los residuos identificados en 1 y 2; y

4. evaluar cada posición emparejada, tal como mediante análisis o modelado estructural 3D y, si una posición cumple un patrón de riesgo predeterminado para el riesgo de, por ejemplo, interferir con las conformaciones de las CDR, las interacciones antigénicas o la integridad de la interfaz VH/VL, a continuación, reintroducir un residuo murino equivalente, o un residuo de anticuerpo humano común, compatible con la estructura del anticuerpo.

En una realización, al menos 3, 4 o 5 de los residuos identificados en (1.a) están emparejados. Por ejemplo, en una

realización, los residuos 24, 29 o 94 están emparejados.

En una realización, al menos 3, 4 o 5 de los residuos identificados en (1.b) están emparejados. Por ejemplo, en una realización, los residuos 1, 73 o 75 están emparejados.

5

En una realización, al menos 3, 4 o 5 de los residuos identificados en (1.c) están emparejados. Por ejemplo, en una realización, los residuos 37, 93 o 103 están emparejados.

En una realización, al menos 3, 4 o 5 de los residuos identificados en (2.a) están emparejados. Por ejemplo, en una realización, los residuos 2, 71 y 73 están emparejados.

10

En una realización, al menos 3, 4 o 5 de los residuos identificados en (2.b) están emparejados. Por ejemplo, en una realización, los residuos 1, 68 o 70 están emparejados.

En una realización, al menos 3, 4 o 5 de los residuos identificados en (2.c) están emparejados. Por ejemplo, en una realización, los residuos 46, 87 o 98 están emparejados.

15

En una realización, el residuo 6 de (1.a), residuo 2 de (1.b) y residuo 4 de (1.c) están emparejados.

En otra realización, el residuo 4 de (2.a), residuo 2 de (2.b) y residuo 4 de (2.c) están emparejados.

20

En una realización, la secuencia de la estirpe germinal de la cadena pesada es de la clase de estirpe germinal VH3, VH1 y VH5. En otra realización, la secuencia de la estirpe germinal de la cadena ligera es una secuencia κ o λ .

25

[0058]El término “tratar” se refiere a administrar una terapia en una cantidad, de una manera y/o un modo eficaz para mejorar una afección, un síntoma o un parámetro asociado a un trastorno o para impedir la progresión de un trastorno, indistintamente en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable por un experto en la materia. Una cantidad, una manera o un modo eficaces pueden variar en función del sujeto y se pueden personalizar para el sujeto.

30

Un “anticuerpo de unión a $\alpha 4$ ” se refiere a un anticuerpo que se une a la subunidad $\alpha 4$ de la integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) e inhibe, al menos parcialmente, una actividad de VLA-4, particularmente una actividad de unión de una integrina VLA-4 o una actividad de señalización, p. ej., la capacidad para transducir una señal mediada por VLA-4. Por ejemplo, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede inhibir la unión de VLA-4 a un ligando análogo de VLA-4, p. ej., una proteína de la superficie celular tal como VCAM-1 (molécula de adhesión a las células vasculares 1), o a un componente de la matriz extracelular, tal como fibronectina u osteopontina. Un anticuerpo de unión a alfa-4 se puede unir tanto a $\alpha 4\beta 1$ como a $\alpha 4\beta 7$. Habitualmente, el anticuerpo se une al epítipo B1 de $\alpha 4$. Un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ se puede unir a VLA-4 con una K_d inferior a aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o 10^{-11} M.

35

Como se emplea en esta solicitud, el término “anticuerpo” se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, p. ej., una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en esta solicitud como VH) y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en esta solicitud como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos κ o λ . En una realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad mediada por el complemento, o puede no ser funcional para una o ambas de estas actividades.

45

Las regiones VH y VL también se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (“CDR”), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones de estructura” (FR). La cantidad de FR y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, EA, y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación del NIH n.º 91-3242 y Chothia, C. y col. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). En esta solicitud se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL está compuesta habitualmente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del aminoterminal al carboxiterminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

55

Un “dominio de inmunoglobulina” se refiere a un dominio del dominio variable o constante de las moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina contienen habitualmente dos láminas β formadas a partir de aproximadamente siete hebras β , y un enlace disulfuro conservado (véase, p. ej., AF Williams y AN Barclay (1988)

60

Ann. Rev. Immunol. 6:381-405).

Como se emplea en esta solicitud, una "secuencia de dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia
 5 puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos aminotermiales o carboxitermiales, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o pueden incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina se puede asociar con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión diana (o "sitio de unión al
 10 antígeno"), p. ej., una estructura que interactúa con VLA-4.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además toda o parte de una región constante de la cadena pesada o ligera, para formar de ese modo una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina.
 15 Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina pueden estar conectadas mediante enlaces disulfuro. La región constante de la cadena pesada incluye habitualmente tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera habitualmente incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos habitualmente median la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del hospedador, lo que incluye diversas células del sistema inmunitario
 20 (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ), con algunas subclases entre ellas (p. ej., γ 1- γ 4). La naturaleza de esta cadena es
 25 lo que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que otorgan especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles para el experto en la materia habida cuenta de la presente descripción y, por consiguiente, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del
 30 alcance de la presente invención. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda indistintamente.

El término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse específicamente a una diana de interés,
 35 p. ej., VLA-4. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento
 40 dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) que conserva su funcionalidad. Asimismo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes independientes, estos se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un grupo enlazador sintético que permite su síntesis como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena simple (scFv). Véase, p. ej.,
 45 Bird y col. (1988) Science 242:423-426 y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

En algunas realizaciones, los anticuerpos antes descritos están pegilados.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos antes descritos son multiespecíficos. En
 50 realizaciones adicionales, los anticuerpos o fragmentos de los mismos antes descritos son monovalentes o biespecíficos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que se presenta a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de
 55 la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra las tres variantes de secuencia de la cadena pesada de HP1/2 con respecto a la cadena pesada
 60 de IGHV1-f de la estirpe germinal humana. Las letras minúsculas encima de la secuencia representan inserciones

según el esquema de numeración de Kabat.

La FIG. 2 muestra las cuatro variantes de secuencia de la cadena ligera de HP1/2 con respecto a una secuencia del anticuerpo IGKV4-1 de la estirpe germinal (Diseño L0, L1, y L2) o una secuencia del anticuerpo AAH7033.1 humano modificado genéticamente en la estirpe germinal (Diseño L3). Las letras minúsculas encima de la

5

secuencia representan inserciones según el esquema de numeración de Kabat.

La FIG. 3 es una gráfica que representa los resultados de ensayos ELISA.

La FIG. 4 es una gráfica que representa los resultados de ensayos ELISA.

La FIG. 5 es la secuencia de aminoácidos de un Fc de IgG4 (dominio bisagra + CH2 + CH3). La región bisagra se representa en negrita y el dominio CH3 está subrayado. La "S" dentro del recuadro es Ser228. La "N" dentro del

10

círculo es Asn297.

La FIG. 6 es una gráfica que representa los datos de citometría de flujo de la unión de HuHP1/2 a diversas estirpes de células tumorales. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.

Las FIG. 7A-7C son una serie de gráficas que representan la inhibición de la unión de estirpes de células de LMA a pocillos revestidos con fibronectina o VCAM1-Ig por el HuHP1/2. La FIG. 7A representa la inhibición de la unión de células HL60 y KG1 a pocillos revestidos con FN. La FIG. 7B representa la inhibición de la unión de células KG1 a pocillos revestidos con VCAM1-Ig. La FIG. 7C representa la inhibición de la unión de células HL60 a pocillos revestidos con FN y VCAM1-Ig cuando se incubaron con 20 µg/mL de HuHP1/2 (barras sólidas). Las barras claras indican el porcentaje de adhesión celular en presencia de un control de isotipo. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.

15

Las FIG. 8A-8C constituyen una serie de gráficas que representan la inhibición de la unión de estirpes de células de MM a pocillos revestidos con fibronectina o VCAM1-Ig por el HuHP1/2. La FIG. 8A representa la inhibición de la unión de células U266 y H929 a pocillos revestidos con FN. La FIG. 8B representa la inhibición de la unión de células U266 y H929 a pocillos revestidos con VCAM1-Ig. La FIG. 8C representa la inhibición de la unión de células U266 a pocillos revestidos con FN y VCAM1-Ig cuando se incubaron con 20 µg/mL de HuHP1/2 (barras sólidas). Las barras claras indican el porcentaje de adhesión celular en presencia de un control de isotipo. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.

20

25

Las FIG. 9A-9C constituyen una serie de gráficas que representan la inhibición de la unión de estirpes de células de LLC a pocillos revestidos con fibronectina o VCAM1-Ig por el HuHP1/2. La FIG. 9A representa la inhibición de la unión de células Mec1 y JM1 a pocillos revestidos con FN. La FIG. 9B representa la inhibición de la unión de células Mec1 y JM1 a pocillos revestidos con VCAM1-Ig. La FIG. 9C representa la inhibición de la unión de células Mec1 a pocillos revestidos con FN y VCAM1-Ig cuando se incubaron con 20 µg/mL de HuHP1/2 (barras sólidas). Las barras claras indican el porcentaje de adhesión celular en presencia de un control de isotipo. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.

30

35 Descripción detallada

Se ha demostrado que los anticuerpos contra VLA-4 son útiles para tratar enfermedades. Por ejemplo, natalizumab (Tysabri®), un anticuerpo anti-VLA-4 se usa para tratar la esclerosis múltiple recurrente y la enfermedad de Crohn. Sin embargo, para el tratamiento de ciertas afecciones, por ejemplo, afecciones agudas tales como lesión medular (LM) o traumatismo craneoencefálico (TCE), o los tratamientos que se administran en un número finito, tales como el tratamiento de cáncer, puede ser ventajoso tratar con un anticuerpo anti-VLA-4 que se une con una afinidad diferente a la de natalizumab, p. ej., una afinidad superior. Además, el tratamiento con anticuerpos anti-VLA-4 se asocia a un trastorno raro, pero a veces letal, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), para la que una parte del tratamiento requiere la eliminación del anticuerpo del sujeto tratado, por ejemplo, usando plasmaféresis o

40

45

50

inmunoabsorción. Debido a la necesidad de eliminar el anticuerpo, también es deseable equilibrar las ventajas de un anticuerpo que tiene afinidad superior por VLA-4 con la desventaja de un anticuerpo que se une tan fuertemente que dificulta la eliminación o crea un riesgo asociado a una velocidad de recambio lenta. Tales anticuerpos también pueden ser útiles para tratar afecciones, tales como la esclerosis múltiple, en las que se puede requerir un tratamiento menos frecuente o la administración por medios distintos de la infusión puede ser más eficaz. Al permitir el tratamiento con dosis inferiores también puede reducir el riesgo de acontecimientos adversos tales como LMP. Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos que tienen tales propiedades deseables.

La invención se basa, al menos en parte, en las características inesperadas de los anticuerpos de unión a $\alpha 4$ humanizados recientemente diseñados que tienen una afinidad de unión por $\alpha 4$ que es 10 veces superior a la del anticuerpo anti- $\alpha 4$ natalizumab.

55

Se proporcionan anticuerpos de unión a alfa-4, y fragmentos de los mismos, en los que las estructuras de la cadena ligera variable (VL) y la cadena pesada variable (VH) tienen secuencias de aceptor construidas a partir de secuencias de la estirpe germinal o de anticuerpos modificados genéticamente en la estirpe germinal, tales como los anticuerpos IGKV4-1, geAAH70335.1 o IGHV1-f. Las secuencias de CDR se obtienen de anticuerpos de unión a $\alpha 4$ no humanos

60

tales como el anticuerpo anti-VLA-4 HP1/2. Los anticuerpos descritos en esta solicitud pueden tener un aumento de al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 veces en la afinidad, p. ej., con respecto a su precursor murino. En una realización, el aumento de la afinidad es al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 veces, pero es, respectivamente, inferior a 25, 20, o 15 veces.

5 **Composiciones farmacéuticas**

Un agente de unión a $\alpha 4$, tal como un anticuerpo de unión a VLA-4, se pueden formular como una composición farmacéutica. Habitualmente, una composición farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se emplea en esta solicitud, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no presenta ningún efecto toxicológico no deseado (véase, p. ej., Berge, SM, y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico y similares, así como a partir de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las obtenidas a partir de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como a partir de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Las composiciones de anticuerpos descritas en esta solicitud se pueden formular según procedimientos conocidos en la técnica. La formulación farmacéutica es una técnica bien consolidada y se describe adicionalmente en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel y col., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3^a ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

En una realización, el anticuerpo contra $\alpha 4$ se puede formular con excipientes, tales como cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, fosfato de sodio monobásico y polisorbato 80. En otra realización, el anticuerpo contra $\alpha 4$ se puede formular en un tampón de citrato, p. ej., a pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7, o 7,5. En otra realización más, el anticuerpo contra $\alpha 4$ se puede formular en una solución que incluye 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 o 15 % de sucrosa. Se puede proporcionar, por ejemplo, en una solución tamponada a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml y se puede almacenar a 2-8 °C.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en un abanico de formas distintas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma puede depender de la vía de administración y el uso terapéutico previstos. Habitualmente, las composiciones para los agentes descritos en esta solicitud están en forma de soluciones inyectables o para infusión.

Tales composiciones se pueden administrar por vía parenteral (p. ej., inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). Las expresiones "administración parenteral" y "administrada por vía parenteral" como se emplean en esta solicitud significan vías de administración distintas de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Habitualmente, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Una composición farmacéutica también se puede ensayar para garantizar que cumple la normativa legal e industrial para su administración.

La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura requerida adecuada para concentraciones de fármaco elevadas. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un agente descrito en esta solicitud en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando un agente descrito en esta solicitud en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre aquellos enumerados

anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación habituales son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo de un agente descrito esta solicitud más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un
 5 revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

10 Administración

Un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ se puede administrar a un sujeto, p. ej., un sujeto humano, mediante un abanico de procedimientos. Para muchos usos, la vía de administración es una de: inyección o infusión intravenosa, inyección subcutánea o inyección intramuscular. Un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ se puede administrar como una dosis fija, o en
 15 una dosis de mg/kg. El anticuerpo se puede administrar por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.). Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar en una dosis unitaria fija de entre aproximadamente 50-600 mg i.v., p. ej., cada 4 semanas, o entre aproximadamente 50-100 mg s.c. (p. ej., 75 mg), p. ej., al menos una vez a la semana (p. ej., dos veces a la semana). En una realización, el anticuerpo se administra i.v. en una dosis unitaria fija de 50 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 180 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg o 600 mg o
 20 superior. La administración de la dosis i.v. puede ser una o dos o tres veces o más a la semana, o una vez cada dos, tres, cuatro o cinco semanas, o menos frecuentemente.

En una realización, el anticuerpo se administra s.c. en una dosis unitaria fija de 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 100 mg, o 120 mg o superior. La administración de la dosis s.c. puede ser una o dos o tres veces o más a la semana,
 25 o una vez cada dos, tres, cuatro o cinco semanas, o menos frecuentemente.

Un anticuerpo anti- $\alpha 4$ también se puede ser administrar en un bolo en una dosis de entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg, p. ej., aproximadamente 6,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 1,0 mg/kg. Los intervalos de dosis modificados incluyen una dosis que es inferior a aproximadamente 600 mg/sujeto, aproximadamente 400 mg/sujeto,
 30 aproximadamente 300 mg/sujeto, aproximadamente 250 mg/sujeto, aproximadamente 200 mg/sujeto o aproximadamente 150 mg/sujeto, habitualmente para administración cada cuatro semanas o una vez al mes. El anticuerpo de unión a $\alpha 4$ se puede administrar, por ejemplo, cada tres a cinco semanas, p. ej., cada cuatro semanas, o mensualmente.

35 La administración se puede ajustar según la tasa de eliminación del paciente de una administración anterior de anticuerpo anti- $\alpha 4$. Por ejemplo, no se podrá administrar a un paciente una segunda dosis o dosis de continuación antes de que la concentración de anticuerpos anti- $\alpha 4$ en el sistema del paciente haya caído por debajo de una concentración predeterminada. En una realización, se ensaya una muestra de un paciente (p. ej., plasma, suero, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR)) para determinar la presencia de anticuerpos anti- $\alpha 4$ y, si la concentración
 40 de anticuerpos anti- $\alpha 4$ es superior a una concentración predeterminada, no se administrará al paciente una segunda dosis o dosis de continuación. Si la concentración de anticuerpos anti- $\alpha 4$ en el sistema del paciente es inferior a una concentración predeterminada, entonces se administrará al paciente una segunda dosis o dosis de continuación. Un paciente cuya concentración de anti- $\alpha 4$ se determine que es demasiado alta (por encima de la concentración predeterminada) se puede volver a evaluar después de uno, dos o tres días, o una semana, y, si la concentración de
 45 anticuerpo anti- $\alpha 4$ en las muestras de paciente ha caído por debajo de la concentración predeterminada, se podrá administrar al paciente una segunda dosis o dosis de continuación de anticuerpo.

La dosis también se puede elegir para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el anticuerpo de unión a $\alpha 4$, para conseguir una saturación superior a 40, 50, 70, 75 y 80 % de la subunidad $\alpha 4$, para conseguir una saturación
 50 inferior a 80, 70, 60, 50 o 40 % de la subunidad $\alpha 4$, o para impedir un aumento en la concentración de leucocitos circulantes.

En ciertas realizaciones, el agente activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, lo que incluye implantes y sistemas de
 55 administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilén vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en términos generales. Véase, p. ej., Controlled Drug Delivery (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), segunda edición, J. Robinson and V. H. L. Lee, eds., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987.

60

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar con un dispositivo médico. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes de EE. UU. n.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos se comentan en, p. ej., la patente de EE.

- 5 UU. n.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para administrar medicación a una velocidad controlada; la patente de EE. UU. n.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE. UU. n.º 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión exacta; la patente de EE. UU. n.º 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para administración continua de fármacos; la patente de
 10 EE. UU. n.º 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos que tiene compartimentos multicámara; y la patente de EE. UU. n.º 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos. Evidentemente, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos.

- Esta descripción también presenta un dispositivo para administrar un primer y segundo agente. El dispositivo puede
 15 incluir, por ejemplo, uno o más compartimentos para almacenar preparaciones farmacéuticas y puede ser configurado para administrar dosis unitarias del primer y segundo agente. El primer y segundo agentes se pueden almacenar en los mismos compartimentos o en compartimentos independientes. Por ejemplo, el dispositivo puede combinar los agentes antes de su administración. También es posible usar dispositivos diferentes para administrar el primer y segundo agente.

- 20 Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada, tal como una respuesta terapéutica o un efecto terapéutico combinatorio. Generalmente, se puede usar cualquier combinación de dosis (ya sean independientes o coformuladas) del agente de unión a VLA-4 y el segundo agente con el fin de proporcionar a un sujeto ambos agentes en cantidades biodisponibles.

- 25 La forma farmacéutica unitaria o “dosis fija”, como se emplea en esta solicitud, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario y, opcionalmente, en asociación con el otro agente.

- 30 Una composición farmacéutica puede incluir “una cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente descrito en esta solicitud. Tales cantidades eficaces se pueden determinar en base al efecto combinatorio del primer y segundo agente administrados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente también puede variar en función de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del compuesto para producir
 35 una respuesta deseada en el individuo, tal como la mejora de al menos un parámetro del trastorno, p. ej., un parámetro de la esclerosis múltiple, o la mejora de al menos un síntoma del trastorno, p. ej., un síntoma de la esclerosis múltiple, tal como atrofia muscular, ataxia y temblores. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que todos los efectos tóxicos o perjudiciales de la composición se ven compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

40 **Dispositivos y Kits**

- Las formulaciones que contienen un anticuerpo descrito en esta solicitud se pueden administrar con un dispositivo médico. El dispositivo se puede diseñar con características como facilidad de transporte, almacenamiento a
 45 temperatura ambiente y facilidad de uso para que se pueda usar en situaciones de emergencia, tal como por un sujeto sin formación o por personal de urgencias in situ, y se pueda trasladar a instalaciones médicas y a otros equipos médicos. El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más compartimentos para almacenar preparaciones farmacéuticas que incluyen un anticuerpo de unión a $\alpha 4$, o se puede configurar para administrar una o más dosis unitarias del agente.

- 50 Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar con un dispositivo de administración transcutánea, tal como una jeringa, lo que incluye una jeringa hipodérmica o multicámara. Otros dispositivos de administración adecuados incluyen endoprótesis vasculares, catéteres, microagujas y dispositivos de liberación controlada implantables. La composición se puede administrar por vía intravenosa con un equipo i.v. estándar, lo que incluye, por
 55 ejemplo, vías i.v., con o sin filtros en línea. En ciertas realizaciones, el dispositivo será una jeringa para su uso en administración s.c. o i.m.

- Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los
 60 dispositivos descritos en las patentes de EE. UU. n.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880;

4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos perfectamente conocidos se describen en, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para administrar medicación a una velocidad controlada; la patente de EE. UU. n.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE. UU. n.º 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión exacta; la patente de EE. UU. n.º 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de EE. UU. n.º 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos que tiene compartimentos multicámara; y la patente de EE. UU. n.º 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmóticos. La composición terapéutica también puede estar en forma de una formulación de liberación controlada biodegradable o no biodegradable para administración subcutánea o intramuscular. Los procedimientos para tales composiciones se conocen en la técnica. La administración continua también se puede conseguir usando una bomba implantable o externa. La administración también se puede llevar a cabo de forma intermitente, tal como mediante una única inyección diaria, o de forma continua a una dosis baja, tal como en una formulación de liberación controlada. El dispositivo de administración se puede modificar para que sea totalmente adecuado para la administración de un anticuerpo de unión a $\alpha 4$. Por ejemplo, una jeringa se puede siliconar hasta un grado que sea óptimo para el almacenamiento y la administración del anticuerpo. Evidentemente, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos.

Esta descripción también presenta un dispositivo para administrar un primer y segundo agente (p. ej., un anticuerpo y un segundo agente). El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más compartimentos para almacenar preparaciones farmacéuticas y puede ser configurado para administrar dosis unitarias del primer y segundo agente. El primer y segundo agentes se pueden almacenar en los mismos compartimentos o en compartimentos independientes. En una realización, el dispositivo combina los agentes antes de su administración. En algunas realizaciones, el primer y segundo agentes se administran mediante dispositivos diferentes.

Un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ se puede proporcionar en un kit. En una realización, el kit incluye (a) un envase que contiene una composición que incluye una concentración alta de anticuerpo de unión a VLA-4, opcionalmente (b) un envase que contiene una composición que incluye un segundo agente y, opcionalmente, (c) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, comercial u otro material que se refiere a los procedimientos descritos en esta solicitud y/o al uso de los agentes para obtener un beneficio terapéutico. En una realización, el kit también incluye un segundo agente. Por ejemplo, el kit incluye un primer envase que contiene una composición que incluye el anticuerpo de unión a $\alpha 4$ y un segundo envase que incluye el segundo agente.

El material informativo de los kits no está limitado en cuanto a su forma. En una realización, el material informativo puede incluir información sobre la producción del anticuerpo, la concentración, la fecha de caducidad, información del lote o el centro de producción, etc. En una realización, el material informativo se refiere a los procedimientos para administrar el anticuerpo de unión a $\alpha 4$, p. ej., en una dosis, forma farmacéutica o vía de administración adecuadas (p. ej., una dosis, forma farmacéutica o vía de administración descritas en esta solicitud), para tratar a un sujeto que tiene un trastorno agudo, tal como lesión medular o traumatismo craneoencefálico, o una enfermedad inflamatoria (p. ej., EM), o que tiene riesgo de padecer un episodio asociado a una enfermedad inflamatoria. La información se puede proporcionar en un abanico de formatos, que incluyen texto impreso, material legible por ordenador, grabaciones de vídeo o grabaciones de audio, o información que proporciona un enlace o dirección para acceder a material importante.

Además del agente, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizante o un conservante. El agente se puede proporcionar en cualquier forma, p. ej., en forma líquida, seca o liofilizada, y sustancialmente puro y/o estéril. Cuando los agentes se proporcionan en una solución líquida, la solución líquida es habitualmente una solución acuosa. Cuando los agentes se proporcionan como una forma seca, la reconstitución generalmente se realiza mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, p. ej., agua o tampón estéril, se puede proporcionar opcionalmente en el kit.

El kit puede incluir uno o más envases para la composición o composiciones que contienen los agentes. En algunas realizaciones, el kit contiene envases independientes, separadores o compartimentos para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, un vial o una jeringuilla, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos independientes del kit están contenidos dentro de un envase único y no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, un recipiente o una jeringa que contienen unido a los mismos el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (p. ej., un lote) de envases individuales, que contienen cada uno una o más formas farmacéuticas unitarias (p. ej., una forma farmacéutica descrita en esta solicitud) de los agentes. Los envases pueden incluir una forma farmacéutica unitaria de combinación, p. ej., una unidad que incluye tanto el anticuerpo de unión a $\alpha 4$ como el segundo agente, tal como en una proporción deseada. Por ejemplo,

el kit puede incluir una pluralidad de jeringas, ampollas, envases de aluminio, envases de tipo blíster o dispositivos médicos, que contienen cada uno, por ejemplo, una dosis unitaria de combinación. Los envases de los kits pueden ser herméticos, impermeables (p. ej., impermeables a los cambios de humedad o la evaporación) y/o herméticos a la luz.

5

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para administrar la composición, p. ej., una jeringa u otro dispositivo de administración adecuado. El dispositivo se puede proporcionar precargado con uno o ambos agentes o puede estar vacío, pero preparado para su carga.

10 **Oncología**

Los anticuerpos de unión a $\alpha 4$ y los procedimientos descritos en esta solicitud se pueden usar para tratar el cáncer, lo que incluye neoplasias sólidas malignas y neoplasias hematológicas malignas. Las neoplasias sólidas malignas ejemplares incluyen sarcomas y carcinomas, tales como de pulmón, mama, páncreas, colon, próstata, vejiga y cerebro.

15 Las neoplasias hematológicas malignas incluyen neoplasias malignas tales como mieloma múltiple, leucemia y linfoma.

Se proporcionan procedimientos para tratar a un paciente que tiene una neoplasia hematológica maligna con una composición que contiene un anticuerpo de unión a $\alpha 4$, tal como el anticuerpo anti-VLA-4 descrito en esta solicitud.

20 Las neoplasias hematológicas malignas son neoplasias malignas de los sistemas hematopoyético e inmunitario del cuerpo. Las neoplasias malignas de este tipo afectan a la sangre, la médula ósea y/o los ganglios linfáticos. Las neoplasias hematológicas malignas incluyen leucemias, tales como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia promielocítica aguda, eritroleucemia aguda y leucemia de células pilosas (LCP); linfomas, tales como enfermedad de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano; y mieloma múltiple; macroglobulinemia de Waldenstrom; síndrome mielodisplásico (SMD) (que puede culminar en LMA); una enfermedad mieloproliferativa, tal como policitemia vera (también denominada PV, PCV o policitemia rubra vera (PRV)), trombocitosis esencial (TE), mielofibrosis, enfermedad de las cadenas pesadas; y amiloidosis debida a enfermedad de las cadenas ligeras.

25 30 Los pacientes que tienen una neoplasia hematológica maligna se pueden identificar mediante análisis del recuento sanguíneo y hemograma, por ejemplo, microscopía óptica, que es útil para identificar células malignas. Una biopsia, tal como de médula ósea, también se puede usar para identificar células malignas, y una biopsia de un ganglio linfático puede ser útil para identificar una linfadenopatía.

35 Un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ (p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 humanizado, tal como HuHP1/2, H1L0, H1L1, H1L2 o H1L3) es útil para el tratamiento de una leucemia, tal como LMA. Las leucemias son neoplasias malignas que se originan en la médula ósea, en las que las células malignas son glóbulos blancos (leucocitos). La LMA (también denominada leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia granulocítica aguda y leucemia no linfocítica aguda) es una neoplasia maligna que surge indistintamente en los granulocitos o los monocitos. La LMA se caracteriza por el crecimiento exagerado y no controlado y la acumulación de células denominadas blastos leucémicos, que no funcionan como los glóbulos sanguíneos normales, y por el bloqueo de la producción de células medulares normales, lo que conduce a una insuficiencia de glóbulos rojos (anemia), plaquetas (trombocitopenia) y glóbulos blancos normales (especialmente neutrófilos, es decir, neutropenia) en la sangre.

45 Todos los subtipos de LMA son adecuados para el tratamiento con un anticuerpo de unión a VLA-4. Los subtipos de LMA se clasifican en función de la etapa de desarrollo alcanzada por los mieloblastos en el momento del diagnóstico. Las categorías y subtipos permiten al médico decidir qué tratamiento funciona mejor para el tipo de células y con qué rapidez se puede desarrollar la enfermedad. Los subtipos son: M0, mieloblástica, en análisis especial; M1, mieloblástica, sin maduración; M2, mieloblástica, con maduración; M3, promielocítica; M4, mielomonocítica; M5, monocítica; M6, eritroleucemia y M7, megacariocítica. Un anticuerpo contra VLA-4 se puede administrar con un agente secundario que es particularmente adecuado para el subtipo de LMA. Por ejemplo, la leucemia promielocítica aguda (LPA) y la leucemia monocítica aguda son subtipos de LMA que necesitan un tratamiento distinto al resto de subtipos de LMA. Un segundo agente para el tratamiento de la LPA puede incluir ácido transretinoico (ATRA) o un antimetabolito, tal como citarabina. Un segundo agente para el tratamiento de la leucemia monocítica aguda puede 55 incluir un análogo de la desoxiadenosina, tal como 2-cloro-2'-desoxiadenosina (2-CDA).

Los factores de riesgo de la LMA incluyen la presencia de ciertos trastornos genéticos, tales como síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Shwachman-Diamond y otros. A un paciente que tiene LMA y un trastorno genético se le puede administrar un anticuerpo de unión a VLA-4 y un segundo agente para tratar un síntoma del trastorno 60 genético. Por ejemplo, a un paciente con LMA y anemia de Fanconi se le puede administrar un anticuerpo de unión a

VLA-4 y un antibiótico.

Otros factores de riesgo para la LMA incluyen la quimioterapia o radioterapia para el tratamiento de una neoplasia maligna diferente, el humo del tabaco, y la exposición a cantidades grandes de benceno.

5

Otras neoplasias malignas adecuadas para su tratamiento con un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ incluyen tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de testículos, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

10

15

Otros trastornos

- 20 Las formulaciones y los procedimientos descritos en esta solicitud también se pueden usar para tratar otros trastornos inflamatorios, inmunitarios o autoinmunitarios, p. ej., inflamación del sistema nervioso central (p. ej., además de esclerosis múltiple, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcoidosis, vasculitis del SNC, encefalitis y mielitis transversa); rechazo de injertos de tejidos u órganos o enfermedad de injerto contra hospedador; lesión aguda del SNC, p. ej., accidente cerebrovascular o lesión medular (LM); enfermedad renal crónica; alergia, p. ej., asma alérgico,
- 25 rinitis alérgica de moderada a grave, alergia ocular; diabetes sacarina de tipo 1; enteropatías inflamatorias, p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (p. ej., para tratamiento o mantenimiento de la remisión); gastroenteritis eosinofílica; miastenia grave; fibromialgia; trastornos reumatológicos/inmunitarios, tales como trastornos artríticos, p. ej., artritis reumatoide, artritis psoriásica; trastornos dermatológicos, tales como trastornos cutáneos inflamatorios/inmunitarios, p. ej., psoriasis, vitíligo, dermatitis (p. ej., dermatitis atópica), liquen plano, urticaria crónica
- 30 de moderada a grave; lupus eritematoso sistémico (LES; p. ej., nefritis lúpica); escleroderma (p. ej., esclerosis sistémica progresiva (ESP), tal como ESP del pulmón); neumonía eosinofílica primaria aguda o crónica; síndrome de Sjogren; síndrome coronario agudo (SCA); infarto de miocardio agudo; aterosclerosis; y trastornos fibróticos, p. ej., fibrosis pulmonar (p. ej., fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis de pulmón (p. ej., inducida por radioterapia), mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis semilunar, nefropatía
- 35 diabética y fibrosis intersticial renal.

Las formulaciones y los procedimientos descritos en esta solicitud también se pueden usar para tratar trastornos neurológicos, tales como isquemia cerebral, lo que incluye la prevención en pacientes con crisis isquémicas transitorias y/o estenosis arterial. Otros trastornos neurológicos ejemplares incluyen polineuropatía desmielinizante inflamatoria

40 crónica (PDIC); síndrome de Guillian-Barre (SGB); enfermedades oculares, tales como degeneración macular (p. ej., degeneración macular húmeda), y neuropatía óptica isquémica anterior; dolor neuropático (p. ej., dolor neuropático sintomático); enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (p. ej., modificadores de la enfermedad ELA) y enfermedad de Parkinson.

- 45 Las formulaciones y los procedimientos descritos en esta solicitud también se pueden usar para tratar a pacientes se han sometido a un trasplante, tal como trasplante de riñón, corazón o médula ósea.

Esclerosis múltiple

- 50 Las formulaciones que contienen un anticuerpo de unión a alfa-4 descrito en esta solicitud son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple es una enfermedad del sistema nervioso central que se caracteriza por inflamación y pérdida de las vainas de mielina.

- Los pacientes que tienen EM se pueden identificar mediante criterios que determinan un diagnóstico de EM
- 55 clínicamente definida como se define en el seminario sobre el diagnóstico de EM (Poser y col., Ann. Neurol. 13:227, 1983). Por ejemplo, un individuo con EM clínicamente definida ha tenido dos crisis e indicios clínicos de indistintamente dos lesiones o indicios clínicos de una lesión e indicios paraclínicos de otra lesión independiente. La EM definida también se pueden diagnosticar mediante indicios de dos crisis y bandas oligoclonales de IgG en el líquido cefalorraquídeo o mediante la combinación de una crisis, indicios clínicos de dos lesiones y banda oligoclonal de IgG
- 60 en el líquido cefalorraquídeo. Los criterios de McDonald también se pueden usar para diagnosticar la EM. (McDonald

- y col., 2001 "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis", *Ann. Neurol.* 50:121-127). Los criterios de McDonald incluyen el uso de pruebas de RM de deterioro del SNC a lo largo del tiempo para usarlas en el diagnóstico de la EM, en ausencia de crisis clínicas múltiples. El tratamiento eficaz de la esclerosis múltiple se puede evaluar de varias maneras diferentes. Los parámetros siguientes se pueden usar para medir la eficacia del tratamiento. Dos criterios ejemplares incluyen: EDSS (escala de ampliada del estado de discapacidad) y la aparición de exacerbaciones en la RM (resonancia magnética). La EDSS es un procedimiento para clasificar el deterioro clínico debido a EM (Kurtzke, *Neurología* 33:1444, 1983). Se evalúan ocho sistemas funcionales para determinar el tipo y la gravedad del deterioro neurológico. Brevemente, antes del tratamiento, los pacientes se evalúan para determinar el deterioro en los sistemas siguientes: piramidal, cerebelo, tronco encefálico, sensorial, intestino y vejiga, visual, cerebral y otros. Los seguimientos se realizan a intervalos definidos. La escala varía de 0 (normal) a 10 (fallecimiento debido a EM). Una reducción de una etapa completa indica un tratamiento eficaz (Kurtzke, *Ann. Neurol.* 36:573-79, 1994). Los pacientes también se pueden diagnosticar usando otros criterios usados por los expertos en la materia.
- 5
- 10
- 15 Las exacerbaciones se definen como la aparición de un nuevo síntoma que es atribuible a EM y va acompañado por una nueva anomalía neurológica apropiada (IFNB MS Study Group, arriba). Además, la exacerbación debe durar al menos 24 horas y ser precedida de estabilidad o mejora durante al menos 30 días. En resumen, los médicos realizan un estudio neurológico normal a los pacientes. Las exacerbaciones son leves, moderadas o graves en función de los cambios en una escala de clasificación neurológica (Sipe y col., *Neurology* 34:1368, 1984). Se determina una tasa de
- 20 exacerbación anual y la proporción de pacientes exentos de exacerbación.

La terapia se puede considerar eficaz si hay una diferencia estadísticamente significativa en la tasa o proporción de pacientes exentos de exacerbación o exentos de recaída entre el grupo tratado y el grupo de placebo para cualquiera de estas mediciones. Además, también se puede medir el tiempo transcurrido hasta la primera exacerbación y la duración y gravedad de la exacerbación. Una medida de la eficacia como terapia en este sentido es una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo transcurrido hasta la primera exacerbación o la duración y gravedad en el grupo tratado en comparación con el grupo de control. Un período exento de exacerbación o exento de recaída superior a un año, 18 meses o 20 meses es particularmente digno de mención. La eficacia también se puede evaluar usando cualquier procedimiento usado en la técnica, por ejemplo, para evaluar los síntomas de EM, lo que incluye la mejora de la movilidad usando una prueba de la marcha cronometrada por sí sola o en combinación con otros criterios.

25

30

La eficacia de la administración de un primer agente y, opcionalmente, un segundo agente, también se puede evaluar en base a uno o más de los criterios siguientes: frecuencia de linfocitos T reactivos a MBP determinada mediante dilución limitante, respuesta de proliferación de estirpes y clones de linfocitos T reactivos a MBP, perfiles de citocinas de estirpes y clones de linfocitos T reactivos a MBP determinados en los pacientes. La eficacia se indica mediante una reducción en la frecuencia de células reactivas, una reducción en la incorporación de timidina con alteración peptídica en comparación con el estado natural y una reducción de TNF e IFN- α .

35

Las mediciones clínicas incluyen la tasa de recaída en intervalos de uno y dos años, y un cambio en la EDSS, lo que incluye el tiempo transcurrido hasta la progresión desde el momento basal de 1,0 unidad en la EDSS que persiste durante seis meses. En una curva de Kaplan-Meier, un retardo constante en la progresión de la discapacidad demuestra eficacia. Otros criterios incluyen un cambio en el área y volumen de las imágenes de RM en T₂, y el número y volumen de lesiones determinados mediante imágenes mejoradas con gadolinio.

40

La RM se puede usar para medir lesiones activas usando adquisición de imágenes mejoradas con gadolinio-DTPA (McDonald y col. *Ann. Neurol.* 36:14, 1994) o la ubicación y magnitud de las lesiones usando técnicas ponderadas en T₂. Brevemente, se obtienen las imágenes de RM del momento basal. Se usan el mismo plano de imagen y posición del paciente para cada estudio posterior. Las secuencias de posicionamiento y adquisición de imágenes se pueden elegir para maximizar la detección de lesiones y facilitar la trazabilidad de las lesiones. Las mismas secuencias de posicionamiento y adquisición de imágenes se pueden usar en estudios posteriores. La presencia, ubicación y magnitud de las lesiones de EM pueden ser determinadas por radiólogos. Las áreas de lesiones se pueden delimitar y sumar corte a corte para determinar el área total de lesión. Se pueden hacer tres análisis: indicios de lesiones nuevas, tasa de aparición de lesiones activas, porcentaje de cambio en el área de lesión (Paty y col., *Neurology* 43:665, 1993). La mejora debida a la terapia se puede ser determinar mediante una mejora estadísticamente significativa en un paciente individual en comparación con el momento basal o en un grupo tratado frente a un grupo de placebo.

45

50

55

Los síntomas ejemplares asociados a la esclerosis múltiple, que se pueden tratar con los procedimientos descritos en esta solicitud, incluyen: neuritis óptica, diplopía, nistagmo, dismetría ocular, oftalmoplejía internuclear, fosfenos de movimiento y sonido, defecto pupilar aferente, paresia, monoparesia, paraparesia, hemiparesia, cuadriparesia, plejía, paraplejía, hemiplejía, tetraplejía, cuadriplejía, espasticidad, disartria, atrofia muscular, espasmos, calambres,

60

hipotonía, clono, mioclonos, miocimia, síndrome de las piernas inquietas, pie pendular, reflejos disfuncionales, parestesia, anestesia, neuralgia, dolor neuropático y neurogénico, fenómeno de L'Hermitte, disfunción propioceptiva, neuralgia del trigémino, ataxia, temblor intencional, dismetría, ataxia vestibular, vértigo, ataxia del habla, distonía, disdiadococinesia, micción frecuente, espasticidad de la vejiga, vejiga flácida, disinergia detrusoresfinteriana, 5 disfunción eréctil, anorgasmia, frigidez, estreñimiento, urgencia fecal, incontinencia fecal, depresión, disfunción cognitiva, demencia, cambios de humor, labilidad emocional, euforia, síndrome bipolar, ansiedad, afasia, disfasia, cansancio, fenómeno de Uhthoff, reflujo gastroesofágico y trastornos del sueño.

Cada caso de EM presenta uno de varios patrones de presentación y curso posterior. Más habitualmente, la EM se manifiesta primero como una serie de crisis seguidas de remisiones totales o parciales como síntomas misteriosamente atenuados, para reaparecer más adelante después de un periodo de estabilidad. Esta se denomina EM remitente-recurrente (RR). La EM primaria progresiva (PP) se caracteriza por un deterioro clínico gradual sin remisiones evidentes, aunque puede haber mesetas temporales o alivio de leve de los síntomas. La EM secundaria progresiva (SP) comienza con curso remitente-recurrente seguido de un curso primario progresivo posterior. En raras 15 ocasiones, los pacientes pueden tener un curso progresivo-recurrente (PR) en el que la enfermedad toma a trayectoria progresiva marcada por crisis agudas. La PP, SP y PR en ocasiones se agrupan y se denominan EM progresiva crónica.

Algunos pacientes presentan EM maligna, definida como un deterioro rápido e incesante que da como resultado una 20 discapacidad importante o incluso el fallecimiento poco después del comienzo de la enfermedad. Este deterioro se puede detener o desacelerar mediante la administración de una terapia de combinación descrita en esta solicitud.

La administración de un anticuerpo anti- $\alpha 4$ presentado en esta solicitud puede ser eficaz para aliviar uno o más síntomas de la EM, tal como uno o más de los síntomas descritos anteriormente. Por ejemplo, la administración de un 25 anticuerpo anti- $\alpha 4$ anticuerpo descrito en esta solicitud se puede usar para tratar la esclerosis múltiple progresiva primaria o secundaria (EMPP o EMSP, respectivamente), y el tratamiento con un anticuerpo anti- $\alpha 4$ puede ser eficaz para prevenir la recaída.

Además de, o antes de, los estudios en humanos, se puede usar un modelo animal para evaluar la eficacia del uso de 30 los dos agentes. Un modelo animal ejemplar para la esclerosis múltiple es el modelo de ratón de encefalitis autoinmune (EAE) experimental, p. ej., como se describe en (Tuohy y col. (J. Immunol (1988) 141: 1126-1130), Sobel y col. (J. Immunol (1984) 132: 2393-2401) y Traugott (Cell Immunol (1989) 119: 114-129). Se puede administrar a los ratones un primer y segundo agente descritos en esta solicitud antes de la inducción de la EAE. A continuación, se evalúan criterios característicos en los ratones para determinar la eficacia del uso de los dos agentes en el modelo.

35

Generación de anticuerpos

Los anticuerpos recombinantes que se unen a alfa-4 se pueden generar mediante procedimientos *in vivo* o *in vitro* tales como la presentación en fagos. Los procedimientos se pueden usar para proporcionar CDR de anti- $\alpha 4$ para uso 40 en los anticuerpos injertados con CDR descritos en esta solicitud. Además, los procedimientos tales como la presentación en fagos se pueden usar para seleccionar tales CDR en el contexto de las estructuras de la estirpe germinal descritas en esta solicitud, tal como usando una biblioteca en la que la estructura es una estructura de la estirpe germinal.

El documento EP 239 400 (Winter y col.) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (dentro de una 45 región variable determinada) de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para una especie con las de otra. Los anticuerpos con CDR sustituidas puede ser menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria en los seres humanos en comparación con los anticuerpos quiméricos auténticos, ya que los anticuerpos con CDR sustituidas contienen considerablemente menos componentes no humanos (Riechmann y col., 1988, Nature 332, 323- 50 327 ; Verhoeven y col., 1988, Science 239, 1534-1536). Habitualmente, las CDR de un anticuerpo murino sustituidas en las regiones correspondientes de un anticuerpo humano usando tecnología de ácidos nucleicos recombinantes para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Se pueden añadir segmentos génicos de la región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de la cadena pesada y ligera se pueden coexpresar en células de mamífero para producir anticuerpo soluble. Las grandes 55 bibliotecas de presentación en fagos en animales no inmunizados también se pueden usar para aislar anticuerpos de alta afinidad que se pueden desarrollar como agentes terapéuticos para humanos usando tecnología de fagos convencional (véase, p. ej., Hoogenboom y col. (1998) Immunotechnology 4:1-20 y Hoogenboom y col. (2000) Immunol Today 2:371-8; documento US 2003-0232333).

60 Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti- $\alpha 4$ descrito en esta solicitud puede reconocer epítopos de la subunidad

$\alpha 4$ que están implicados en la unión a un ligando análogo, p. ej., VCAM-1 o fibronectina. Los anticuerpos descritos en esta solicitud pueden inhibir la unión a uno o más de los ligandos análogos (p. ej., VCAM-1 y fibronectina).

En algunas realizaciones, los anticuerpos presentados en esta solicitud, pueden interactuar con VLA-4 en las células, p. ej., los linfocitos, pero no causan agregación celular.

Un anticuerpo de unión a $\alpha 4$ ejemplar tiene una o más CDR, p. ej., las tres CDR de la cadena pesada (HC) y/o las tres CDR de la cadena ligera (LC) de un anticuerpo particular descrito en esta solicitud, o CDR que son, en conjunto, al menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idénticas a tal anticuerpo. En una realización, los bucles hipervariables de H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en esta solicitud. En una realización, los bucles hipervariables de L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en esta solicitud.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la HC y/o LC es al menos 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC y/o LC de un anticuerpo descrito en esta solicitud. La secuencia de aminoácidos de la secuencia del dominio variable de la HC y/o LC puede diferir en al menos un aminoácido, pero no más de diez, ocho, seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos de la secuencia correspondiente de un anticuerpo descrito en esta solicitud. Por ejemplo, las diferencias pueden estar principal o totalmente en las regiones de estructura.

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias del dominio variable de la HC y LC pueden estar codificadas por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones de alta exigencia a una secuencia de ácidos nucleicos descrita en esta solicitud o una que codifica un dominio variable o una secuencia de aminoácidos descrita en esta solicitud. En una realización, las secuencias de aminoácidos de una o más regiones de estructura (p. ej., FR1, FR2, FR3 y/o FR4) del dominio variable de la HC y/o LC son al menos 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a las regiones de estructura correspondientes de los dominios variables de la HC y LC de un anticuerpo descrito en esta solicitud. En una realización, una o más regiones de estructura de la cadena pesada o ligera (p. ej., FR1, FR2 y FR3 de la HC) son al menos 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 100 % idénticas a la secuencia de las regiones de estructura correspondientes de un anticuerpo de la estirpe germinal humana.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en esta solicitud) se realizan como se indica a continuación. Las secuencias se alinean a fin de realizar una comparación óptima (p. ej., se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para realizar un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden ignorar con fines comparativos). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP del paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de los huecos de 12, una penalización de la ampliación de huecos de 4 y una penalización del desplazamiento del marco de lectura de 5. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se emplea en esta solicitud, "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

Como se emplea en esta solicitud, la expresión "se hibrida en condiciones de alta exigencia" describe las condiciones para la hibridación y el lavado. Las directrices para realizar las reacciones de hibridación se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En ese documento de consulta se describen procedimientos acuosos y no acuosos y se pueden usar indistintamente. Las condiciones de hibridación de alta exigencia incluyen la hibridación en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C, o condiciones sustancialmente similares.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos se pueden producir en células procariotas y eucariotas. En una realización, los anticuerpos (p. ej., ScFv) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, p. ej., Powers y col. (2001) J. Immunol. Methods 251:123-35), *Hanseula*, o *Saccharomyces*.

En una realización, los anticuerpos, particularmente los anticuerpos de longitud completa, p. ej., IgG, se producen en células de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero ejemplares para la expresión incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl.

Acad. Sci. EE. UU. 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, p. ej., como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), estirpes de células linfocíticas, p. ej., células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562 y una célula de un animal transgénico, p. ej., un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

5

Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias de ácidos nucleicos adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (p. ej., orígenes de replicación) y genes de marcadores seleccionables. El gen de marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Los genes de marcadores seleccionables ejemplares incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células hospedadoras *dhfr* con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

En un sistema ejemplar para la expresión recombinante de un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo de longitud completa o una porción de unión al antígeno del mismo), un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO *dhfr*- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están enlazados operacionalmente a elementos reguladores potenciadores/promotores (p. ej., obtenidos de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para provocar niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite la selección de las células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar mediante cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G. Por ejemplo, los anticuerpos de unión a $\alpha 4$ purificados se pueden concentrar de aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL usando técnicas de concentración proteica que son conocidas en la técnica.

30

Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, p. ej., modificaciones que alteran la función del Fc, p. ej., para reducir o eliminar la interacción con un receptor del Fc o con C1q, o ambos. Por ejemplo, la región constante de la IgG4 humana puede tener una mutación de Ser a Pro en el residuo 228 para fijar la región bisagra. La secuencia de aminoácidos de un Fc de IgG4 (dominios bisagra + CH2 + CH3) se proporciona en la FIG. 5.

35

En otro ejemplo, la región constante de la IgG1 humana puede estar mutada en uno o más residuos, p. ej., uno o más de los residuos 234 y 237, p. ej., según la numeración de la patente de EE. UU. n.º 5.648.260. Otras modificaciones ejemplares incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 5.648.260.

Para algunos anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos se puede diseñar para sintetizar anticuerpos en los que la región Fc está glicosilada. En otro ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glicosilado en la asparagina 297 del dominio CH2 (véase la FIG. 5). Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Esta glicosilación participa en funciones efectoras mediadas por los receptores del Fc γ y el complemento C1q (Burton y Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis y col. (1998) Immunol. Rev. 163:59-76). El dominio Fc se puede producir en un sistema de expresión de mamífero que glicosila apropiadamente el residuo correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.

Otras modificaciones del dominio Fc adecuadas incluyen las descritas en el documento WO2004/029207. Por ejemplo, el dominio Fc puede ser un Fc XmAb[®] (Xencor, Monrovia, CA). El dominio Fc, o un fragmento del mismo, puede tener una sustitución en una región de unión al receptor del Fc γ (Fc γ R), tal como los dominios y fragmentos descritos en el documento WO05/063815. En algunas realizaciones, el dominio Fc, o un fragmento del mismo, tiene una sustitución en una región de unión al receptor del Fc neonatal (FcRn), tal como los dominios y fragmentos descritos en el documento WO05047327. En otras realizaciones, el dominio Fc es una única cadena, o un fragmento de la misma, o una versión modificada de la misma, tal como las descritas en el documento WO2008143954. Otras modificaciones del Fc adecuadas se conocen y describen en la técnica.

Los anticuerpos también pueden ser producidos por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.849.992 describe un procedimiento para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgen que incluye un promotor específico de la leche y secuencias de ácidos nucleicos que

60

codifican el anticuerpo de interés, p. ej., un anticuerpo descrito en esta solicitud, y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretado en la misma, el anticuerpo de interés, p. ej., un anticuerpo descrito en esta solicitud. El anticuerpo se puede purificar a partir de la leche, o para algunos usos, se puede utilizar directamente.

5

Los anticuerpos se pueden modificar, p. ej., con un resto que mejora su estabilización y/o retención en la circulación, p. ej., en sangre, suero, linfa, lavado broncoalveolar u otros tejidos, p. ej., en al menos 1.5, 2, 5, 10 o 50 veces.

Por ejemplo, un anticuerpo de unión a VLA-4 se puede asociar a un polímero, p. ej., un polímero sustancialmente no antigénico, tal como un óxido de polialquileno o un óxido de polietileno. Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en lo que respecta a su peso. Se pueden usar polímeros que tienen pesos moleculares medios numéricos que varían de aproximadamente 200 a aproximadamente 35 000 Daltons (o aproximadamente 1000 a aproximadamente 15 000 y 2000 a aproximadamente 12 500).

15 Por ejemplo, un anticuerpo de unión a VLA-4 se puede conjugar a un polímero soluble en agua, p. ej., un polímero de polivinilo hidrófilo, p. ej., alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de tales polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloques de los mismos, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloques. Los polímeros útiles adicionales incluyen polioxialquilenos, tales como polioxietileno, polioxipropileno, y copolímeros de bloques de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronics);
20 polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros de sacáridos D-manosa, D- y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico (p. ej., ácido polimanurónico, o ácido alginico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico, lo que incluye homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como
25 lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietilalmidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glicógeno o la subunidad de polisacárido de mucopolisacáridos ácidos, p. ej., ácido hialurónico; polímeros de alcoholes del azúcar, tales como polisorbitol y polimanitol; heparina o heparón.

Segundos agentes ejemplares

30

En algunos casos, las formulaciones descritas en esta solicitud, p. ej., las formulaciones que contienen un anticuerpo de unión a alfa-4, incluyen un segundo agente, o se administran en combinación con una formulación que contiene un segundo agente.

35 En una implementación, el anticuerpo de unión a $\alpha 4$ y el segundo agente se proporcionan como una coformulación y la coformulación se administra al sujeto. Además, es posible administrar, p. ej., al menos 24 horas antes o después de administrar la coformulación, independientemente una dosis de la formulación de anticuerpo de unión a $\alpha 4$ y a continuación una dosis de una formulación que contiene el segundo agente. En otra implementación, el anticuerpo y el segundo agente se proporcionan como formulaciones independientes y la etapa de administración incluye
40 administrar secuencialmente el anticuerpo y el segundo agente. Las administraciones secuenciales se pueden realizar en el mismo día (p. ej., con una hora de diferencia entre sí o al menos con 3, 6 o 12 horas de diferencia) o en días diferentes.

Generalmente, el anticuerpo y el segundo agente se administran cada uno como una pluralidad de dosis separadas
45 en el tiempo. El anticuerpo y el segundo agente se administran generalmente según una pauta posológica. La pauta posológica para uno o ambos puede tener una periodicidad regular. La pauta posológica para el anticuerpo puede tener una periodicidad diferente de la pauta posológica para el segundo agente, p. ej., uno se puede administrar más frecuentemente que el otro. En una implementación, uno del anticuerpo y el segundo agente se administra una vez a la semana y el otro una vez al mes. En otra implementación, uno del anticuerpo y el segundo agente se administra de
50 forma continua, p. ej., a lo largo de un período superior a 30 minutos, pero inferior a 1, 2, 4 o 12 horas, y el otro se administra como un bolo. El anticuerpo y el segundo agente se pueden administrar mediante cualquier procedimiento apropiado, p. ej., por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

En algunas realizaciones, cada uno del anticuerpo y el segundo agente se administra en la misma dosis que se
55 prescribe para monoterapia. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra en una dosis que es igual o inferior a una cantidad necesaria para que sea eficaz si se administra solo. Asimismo, el segundo agente se puede administrar en una dosis que es igual o inferior a una cantidad necesaria para que sea eficaz si se administra solo.

Los ejemplos no limitantes de segundos agentes para tratar la esclerosis múltiple en combinación con un anticuerpo
60 de unión a $\alpha 4$ incluyen:

- interferones, p. ej., interferón beta-1a humano (p. ej., AVONEX® o Rebif®) e interferón beta-1b (BETASERON™; interferón beta humano sustituido en la posición 17; Berlex/Chiron);
- 5
- acetato de glatirámero (también denominado copolímero 1, Cop-1; COPAXONE™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);
- 10
- Rituxan® (rituximab) u otro anticuerpo anti-CD20, p. ej., uno que compite con, o se une a, un epítipo solapante con rituximab;
- 15
- mitoxantrona (Novantrone®, Lederle);
 - un quimioterápico, p. ej., cladribina (LEUSTATIN®), azatioprina (IMURAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®), ciclosporina-A, metotrexato, 4-aminopiridina y tizanidina;
 - un corticosteroide, p. ej., metilprednisolona (MEDRONE®, Pfizer), prednisona;
 - una inmunoglobulina, p. ej., Rituxan® (rituximab); Ig CTLA4; alemtuzumab (MabCAMPATH®) o daclizumab (un anticuerpo que se une a CD25);
- 20
- estatinas; y
 - antagonistas del TNF.
- 25 El acetato de glatirámero es una proteína formada a partir de una cadena aleatoria de aminoácidos: ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina (de ahí GLATirámero). El acetato de glatirámero se puede sintetizar en solución a partir de estos aminoácidos en una proporción de aproximadamente 5 partes de alanina a 3 partes de lisina, 1,5 partes de ácido glutámico y 1 parte de tirosina usando anhídridos de N-carboxiaminoácidos.
- 30 Los segundos agentes adicionales incluyen anticuerpos o antagonistas de otras citocinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF y PDGF. Otros segundos agentes ejemplares incluyen anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Por ejemplo, daclizumab es un anticuerpo anti-CD25 anticuerpo que puede mejorar la esclerosis múltiple.
- 35 Otros anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos que proporcionan una actividad de un agente descrito en esta solicitud, tales como un anticuerpo que se acopla a un receptor de los interferones, p. ej., un receptor del interferón beta. Habitualmente, en las implementaciones en las que el segundo agente incluye un anticuerpo, este se une a una proteína diana distinta de VLA-4 o distinta de la integrina $\alpha 4$, o al menos a un epítipo en VLA-4 distinto de uno
- 40 reconocido por el primer agente.
- Otros segundos agentes ejemplares adicionales incluyen: FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasas, agonistas de la adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con
- 45 la señalización por las citocinas inflamatorias como se describen en esta solicitud, inhibidores de enzimas convertidoras de IL-1 β (p. ej., Vx740), anti-P7s, PSGL, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de linfocitos T tales como inhibidores de cinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatoprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos, como se describen en esta solicitud, citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-13 y TGF).
- 50 En algunas realizaciones, se puede usar un segundo agente para tratar uno o más síntomas o efectos secundarios de la EM. Tales agentes incluyen, p. ej., amantadina, baclofeno, papaverina, meclizina, hidroxizina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, docusato, pemolina, dantroleno, desmopresina, dexametasona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, bisacodilo, venlafaxina, amitriptilina, metenammina, clonazepam, isoniazida, vardenafilo, nitrofurantoina, muciloide
- 55 hidrófilo de Psyllium, alprostadilo, gabapentina, nortriptilina, paroxetina, bromuro de propantelina, modafinilo, fluoxetina, fenazopiridina, metilprednisolona, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropión y sertralina. Muchos segundos agentes que son moléculas pequeñas tienen un peso molecular entre 150 y 5000 Daltons.
- 60 Los ejemplos de antagonistas del TNF incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro*

(o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) contra el TNF (p. ej., anticuerpo contra el TNF α humano), tales como D2E7, (anticuerpo contra el TNF α humano, patente de EE. UU. n.º 6.258.562 ; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Pharmacia), cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; REMICADE™, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti-TNF (p. ej., CPD870); fragmentos solubles de receptores del TNF, p. ej., receptores del TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, p. ej., 75kdTNFR-IgG (proteína de fusión receptor del TNF-IgG de 75 kDa, ENBREL™; Immunex; véase, p. ej., Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A), p55kdTNFR-IgG (proteína de fusión receptor del TNF-IgG de 55 kDa (LENERCEPT™)); antagonistas de enzimas, p. ej., inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE) (p. ej., un derivado de ácido alfa-sulfonilhidroxámico, documento WO 01/55112 e inhibidor de TACE de N-hidroxiformamida GW 3333, -005 o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína soluble de unión al TNF, véase p. ej., Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, n.º 9 (suplemento), S284; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, páginas 37-42).

Además de un segundo agente, también es posible administrar otros agentes al sujeto. Sin embargo, en algunas realizaciones, no se administra ninguna proteína ni ningún agente biológico, distintos del anticuerpo de unión a $\alpha 4$ y el segundo agente, al sujeto como una composición farmacéutica. El anticuerpo de unión a $\alpha 4$ y el segundo agente pueden ser los únicos agentes que se suministran mediante inyección. En realizaciones en las que el segundo agente es una proteína recombinante, el anticuerpo de unión a $\alpha 4$ y el segundo agente puede ser los únicos agentes recombinantes administrados al sujeto, o al menos los únicos agentes recombinantes que modulan las respuestas inmunitaria o inflamatoria. En otras realizaciones más, el anticuerpo de unión a $\alpha 4$ es el único agente recombinante o el único agente biológico administrado al sujeto.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta solicitud tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta solicitud en la práctica o el ensayo de la invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo meramente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLO

30

Ejemplo 1. Las variantes de anticuerpos anti-VLA-4 son más potentes que el HP1/2 humanizado.

Los anticuerpos anti-VLA-4 se construyeron usando la estructura de IGKV4-1 de la estirpe germinal (o el diseño L1 y L2) o el AAH7033.1 modificado genéticamente en la estirpe germinal (para el diseño L3) para la cadena VL y la estructura de IGHV1-f de la estirpe germinal para la VH. Estos anticuerpos tenían menos retromutaciones que el anticuerpo HP1/2 humanizado descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.602.503.

Variaciones de la cadena pesada

Las secuencias de tres variaciones de la cadena pesada se muestran en la FIG. 1 como Diseño H0, Diseño H1 y Diseño H2. Cada diseño tiene las CDR de HP1/2 murino injertadas en la estructura IGHV1-f. El Diseño H0 no incluye retromutaciones de las regiones de estructura, mientras que los diseños H1 y H2 tienen diversos grados de retromutación en las secuencias de las regiones de estructura para optimizar la afinidad del anticuerpo humanizado.

Variaciones de la cadena ligera

Las secuencias de cuatro variaciones de la cadena ligera se muestran en la FIG. 2 como Diseño L0, Diseño L1, Diseño L2 y Diseño L3 (también denominadas L0, L1, L2, L3). Cada diseño tiene las CDR de HP1/2 murino injertadas en la estructura de la estirpe germinal. La estructura de IGKV4-1 de la estirpe germinal se usó para los Diseños L0, L1, y L2, y la estructura de AAH70335 modificada genéticamente en la estirpe germinal se usó para el Diseño L3. El Diseño L0 no incluye retromutaciones de las regiones de estructura, mientras que los diseños L1, L2 y L3 tienen diversos grados de retromutación en las regiones de estructura para optimizar la afinidad del anticuerpo humanizado.

Los resultados de los ensayos de ELISA competitivos se muestran en la Tabla 1 y la FIG. 3. En este experimento, se preincubó $\alpha 4\beta 1$ con mAb de ensayo y a continuación se usó HP1/2 murino como reactivo competidor. Los resultados de este experimento indicaron que los anticuerpos que tenían las cadenas ligeras L2 o L3 eran más potentes que el anticuerpo humanizado IluIP1/2 descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.602.503. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la FIG. 3. La cadena pesada (H1) de los anticuerpos para este ensayo tenía la secuencia del "Diseño H1" mostrada en la FIG. 1, mientras que L1 se refiere al Diseño L1 de la FIG. 2.

60

Tabla 1. Ensayo competitivo mediante ELISA

mAb	CI50 (nM)
HP1/2 quimérico	1,06
H1L0	1,87
H1L1	1,67
H1L2	0,9
H1L3	0,49
HuHP1/2	1,05

En la Tabla 1, el mAb quimérico es anticuerpo HP1/2 quimerizado, en el que las cadenas variables murinas pesada y ligera están fusionadas genéticamente a regiones constantes de IgG1 humana. Este anticuerpo es esencialmente idéntico en cuanto a su afinidad de unión al anticuerpo IIP1/2 murino original (Sánchez-Madrid y col., Eur. J. Immunol. 16:1343-1349, 1996). Los resultados del experimento indican que es posible mejorar la afinidad del anticuerpo monoclonal con respecto a su secuencia precursora murina mediante humanización en la estructura de aceptor modificada genéticamente en la estirpe germinal.

10

Otro ensayo competitivo compara la afinidad de unión de los nuevos anticuerpos con el anticuerpo anti- $\alpha 4$ 21.6 humanizado (Tysabri® (natalizumab)) descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.840.299. En este experimento, se ensayó la unión a $\alpha 4\beta 1$ de la mezcla de HP1/2 de ratón con mAb de ensayo. Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 4 y en la Tabla 2 siguiente, e indican que los anticuerpos recién diseñados son aproximadamente 10 veces más potentes que natalizumab.

15

Tabla 2. Ensayo competitivo mediante ELISA

mAb	CI50 (nM)
HP1/2 quimérico	1,64
H1L0	4,46
H1L1	4,55
H1L2	1,34 10
HuHP1/2	1,41
Tysabri®	10,9

20 **Ejemplo 2. El HP1/2 (HuHP1/2) humanizado se une a VLA-4 en estirpes de células tumorales.**

La unión del anticuerpo anti-VLA-4 HuHP1/2 a un abanico de estirpes celulares se ensayó mediante citometría de flujo. La unión se ensayó en las estirpes de células de LLC (leucemia linfocítica crónica) IMec1 y JM1; en las estirpes de células de MM (mieloma múltiple) U266 y H929; y en las estirpes de células de LMA (leucemia mielógena aguda) HL60 y KG1. El HuHP1/2 se unió a todas las estirpes de células tumorales ensayadas (FIG. 6). Los datos de la citometría de flujo se usaron para calcular los valores de CE50 para la unión del anticuerpo a cada una de las diferentes estirpes celulares. Esta información muestra más adelante en la Tabla 3.

También se encontró que el HuHP1/2 bloqueaba la adhesión de las estirpes de células de LMA a la fibronectina (FN) y a la proteína de fusión VCAM1-Ig. Para ensayar si el anticuerpo podía bloquear la adhesión, se permitió que las estirpes de células de LMA HL60 o KG1 se adhirieran a pocillos revestidos con FN (FIG. 7A) o pocillos revestidos con VCAM1-Ig (FIG. 7B) en presencia de concentraciones crecientes de HP1/2 o anticuerpo de control de isotipo. El HuHP1/2 bloqueó la adhesión de ambos tipos de células a los pocillos revestidos con FN y los pocillos revestidos con VCAM1-Ig. La inhibición máxima de la unión de células HL60 a ambos ligandos se consiguió con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2

30

(FIG. 7C).

También se encontró que el HuHP1/2 bloqueaba la adhesión de las estirpes de células de MM a la FN y a la proteína de fusión VCAM1-Ig. Se permitió que las estirpes de células de MM U266 y H929 se adhirieran a pocillos revestidos con FN (FIG. 8A) o pocillos revestidos con VCAM1-Ig (FIG. 8B) en presencia de concentraciones crecientes de HP1/2 o anticuerpo de control de isotipo. El HuHP1/2 bloqueó la adhesión de ambos tipos de estirpes celulares a los pocillos revestidos con FN y los pocillos revestidos con VCAM1-Ig. La inhibición máxima de la unión de células U266 a ambos ligandos se consiguió con 20 µg/ml de HuHP1/2 (FIG. 8C).

10 También se encontró que el HuHP1/2 bloqueaba la adhesión de las estirpes de células de LLC a la FN y a la proteína de fusión VCAM1-Ig. Se permitió que las estirpes de células de LLC Mec1 y JM1 se adhirieran a pocillos revestidos con FN (FIG. 9A) o pocillos revestidos con VCAM1-Ig (FIG. 9B) en presencia de concentraciones crecientes de HP1/2 o anticuerpo de control de isotipo. El HuHP1/2 bloqueó la adhesión de ambos tipos de estirpes celulares a los pocillos revestidos con FN y los pocillos revestidos con VCAM1-Ig. La inhibición máxima de la unión de células Mec1 a ambos ligandos se consiguió con 20 µg/ml de HuHP1/2 (FIG. 9C).

Los valores de CI50 para la unión de HuHP1/2 a las estirpes de células tumorales se calcularon a partir de los datos mostrados en las FIG. 7-9. Estos datos se presentan en la Tabla 3.

20

Tabla 3. Cuantificación de HuHP1/2 en estirpes de células tumorales

		CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	
			Fibronectina	VCAM
LLC	Mec1	0,11	0,10	0,07
	JM1	0,21	---	0,12
MM	U266	0,46	0,14	0,13
	H929	0,91	0,21	1,35
LMA	HL60	0,11	0,16	0,91
	KG1	0,19	0,05	0,1

Otras realizaciones están en las reivindicaciones.

25 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> BIOGEN MA INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-VLA-4

30

<130> P39569EP-D1-PCT

<140> EP17163411.6

<141> 15/04/2011

35

<150> EP11730120.0

<151> 15/04/2011

<160> 14

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 121

45

<212> PRT

ES 2 805 873 T3

<213> Mus sp.

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Trp
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

ES 2 805 873 T3

```

1           5           10           15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20                25                30

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
      50                55                60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
      65                70                75                80

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

```

Ala Thr

<210> 3

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>source

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 3

```

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
      20                25                30

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

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

Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
      65                70                75                80

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

Ala Thr Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly

```

ES 2 805 873 T3

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>source

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 4

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221>source

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

25 <400> 5

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

ES 2 805 873 T3

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

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

Gln Val Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10
 <210> 7
 <211> 101
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

ES 2 805 873 T3

<400> 7

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro
          100

```

5

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221>source
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

15 <400> 8

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
          20           25           30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

```


ES 2 805 873 T3

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 11

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>source

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95

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

15

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

ES 2 805 873 T3

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Asp Ala Ser Gly Phe Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Val Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Lys Val Gly Phe Asn Arg
100 105

5

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221>source

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

15

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

ES 2 805 873 T3

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Val Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 14

<211> 228

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>source

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 14

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

ES 2 805 873 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly
225

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo, que comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, donde:
- 5 (a) la cadena pesada variable comprende la secuencia de la estructura de la cadena pesada variable de IGHV1-f y las CDR de la cadena VH del anticuerpo murino HP1/2, donde CDR1 comprende la secuencia GFNIKDTYM, CDR2 comprende la secuencia RIDPASGDTKYDPKFQV y CDR3 comprende la secuencia GMWVSTGYALDF, y los residuos de aminoácidos en las posiciones de la estructura 24 y 94 de la cadena pesada variable, según el esquema de numeración de Kabat, están sustituidos, donde el residuo sustituido en la posición de la estructura 24 es alanina (A) y el residuo sustituido en la posición de la estructura 94 es ácido aspártico (D);
- 10 (b) la cadena ligera variable comprende la secuencia de la estructura de la cadena ligera variable de IGKV4-1 y las CDR de la cadena VL de anticuerpo murino HP1/2, donde CDR1 comprende la secuencia KASQSVTNDVA, CDR2 comprende la secuencia YASNRYT y CDR3 comprende la secuencia QQDYSSPYT, y los residuos de aminoácidos en las posiciones de la estructura 1, 67 y 87 de la cadena ligera variable, según el esquema de numeración de Kabat, están sustituidos, donde el residuo sustituido en la posición de la estructura 1 es serina (S), el residuo sustituido en la posición de la estructura 67 es tirosina (Y) y el residuo sustituido en la posición de la estructura 87 es fenilalanina (F);
- 15
- 20 y donde la molécula de anticuerpo recombinante o el fragmento de unión a $\alpha 4$ del mismo se une a VLA-4.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para uso como un medicamento en el tratamiento de un paciente.
- 25 3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, donde el paciente tiene una neoplasia maligna.
4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 3, donde el paciente tiene un tumor sólido, una neoplasia hematológica maligna, un mieloma múltiple o leucemia mielógena aguda (LMA).
- 30 5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, donde el paciente tiene un trastorno inflamatorio, esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide, diabetes, neuritis óptica, enfermedad de Crohn, un trastorno agudo, una lesión medular o un traumatismo craneoencefálico.
- 35 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende además administrar al paciente un segundo agente terapéutico, seleccionado opcionalmente de entre un agente trombolítico, un agente quimioterápico, un agente neuroprotector, un agente antiinflamatorio, un esteroide, una citocina o un factor de crecimiento.

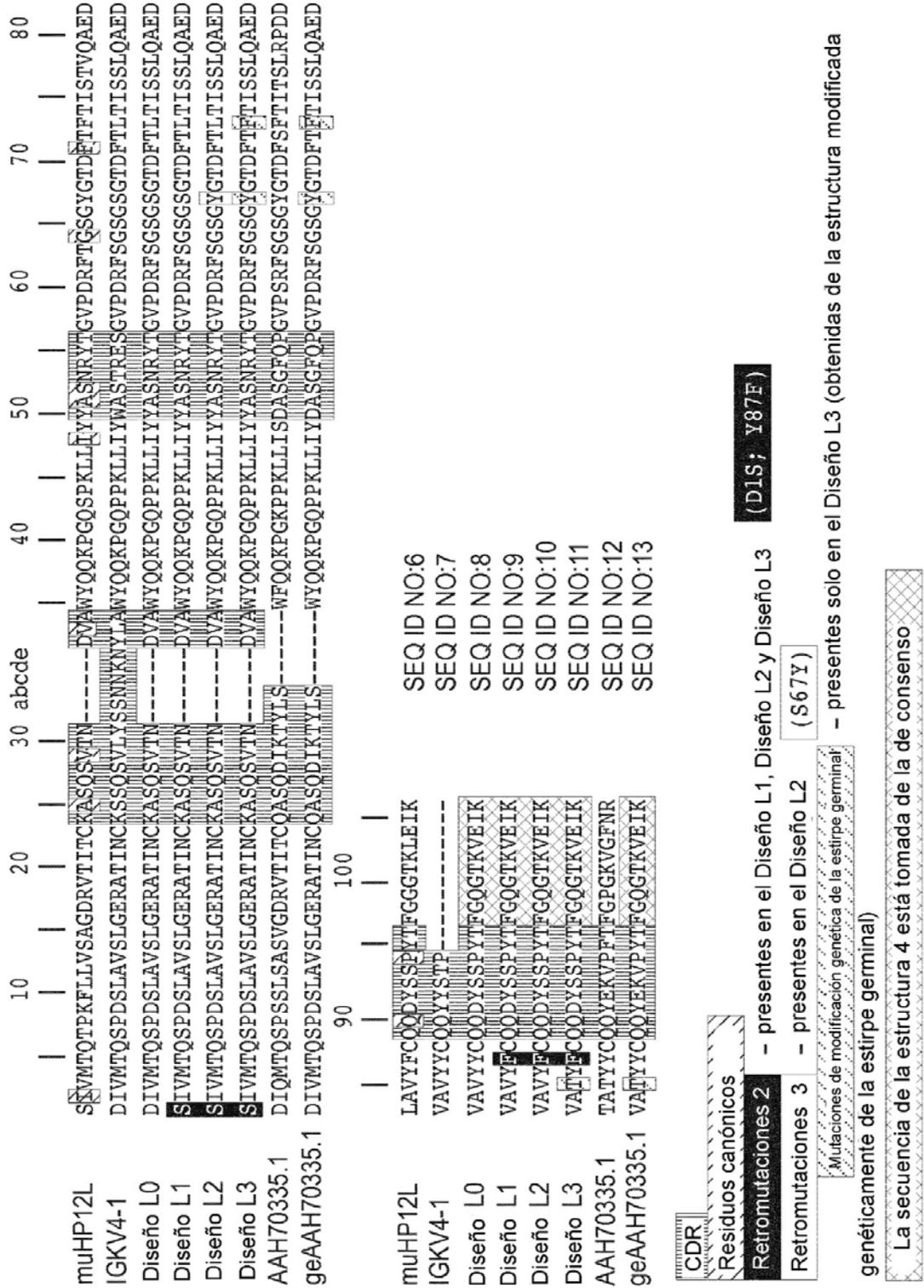


FIG. 2

FIG. 3

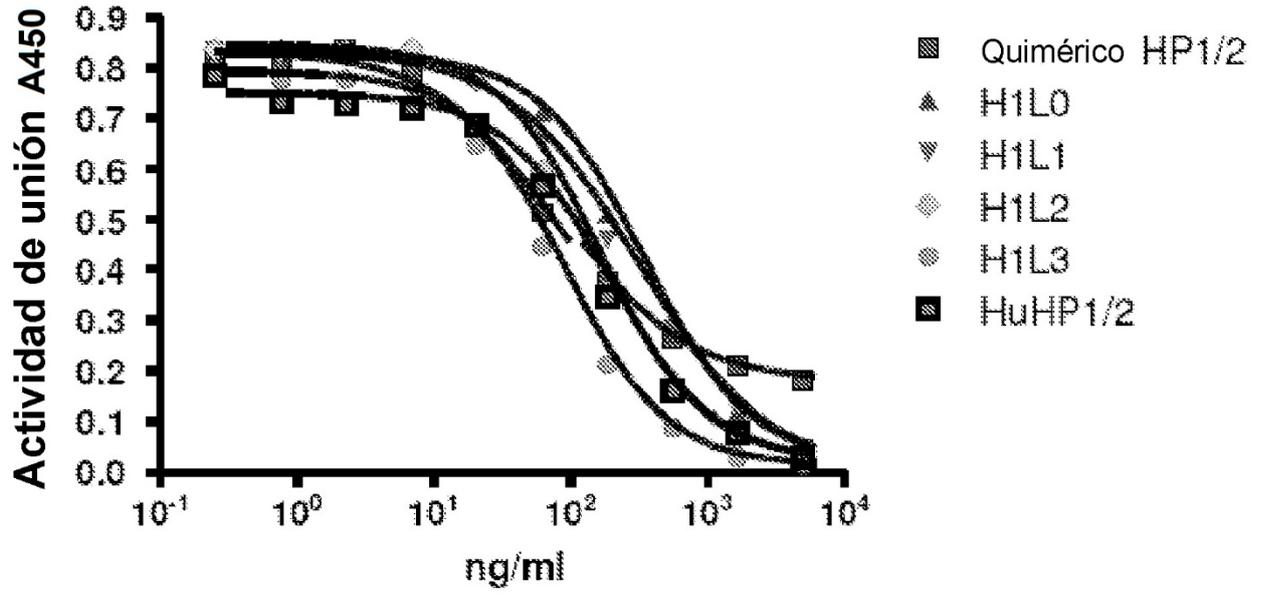


FIG. 4

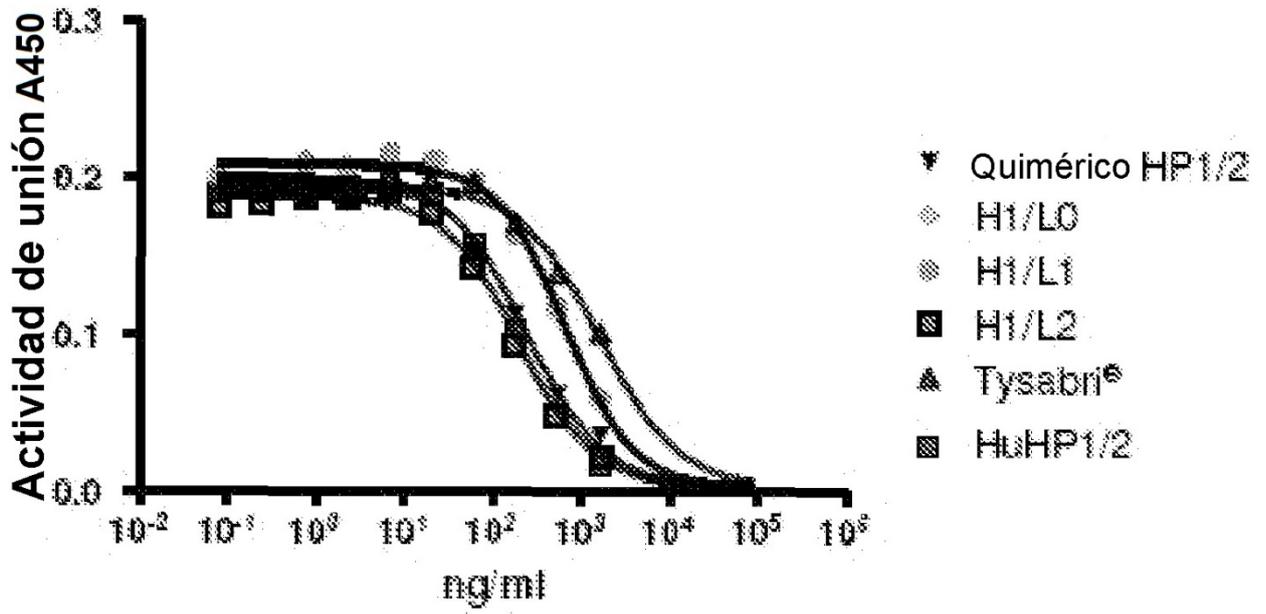


FIG. 5

ESKYGPPCPS**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD**
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSLG

FIG. 6

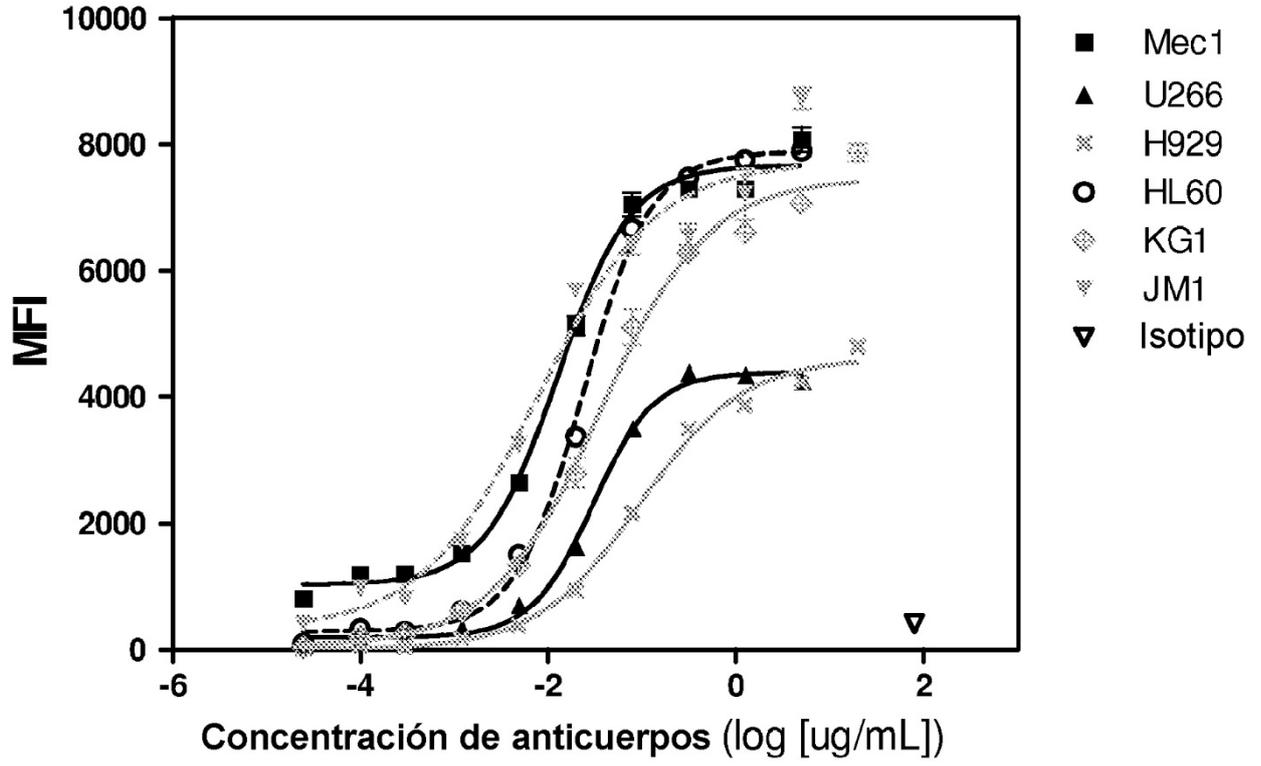


FIG. 7A

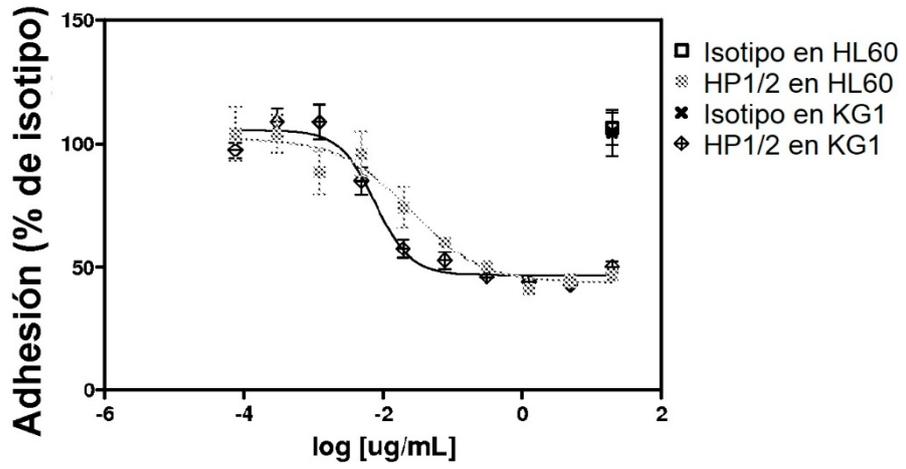


FIG. 7B

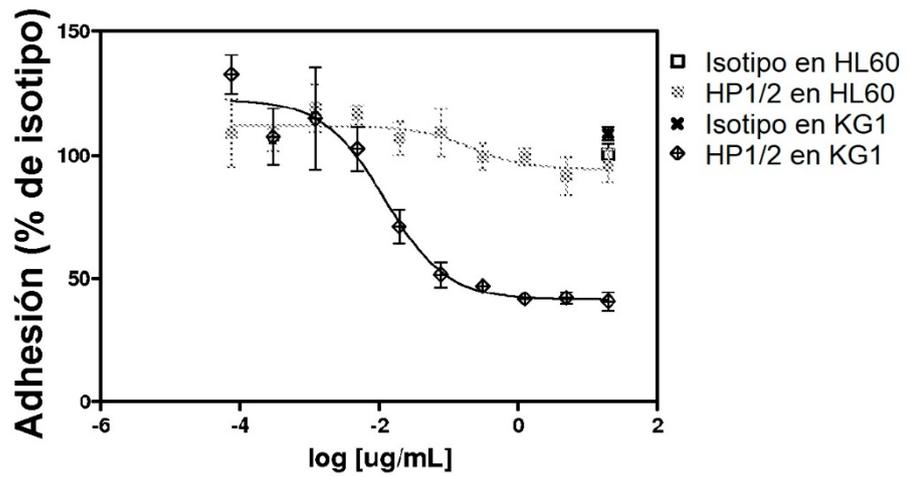


FIG. 7C

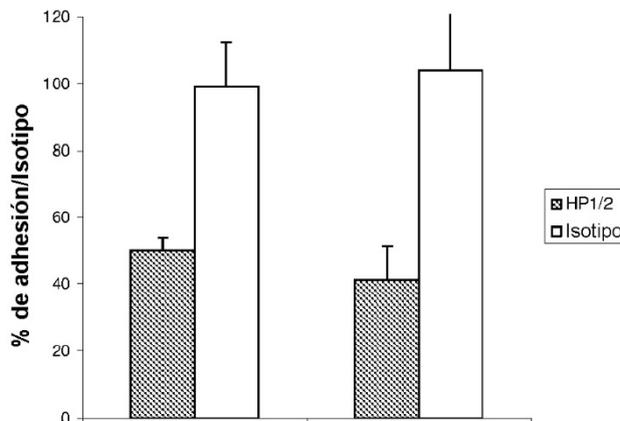


FIG. 8A

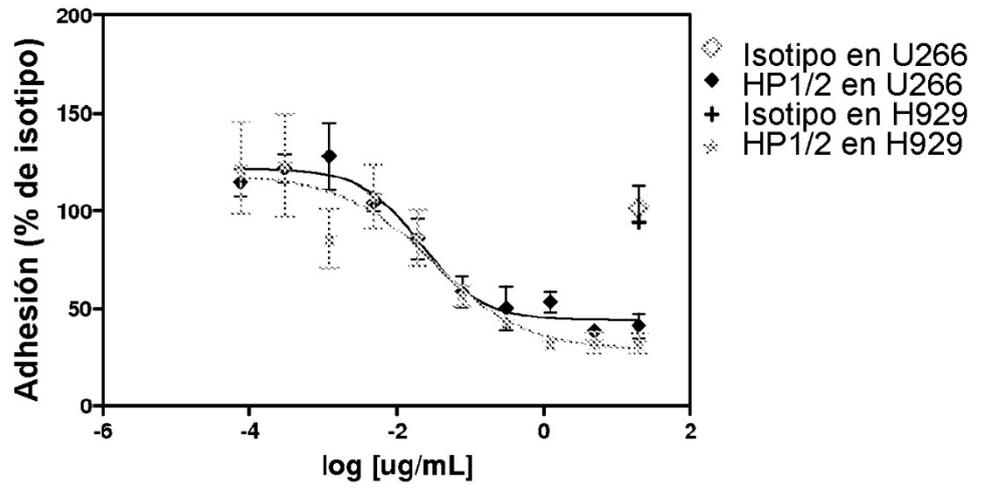


FIG. 8B

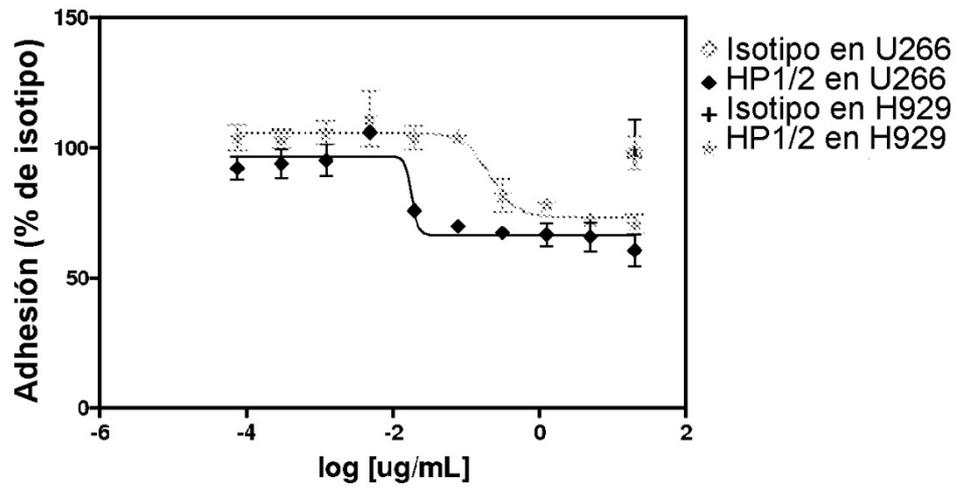


FIG. 8C

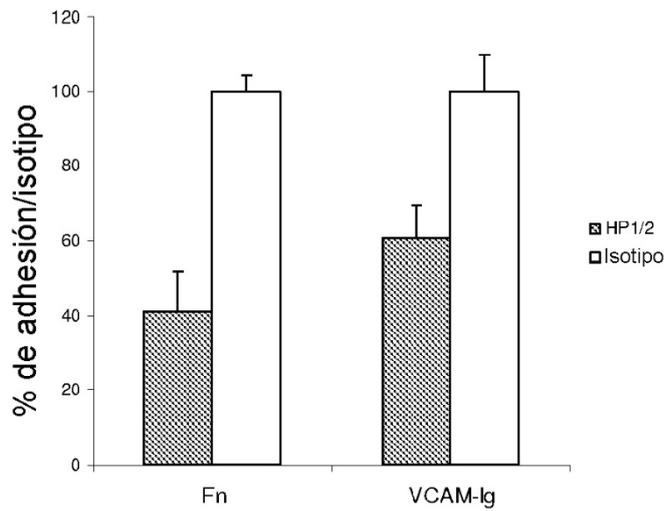


FIG. 9A

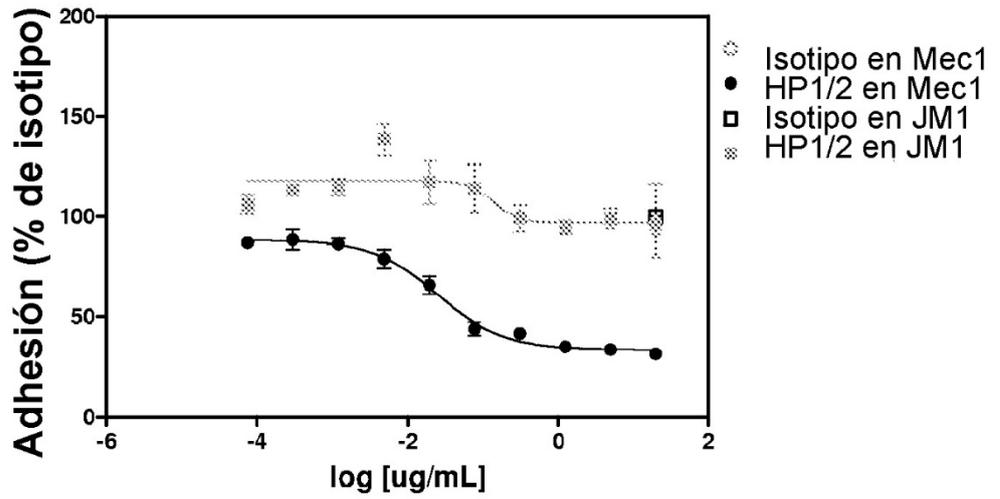


FIG. 9B

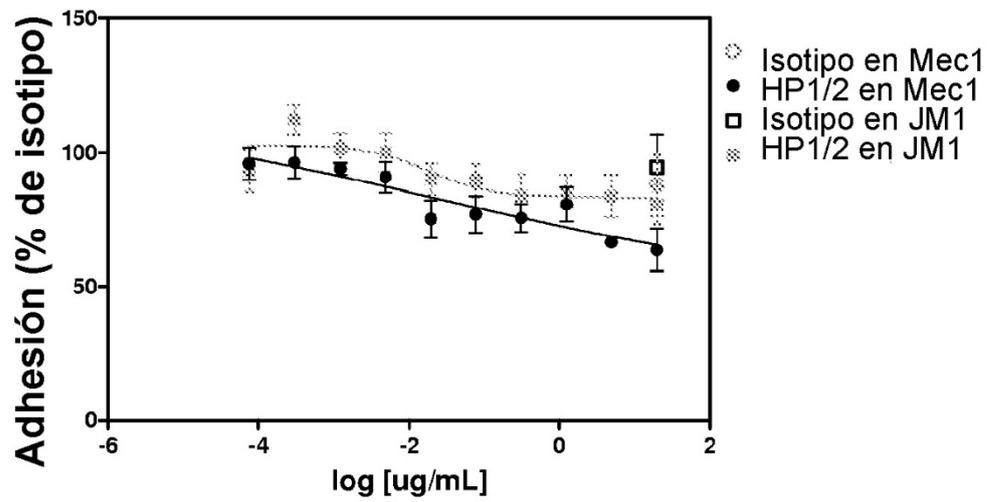


FIG. 9C

