



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 480**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61P 1/04** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 25/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03709277 .2**

96 Fecha de presentación : **25.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1485127**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54

Título: **Administración de agentes para el tratamiento de inflamación.**

30

Prioridad: **25.02.2002 US 360134 P**  
**23.04.2002 US 374501 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.11.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.11.2011**

73

Titular/es: **ELAN PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**800 Gateway Boulevard**  
**South San Francisco, California 94080, US**

72

Inventor/es: **Taylor, Julie y**  
**Yednock, Ted, A.**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 480 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

Administración de agentes para el tratamiento de inflamación

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general a agentes que se unen específicamente a, e inhiben, un receptor de integrina que comprende una subunidad alfa-4 (a4) y usos terapéuticos de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

10 La inflamación es una respuesta de tejidos vascularizados a infección o lesión y se ve afectada por adhesión de leucocitos a las células endoteliales de vasos sanguíneos y su filtración en los tejidos circundantes. En la inflamación normal, los leucocitos que se infiltran liberan mediadores tóxicos para matar a los organismos invasores, fagocitar residuos y células muertas y desempeñan un papel en la reparación tisular y la respuesta inmune. Sin embargo, en inflamación patológica, los leucocitos que se infiltran son excesivamente sensibles y pueden provocar daño grave o letal. Véase, por ejemplo, Hickey, *Psychoneuroimmunology II* (Academic Press 1990).

15 Las integrinas son una familia de glucoproteínas de superficie celular implicadas en la adhesión celular, migración y activación de células inmunes. La integrina alfa-4 se expresa por todos los leucocitos circulantes excepto neutrófilos y forma receptores heterodiméricos junto con las subunidades de integrina beta1 o beta7; los dímeros tanto alfa-4 beta-1 ( $\alpha 4\beta 1$ ) y alfa-4 beta-7 ( $\alpha 4\beta 7$ ) desempeñan un papel en la migración de leucocitos a través del endotelio vascular (Springer y col., 1994 *Cell* 76: 301-14; y Butcher y col., 1996 *Science* 272: 60-6) y contribuyen a activación y supervivencia celular dentro del parénquima (Damle y col., 1993 *J. Immunol.* 151: 2368-79; Koopman y col., 1994 *J. Immunol.* 152: 3760-7; y Leussink y col., 2002 *Acta Neuropathol.* 103:131-136).

20 Específicamente, alfa-4 beta-1 (también conocida como el antígeno muy tardío 4 [VLA-4]), se une a la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) (Lobb y col., 1994 *J. Clin. Invest.* 94:1722-8), que se expresa por el endotelio vascular en muchos sitios de inflamación crónica (Bevilacqua y col., 1993 *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767-804; y Postigo y col., 1993 *Res. Immunol.* 144:723-35). El dímero alfa-4 beta-7 interacciona con la molécula de adhesión celular adreína de mucosa (MAdCAM-1) y media la dirección de linfocitos al intestino (Farstad y col., 1997 *Am. J. Pathol.* 150: 187-99; y Issekutz y col., 1991 *J. Immunol.* 147: 4178-84). La expresión de MAdCAM-1 en el endotelio vascular también se aumenta en sitios de inflamación en el tracto intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (Briskin y col., 1997 *Am. J. Pathol.* 151: 97-110).

30 Las moléculas de adhesión tales como integrinas alfa-4 son dianas potenciales para agentes terapéuticos. Por ejemplo, el receptor VLA-4, del que la integrina alfa-4 es una subunidad, es una diana importante debido a su interacción con un ligando que reside en células endoteliales del cerebro. Las enfermedades e infecciones resultantes de inflamación cerebral tienen consecuencias particularmente graves. En otro ejemplo, el dímero de integrina alfa-4 beta-7 es una diana importante debido a su implicación en la dirección de linfocitos y la inflamación patológica en el tracto gastrointestinal.

35 La integrina alfa-4 beta-1 se expresa en la superficie extracelular de linfocitos y monocitos activados, que se han implicado en la patogénesis de lesiones cerebrales inflamatorias agudas y degradación de la barrera hematoencefálica (BBB) asociada con esclerosis múltiple (EM) (Coles y col., 1999 *Ann. Neurol.* 46(3): 296-304). Se han ensayado agentes contra la integrina alfa-4 con respecto a su potencial antiinflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. Véase Yednock y col., 1992 *Nature* 356: 63-66; Patente de Estados Unidos Nº 5.840.299 expedida a Bendig, y col. el 24 de noviembre de 1998 y la Patente de Estados Unidos Nº 6.001.809 expedida a Thorsett y col. el 14 de diciembre de 1999. Los experimentos *in vitro* demuestran que los anticuerpos de integrina alfa-4 bloquean la unión de linfocitos a células endoteliales cerebrales. Experimentos que ensayan el efecto de los anticuerpos de integrina alfa-4 en animales que tienen una afección inducida artificialmente que simula la esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), han demostrado que la administración de anticuerpos anti integrina alfa-4 evita la inflamación del cerebro y la parálisis posterior en los animales. Colectivamente, estos experimentos identifican anticuerpos anti integrina alfa-4 como agentes terapéuticos potencialmente útiles para tratar esclerosis múltiple y otros trastornos y enfermedades inflamatorias.

50 En otro ejemplo específico de inflamación patológica que implica integrinas alfa-4, la enfermedad de Crohn (CD) es una inflamación crónica, incurable, recurrente, transmural del tracto intestinal. La enfermedad se caracteriza por migración y activación celular inmune inapropiada en la mucosa intestinal que implica linfocitos T, macrófagos y neutrófilos (Schreiber y col., 1991 *Gastroenterology* 101: 1020-30). Las terapias médicas de primera línea para enfermedad de Crohn incluyen 5-aminosalicilatos (5-ASA); que tienen baja eficacia y corticosteroides, que tienen diversos efectos secundarios a corto y largo plazo (Munkholm y col., 1994 *Gut* 35: 360-2). Se trata a los pacientes refractarios para terapias de primera línea con agentes inmunosupresores tales como azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato, pero estos agentes tienen un comienzo de acción lento y efectos secundarios potencialmente graves (Stein y col., 2001 *Surg. Clin. North Am.* 81: 71-101, viii). Más recientemente, se han introducidos agentes biológicos con un comienzo de acción más rápido para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, pero tales agentes están asediados de forma similar por problemas tales como eficacia a largo plazo y efectos secundarios.

**Sumario de la invención**

5 La presente invención proporciona uso de un agente seleccionado de un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a integrina alfa-4 o un dímero que comprende integrina alfa-4 para preparar una composición farmacéutica administrable de forma crónica para reducir la inflamación patológica crónica causada por esclerosis múltiple en la que el agente es natalizumab que hay que administrar cada dos semanas o mensualmente durante un periodo de al menos 6 meses al paciente en una cantidad de 2 a 8 mg/kg por paciente.

10 En una realización, la eficacia de un régimen de dosificación crónico puede determinarse por la medición de saturación de un dímero de integrina específico. En un ejemplo particular, se cree que el dímero de integrina alfa-4 beta-1 está implicado en esclerosis múltiple y por lo tanto el nivel de saturación requerido para un régimen de administración crónico eficaz puede medirse mediante la medición de la saturación del receptor de dímero alfa-4 beta-1.

15 En una realización, el éxito de un régimen de dosificación crónico puede determinarse evaluando un marcador fisiológico de la inflamación patológica. Por ejemplo, en un régimen de dosificación crónico administrado para EM, el éxito del régimen de dosificación puede confirmarse por la detección de los niveles de lesiones cerebrales usando una técnica de formación de imágenes, por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

20 La invención presenta un régimen de dosificación en el que se proporciona administración repetida de un agente para proporcionar un nivel de saturación del receptor de integrina alfa-4 de 65-100 % en un paciente, proporcionado de este modo supresión crónica de inflamación patológica en el paciente. En otra realización específica, el agente se administra repetidamente para proporcionar niveles de al menos aproximadamente 75-100 % en un paciente. El agente se administra repetidamente para proporcionar niveles de al menos aproximadamente 80-100 % en un paciente.

Una característica de la invención es que pueden suprimirse efectos no deseables de inflamación patológica a largo plazo en un paciente, por ejemplo, durante un periodo de seis meses, un año, dos años o más.

25 Un aspecto del procedimiento de la invención es que se mantienen niveles suficientes de un agente anti integrina alfa-4 durante periodos largos para suprimir la inflamación patológica durante esos periodos.

Una característica de la invención es que la forma farmacéutica proporciona niveles menores de inflamación patológica durante periodos más largos en comparación con una dosis sencilla.

Una ventaja de la invención es que los agentes usados en los procedimientos de la invención se toleran bien y tienen baja toxicidad.

30 Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de los detalles de los procedimientos y formulaciones como se describen más completamente más adelante.

**Breves descripciones de los dibujos**

35 La Figura 1 es un gráfico de líneas que ilustra el número medio acumulativo de nuevas lesiones potenciadoras de Gd en pacientes con EM después de dosificación con natalizumab.

La Figura 2 muestra el porcentaje de exploraciones activas en cada punto temporal durante el estudio de EM con natalizumab. Las exploraciones activas son las que contienen una o más nuevas lesiones potenciadoras de Gd.

40 Las Figuras 3A-C y 4A-C muestran las concentraciones en suero de natalizumab después de los puntos temporales del régimen de dosificación en un estudio de EM. Las Figuras 3A-C muestran los niveles para el estudio de 3 mg/kg; Las figuras 4A-C muestran los niveles para el estudio de 6 mg/kg.

Las Figuras 5A-F ilustran los niveles de saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM. Los niveles mostrados son valores de porcentaje.

**Descripción detallada de la invención**

45 Antes de describirse los presentes procedimientos y agentes terapéuticos, debe entenderse que la presente invención no está limitada a procedimientos y agentes terapéuticos particulares descritos, puesto que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante.

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta un décimo de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto claramente indique otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos inferiores pueden incluirse independientemente en el inferior,

sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

5 Debe observarse que como se usa en el presente documento, las formas singulares “un” y “el” incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un anticuerpo” incluye una pluralidad de tales anticuerpos y la referencia a “la dosificación” incluye referencia a una o más dosificaciones y equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la materia y así sucesivamente.

10 Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden requerir confirmarse independientemente.

### Definiciones

15 La expresión “agente anti alfa-4” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier agente, que se une específicamente a una integrina que comprende una subunidad alfa-4 e inhibe la actividad de la integrina. Esto incluye agentes que se unen específicamente a integrina alfa-4, así como agentes que se unen a un dímero de integrina que comprende la integrina alfa-4, por ejemplo, alfa-4 beta-1 ( $\alpha 4\beta 1$ ) o alfa-4 beta-7 ( $\alpha 4\beta 7$ ). El término “agentes” pretende incluir moléculas sintéticas y recombinantes (por ejemplo, anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos u otras moléculas o compuestos producidos de forma sintética, así como productos génicos producidos de forma recombinante) así como compuestos de origen natural (por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos y similares).

20 El término “eficacia” como se usa en el presente documento en el contexto de un régimen de dosificación crónico se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento particular. La eficacia puede medirse basándose en cambio del curso de la enfermedad en respuesta a un agente de la presente invención. Por ejemplo, en el tratamiento de EM, la eficacia puede medirse por la frecuencia de recaídas en EM recidivante-remite y por la presencia o ausencia de nuevas lesiones en el sistema nervioso central como se detecta usando procedimientos tales como MRI.

25 El término “éxito” como se usa en el presente documento en el contexto de regímenes de tratamiento crónicos se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento particular. Esto incluye un equilibrio de eficacia, toxicidad (por ejemplo, efectos secundarios y tolerancia del paciente de una formulación o unidad farmacéutica), conformidad del paciente y similares. Para que un régimen de administración crónico se considere “exitoso” debe equilibrar diferentes aspectos de cuidado del paciente y eficacia para producir el resultado más favorable para el paciente.

30 Las expresiones “se une específicamente” o “específicamente se une” como se usa en el presente documento se refieren a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su compañero de unión específico (por ejemplo, una afinidad de aproximadamente 1.000x o más por su compañero de unión). En la presente invención, el agente anti integrina alfa-4 no mostrará unión significativa a ningún polipéptido distinto de una integrina alfa-4 o un receptor que comprenda una integrina alfa-4. Por ejemplo, los anticuerpos usados en los procedimientos de la invención que se unen a una integrina alfa-4 con una afinidad de unión de  $10^7$  moles/l o más, preferentemente  $10^8$  moles/l o más, se dice que se unen específicamente a una integrina alfa-4.

35 La expresión “sustancialmente homólogo” como se usa en el presente documento pretende significar cualquier polipéptido que tenga una alteración en la secuencia de modo que se sustituye con un aminoácido funcionalmente equivalente uno o más aminoácidos en el polipéptido, produciendo de este modo un cambio que tienen un efecto nulo o relativamente pequeño en las propiedades de unión del polipéptido. Por ejemplo, uno o más restos aminoácidos dentro de la secuencia pueden sustituirse con otro aminoácido de una polaridad similar.

40 Las expresiones “induce una respuesta inmune” e “induce una respuesta inmune del huésped” como se usan el presente documento se refieren a la producción de una respuesta inmunológica a un receptor que comprende una integrina alfa-4 en un sujeto tras la introducción de un agente de la invención al sujeto. Una respuesta inmune en el sujeto puede caracterizarse por reactividad de suero con un receptor de integrina alfa-4 que es al menos dos veces la de un sujeto no tratado, más preferentemente tres veces la reactividad de un sujeto no tratado e incluso más preferentemente al menos cuatro veces la reactividad de un sujeto no tratado, midiéndose la inmunoreactividad en suero usando una dilución en suero de aproximadamente 1:100.

45 La expresión “material excipiente” pretende significar cualquier compuesto que forme una parte de la formulación que se pretende que actúe meramente como un vehículo, es decir no se pretende que tenga actividad biológica en sí misma.

50 El término “adyuvante” como se usa en el presente documento se refiere a un aditivo de composición que aumenta la respuesta inmune a un agente de la invención pero que no inducirá por sí mismo una respuesta inmune. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmune usando una diversidad de mecanismos biológicos, incluyendo pero sin limitación reclutamiento linfocítico, estimulación de linfocitos T, estimulación de linfocitos B y estimulación de

macrófagos.

Los términos “tratando” y “tratamiento” y similares se usan en el presente documento para significar generalmente la obtención de un efecto fisiológico y farmacológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir o parcialmente prevenir una enfermedad, síntoma o afección de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, afección, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término “tratamiento” como se usa en el presente documento abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) evitar que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero al que aún no se haya diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar una regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o afecciones. La divulgación se refiere al tratamiento del padecimiento de un paciente de una enfermedad relacionada con inflamación patológica. La presente invención está implicada en prevenir, inhibir o aliviar efectos adversos atribuidos a inflamación patológica durante periodos largos de tiempo y/o son tales causados por las respuestas fisiológicas a inflamación inapropiada presente en un sistema biológico durante periodos largos de tiempo.

La expresión “inflamación patológica” como se usa en el presente documento se refiere a una inflamación inapropiada y crónica asociada con trastornos que incluyen, pero sin limitación, asma, aterosclerosis, demencia de Alzheimer, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple (especialmente para inhibir desmielinización adicional), metástasis tumoral, nefritis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia miocárdica, prostatitis crónica, complicaciones de anemia falciforme, lupus eritematoso y lesión de pulmón mediada por leucocitos aguda. Tal inflamación se caracteriza por una respuesta aumentada de células inflamatorias, incluyendo leucocitos que se infiltran. A lo largo del tiempo, tal inflamación patológica con frecuencia da como resultado daño a tejido en la región de inflamación inapropiada.

Por “Antegren®” se entiende incluir el anticuerpo también conocido como AN 100226 (código numérico de anticuerpo) o natalizumab (nombre USAN). Antegren® es un anticuerpo anti integrina alfa-4 humanizado recombinante. Preferentemente la enfermedad o afección que hay que tratar en el mamífero es una que se modula cuando se administra una dosis terapéuticamente eficaz de Antegren®.

### **Aspectos generales de la invención**

La presente invención se basa en el sorprendente resultado de que la administración crónica de una clase emergente de nuevos compuestos conocidos como inhibidores de moléculas de adhesión selectivos (SAMI) es suficiente para proporcionar el mantenimiento de supresión crónica de la inflamación en trastornos que implican dímeros de integrina. Tras el cese del régimen de dosificación repetido, la supresión de la inflamación se invierte (véase, por ejemplo, Figura 2). Tratamientos previos de inhibidores de inflamación han enfocado los regímenes de dosificación de forma bastante diferente, creyendo que la administración de un inhibidor de inflamación provocaría una reacción del sistema de respuesta del propio cuerpo, que a su vez conduciría a un reconocimiento de la inflamación como patológica y un alivio crónico resultante de la inflamación patológica. Lo que los inventores han mostrado en el presente documento es que un régimen de dosificación crónico no solamente es más eficaz que un régimen de dosificación a corto plazo, sino que de hecho se requiere para mantener la supresión de inflamación patológica. Por lo tanto, para conseguir algunas de las ventajas más importantes de la invención, los niveles de un agente anti integrina alfa-4 necesitan mantenerse durante varios meses o incluso años.

La presente invención se basa en los resultados de un ensayo grande, seleccionado de forma aleatoria y controlado por placebo de un anticuerpo anti integrina alfa-4, natalizumab, en pacientes con EM recidivante o con CD de moderada a gravemente activa. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante antagonista contra integrina alfa-4. Los resultados de estos dos ensayos han mostrado que el tratamiento con natalizumab mejoraba las señales y síntomas de pacientes con EM.

En un sentido general el procedimiento de la invención no implica ningún modo particular de administración, puesto que el modo de administración es dependiente de la forma del agente activo y la formulación desarrollada para administrar el agente o agentes activos. Sin embargo, los ejemplos específicos descritos en este documento se obtuvieron usando administración parenteral de natalizumab.

El concepto general de la invención se refiere a introducir cantidades relativamente constantes de natalizumab al sistema circulatorio de un paciente durante un periodo de meses o años. Esta introducción crónica de un agente que se une selectivamente a integrina alfa-4 o un dímero que comprende integrina alfa-4 da como resultado que la supresión de la inflamación patológica se mantenga a un nivel constante durante un periodo de tiempo. Manteniendo los niveles terapéuticos de un agente activo durante un periodo de tiempo, la inflamación patológica puede suprimirse crónicamente en el paciente.

En un sentido muy específico, la invención implica obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano de un dímero que comprende integrina alfa-4 en un intervalo de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 100 %, más preferentemente entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 % e incluso más preferentemente entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 100 %. Estos niveles de

saturación del receptor se mantienen a estos niveles de forma crónica (por ejemplo, durante un periodo de 6 meses aproximadamente) para permitir la supresión continuada de inflamación patológica.

### **Anticuerpos**

5 El agente de la invención es el anticuerpo natalizumab o fragmentos inmunológicamente activos del mismo que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o un dímero que comprende alfa-4, tal como alfa-4 beta-1.

10 Fragmentos inmunológicamente activos incluyen fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Más preferentemente los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv ligados por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que pueden comprender cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

15 Pueden producirse anticuerpos quiméricos y humanizados a partir de anticuerpos no humanos y pueden tener la misma o similar afinidad de unión que el anticuerpo del que se producen. Las técnicas para producir anticuerpos quiméricos (Morrison y col., 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851; Neuberger y col., 1984 Nature 312: 604; Takeda y col., 1985 Nature 314: 452) incluyen corte y empalme de los genes de, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada; tales anticuerpos están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una región variable (V) de un anticuerpo monoclonal de ratón puede unirse a un ácido nucleico que codifica una región constante humana (C), por ejemplo IgG1 o IgG4.

20 Si el agente es un anticuerpo, de acuerdo con la presente invención que va a proporcionarse a un individuo, la administración es mediante un régimen de dosificación crónica. La cantidad real administrada y la velocidad y curso temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre dosificación, etc., están dentro de la responsabilidad de facultativos generales y otros doctores en medicina y normalmente tiene en cuenta el trastorno que hay que tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el procedimiento de administración y otros factores conocidos para los facultativos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Osol, A. (ed.), 1990.

### **Composiciones farmacéuticas**

25 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas para la reducción de la inflamación patológica crónica en un sujeto susceptible de esta y/o que padece un trastorno asociado con inflamación patológica.

30 Las formulaciones farmacéuticas preferentemente contienen un agente en una concentración de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % de la formulación. También pueden usarse en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes procedimientos y excipientes son meramente a modo de ejemplo y no se pretende de ningún modo que sean limitantes.

35 Para preparaciones orales, los agentes pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes o agentes saporíferos.

40 Cuando el agente es un anticuerpo, la formulación se administra preferentemente en una forma farmacéutica parenteral. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, excipientes o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración humana o animal. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no inmunogénicos, no terapéuticos, no tóxicos y similares. También pueden incluirse moléculas vehículo tales como proteoglicanos. Los ejemplos específicos de tales moléculas vehículo incluyen, pero sin limitación, glucosaminoglicanos tales como heparín sulfato, ácido hialurónico, queratán sulfato, condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, heparán sulfato y dermatín sulfato, perlecan y pentopolisulfato.

- Los anticuerpos pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o como una suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua y aceites con o sin la adición de un tensioactivo. Otras preparaciones farmacéuticas son las de origen sintético, vegetal, animal o de petróleo, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los agentes pueden administrarse en una forma de liberación prolongada, por ejemplo una inyección de depósito, preparación de implante o bomba osmótica, que pueden formularse de tal manera que permitan una liberación prolongada del principio activo.
- Además, pueden proporcionarse anticuerpos administrando un polinucleótido que codifique un anticuerpo parcial o completo (por ejemplo, un Fv de cadena sencilla) a un sujeto. El polinucleótido se administra a un sujeto en un vehículo apropiado para permitir la expresión del anticuerpo en el sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- Los agentes pueden formularse en preparaciones para inyecciones disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol. Las formulaciones también pueden contener aditivos convencionales tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.
- Los agentes pueden usarse en formulación de aerosol para administrarse mediante inhalación o suministro pulmonar. Los agentes de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.
- Además, los agentes pueden componerse en supositorios mezclando con diversas bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los agentes pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carbowax y polietilenglicoles, que se funden a temperatura corporal, pero están solidificados a temperatura ambiente.
- La administración puede conseguirse por cualquier medio conveniente, incluyendo inyección parenteral y puede ser de suministro sistémico o localizado. Los agentes pueden incorporarse en una diversidad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los agentes pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Como tal, la administración puede conseguirse de diversas maneras, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, intranasal, gástrica, intramuscular, intracraneal, subdérmica, etc. El agente activo puede ser sistémico después de su administración o puede localizarse mediante el uso de administración regional, administración intramural o uso de un implante que actúa para conservar la dosis activa en el sitio de implantación.
- Pueden proporcionarse formas farmacéuticas unitarias para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharada, cucharada sopera, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más agentes de la presente invención. De forma similar, las formas farmacéuticas unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el agente de la presente invención en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Los implantes para formulaciones de liberación prolongada se conocen bien en la técnica. Los implantes se formulan como microesferas, bloques, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que tolera bien el huésped. El implante se coloca en proximidad al sitio de depósitos de proteína (por ejemplo, el sitio de formación de depósitos amiloides asociados con trastornos neurodegenerativos), de modo que la concentración local de agente activo aumenta en ese sitio en relación con el resto del cuerpo.
- Una unidad farmacéutica típica para administración de un sujeto incluye, pero sin limitación: una solución adecuada para administración intravenosa; un comprimido tomado de dos a seis veces al día; o una cápsula o comprimido de liberación en una vez tomada una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente mayor de principio activo, etc. El efecto de liberación temporizada puede obtenerse por materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, por cápsulas que liberan lentamente por presión osmótica o por cualquier otro medio conocido de liberación controlada.
- Los anticuerpos y péptidos en ocasiones se administran en combinación con un adyuvante. Pueden usarse diversos adyuvantes en combinación con un agente anti integrina alfa-4 para inducir una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un agente sin provocar cambios conformacionales en el agente que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL™) (Véase documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glucósido triterpeno o saponina

aislado de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina hallado en América del Sur (véase Kensil y col., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente de Estados Unidos N° 5.057.540, (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute y col., 1997 N. Engl. J. Med. 336: 86-91). Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Como alternativa, un agente puede acoplarse a un adyuvante, sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación del epítipo de alfa-4 deseado de modo que afecte a la naturaleza de la respuesta inmune del huésped. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse de forma separada antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes para administración son sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son formulaciones de emulsión de aceite en agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida™ u otros componentes de pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene escualeno 5 %, Tween 80 0,5 % y Span 85 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene escualeno 10 %, Tween 80 0,4 %, polímero bloqueado con pluronic L121 5 % y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor y (c) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno 2 %, Tween 80 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™). Otra clase de adyuvantes preferidos son adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21; Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir del mismo, tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo e incompleto de Freund (IFA), citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF). Tales adyuvantes generalmente están disponibles de fuentes comerciales.

Un adyuvante puede administrarse con un agente como una composición sencilla o puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración del agente. El agente y un adyuvante pueden envasarse y proporcionarse en el mismo recipiente o pueden envasarse en recipientes separados y mezclarse antes de su uso. El agente y el adyuvante se envasan normalmente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el agente y adyuvante se envasan por separado, el envase normalmente incluye instrucciones para mezclar antes de su uso. La selección de un adyuvante y/o vehículo depende de factores tales como la estabilidad de la formulación que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación y la eficacia del adyuvante para la especie a vacunar. En seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable preferido es uno que se ha aprobado para administración humana por los cuerpos reguladores pertinentes. Ejemplos de tales adyuvantes preferidos para seres humanos incluyen alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, dos o más adyuvantes diferentes pueden usarse simultáneamente. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21 y alumbre, QS-21 y MPL juntos. Además, puede usarse el adyuvante incompleto de Freund (Chang y col., 1998 Advanced Drug Delivery Reviews 32: 173-186), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

### **Regímenes de dosificación de administración crónica**

Los regímenes de tratamiento crónico de la presente invención proporcionan agente anti integrina alfa-4 a un nivel que mantendrá suficiente saturación del receptor para suprimir la inflamación patológica en un paciente que lo necesite. Los procedimientos de la invención implican administración una vez cada dos semanas o de una vez al mes a una vez cada dos meses teniendo lugar dosificaciones repetidas durante un periodo de al menos seis meses y más preferentemente durante un año o más. Los procedimientos de la invención implican obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano de un dímero que comprende integrina alfa-4 (por ejemplo, VLA-4) en un intervalo de aproximadamente el 65 % al 100 %, más preferentemente entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 100 % e incluso más preferentemente entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 100 %. Estos niveles de saturación del receptor se mantienen a estos niveles de forma crónica (por ejemplo, durante un periodo de 6 meses aproximadamente) para permitir la supresión continuada de información patológica.

En la invención, el agente anti alfa-4 es el anticuerpo humanizado, natalizumab, y la dosificación es mensual. Pueden controlarse los niveles de saturación del receptor para determinar la eficacia del régimen de dosificación y medirse los marcadores fisiológicos para confirmar el éxito del régimen de dosificación. Como confirmación, pueden controlarse los niveles en suero del anticuerpo para identificar la eliminación del anticuerpo y para determinar el



efecto potencial de la semivida en la eficacia del tratamiento.

Para administración del anticuerpo, cada inyección de dosificación está generalmente entre 2,0 y 8,0 mg/kg. De acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, pueden controlarse las dosificaciones eficaces obteniendo una muestra del fluido del paciente, generalmente una muestra de suero sanguíneo o fluido cerebroespinal y determinando la saturación del receptor de integrina usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Idealmente, se toma una muestra antes de la dosificación inicial; se toman muestras posteriores y se miden antes de y/o después de cada inmunización. Una cantidad particularmente preferida es 3 mg por kg de paciente por mes de natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo equivalente del mismo.

Cuando se administra adyuvante, el nivel de dosificación se aumenta de acuerdo con el adyuvante particular y el nivel de inmunogenicidad del agente anti alfa-4. Las dosis para agentes individuales, seleccionadas de acuerdo con la presente invención, se determinan de acuerdo con procedimientos de dosificación convencionales, tomados junto con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Como alternativa a la administración crónica comprendida por dosificaciones individuales repetidas, puede administrarse un agente anti alfa-4 como una formulación de liberación prolongada, siempre que la dosificación sea tal que los niveles de saturación del receptor sigan siendo suficientes para suprimir la inflamación. Por ejemplo, pueden usarse sistemas de liberación controlada para administrar de forma crónica un agente anti alfa-4 dentro del alcance de la presente invención. Pueden encontrarse análisis de formas farmacéuticas de liberación controlada apropiadas en Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.).

Las diversas tecnologías de liberación controlada abarcan un espectro muy amplio de formas de dosificación farmacológicas. Las tecnologías de liberación controlada incluyen, pero sin limitación, sistemas físicos y sistemas químicos. Los sistemas físicos incluyen, pero sin limitación, sistemas de depósito con membranas controladoras de la velocidad, tales como microencapsulación, macroencapsulación y sistemas de membrana; los sistemas de depósito sin membranas controladoras de la velocidad, tales como fibras huecas, triacetato de celulosa ultramicroporosa y sustratos poliméricos porosos y espumas; sistemas monolíticos, incluyendo los sistemas físicamente disueltos en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo, no erosionables, erosionables, de penetración de agente ambiental y degradables) y materiales físicamente dispersados en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo, no erosionables, erosionables, de penetración de agente ambiental y degradables); estructuras laminadas, incluyendo capas de depósito químicamente similares o diferentes a capas de control exteriores; y otros procedimientos físicos, tales como bombas osmóticas o adsorción en resinas de intercambio iónico.

Los sistemas químicos incluyen, pero sin limitación, erosión química de matrices poliméricas (por ejemplo, erosión heterogénea u homogénea) o erosión biológica de una matriz polimérica (por ejemplo, heterogénea u homogénea). Puede encontrarse análisis adicional de categorías de sistemas para liberación controlada en Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.).

El anticuerpo puede usarse para tratar a un paciente que está afectado por un trastorno que implica o surge de inflamación patológica o para tratar de forma profiláctica a un paciente en riesgo de un trastorno particular. Los regímenes de dosificación que son necesarios para tratamiento profiláctico frente a terapéutico pueden variar y requerirán diseñarse para el uso específico y trastorno tratado.

En algunos procedimientos, se administran dos o más agentes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión) simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada agente administrado queda dentro de los rangos indicados. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indica por medición de los niveles de saturación del receptor o siguiendo otros indicios del proceso de enfermedad.

Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosificación pueden variar en función del agente específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios. Algunos de los agentes específicos son más potentes que otros. Las dosificaciones preferidas para un agente dado son fácilmente determinables por los expertos en la materia por una diversidad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un agente dado.

### **Indicaciones terapéuticas**

Las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para obtener un amplio intervalo de efectos deseables. Particularmente las formulaciones son útiles para tratar esencialmente cualquier patología o síntoma que es tratable por administración a largo plazo de antiinflamatorios que se dirigen a una inflamación patológica.

El uso del anticuerpo es en el tratamiento de esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune neurológica progresiva que afecta a una estimación de 250.000 a 350.000 personas en los Estados Unidos. Se cree que la esclerosis múltiple es el resultado de una reacción autoinmune específica en la que ciertos leucocitos atacan e inician la destrucción de mielina, la vaina aislante que cubre las fibras nerviosas. En un modelo animal para esclerosis múltiple, se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra integrina alfa-4 beta-1 bloquean la adhesión de leucocitos al endotelio y evitan de este modo la inflamación del sistema

nervioso central y la parálisis posterior en los animales.

La aparición de EM puede ser dramática o tan suave que no provoque que un paciente busque atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad (en una o más extremidades), visión borrosa debido a neuritis óptica, alteraciones sensoriales, diplopía y ataxia. El curso de la enfermedad puede estratificarse en tres categorías generales: (1) EM recidivante, (2) EM progresiva crónica y (3) EM inactiva. La EM recidivante se caracteriza por ataques recurrentes de disfunción neurológica. Los ataques de EM generalmente evolucionan durante días a semanas y pueden seguirse de recuperación completa, parcial o ninguna. La recuperación de los ataques generalmente se produce en un periodo de semanas a varios meses desde el pico de los síntomas, aunque de forma poco habitual alguna recuperación puede continuar durante dos o más años.

5 La EM progresiva crónica da como resultado empeoramiento progresivo gradualmente sin periodo de estabilización o remisión. Esta forma se desarrolla en pacientes con un historial anterior de EM recidivante, aunque en el 20 % de los pacientes, no pueden encontrarse recaídas. Las recaídas agudas también pueden producirse durante el transcurso progresivo.

15 Una tercera forma es EM inactiva. La EM inactiva se caracteriza por déficits neurológicos fijos de magnitud variable. La mayoría de los pacientes con EM inactiva tienen un historial anterior de EM recidivante.

20 El curso de la EM también depende de la edad del paciente. Por ejemplo, los factores de pronóstico favorable incluyen aparición temprana (excluyendo infancia), un transcurso recidivante y poca discapacidad residual 5 años después de la aparición. Por el contrario, se asocia un pronóstico negativo con una edad tardía de aparición (es decir, 40 años de edad o mayor) y un transcurso progresivo. Estas variables son interdependientes, puesto que la EM progresiva crónica tiende a comenzar a una edad más tardía que EM recidivante. La discapacidad de EM progresiva crónica habitualmente se debe a paraplejia o tetraplejia progresiva en pacientes individuales. En un aspecto de la invención, los pacientes se tratarán preferentemente cuando el paciente esté en remisión en lugar de cuando esté en una etapa recidivante de la enfermedad.

25 El uso a corto plazo de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) o corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona oral o metilprednisolona intravenosa) es la única medida terapéutica específica para tratar pacientes con empeoramiento aguda de EM.

30 Terapias más nuevas para EM incluyen tratar al paciente con interferón beta-1b, interferón beta-1a y copaxone® (anteriormente conocido como copolímero 1). Se ha mostrado que estos tres fármacos reducen significativamente la tasa de recaída de la enfermedad. Estos fármacos normalmente se autoadministran por vía intramuscular o vía subcutánea.

35 Ninguno de los tratamientos actualmente disponibles inhibe la desmielinización o EM. Un aspecto de la invención contempla tratar EM con agentes desvelados en el presente documento solos o en combinación con otras modalidades de tratamiento convencionales. Las modalidades de tratamiento convencionales incluyen pero sin limitación las siguientes. Las modalidades de tratamiento adicional no analizadas en el presente documento para su uso en el tratamiento de EM en combinación con los procedimientos y composiciones desvelados en el presente documento dependiendo del estado de la enfermedad en el paciente serían evidentes para el facultativo experto. Tales modalidades de tratamiento adicional para EM u otra inflamación patológica incluirían otros inmunomoduladores o inmunosupresores.

40 Los agentes y composiciones farmacéuticas analizados anteriormente pueden administrarse de forma crónica para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de los trastornos inflamatorios anteriormente enumerados, incluyendo esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, aterosclerosis, artritis reumatoide, rechazo de injerto u órgano y enfermedad de injerto contra huésped. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente sospechoso de, o que ya padece una enfermedad tal en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz.

45 En aplicaciones profilácticas, se administran de forma crónica composiciones farmacéuticas a un paciente susceptible de, o de cualquier otro modo en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retardar la aparición de la enfermedad. Se define que una cantidad tal es una dosis profilácticamente eficaz. En pacientes con esclerosis múltiple en remisión, puede evaluarse el riesgo por formación de imágenes por NMR o, en algunos casos, por indicios presintomáticos observados por el paciente.

50 Los regímenes de dosificación eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medio de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. De este modo, se requerirá valorar las dosificaciones de tratamiento para optimizar la seguridad y eficacia. En general, cada administración del régimen de dosificación variará de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del huésped. Un régimen de dosificación preferido es 300 mg administrados una vez al mes durante un periodo de al menos 6 meses, más preferentemente 12 meses y quizás durante el transcurso de varios años. Otro régimen de dosificación que se prefiere es de 3 mg por kilogramo de peso del paciente por

mes. Un régimen tal puede ser preferible para pacientes pediátricos o adolescentes que necesiten terapia.

### **Terapias de combinación**

Los agentes anti alfa-4 pueden usarse con cantidades eficaces de otros agentes terapéuticos frente a inflamación aguda y crónica. Tales agentes incluyen otros antagonistas de moléculas de adhesión (por ejemplo, otras integrinas, selectinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) (véase Springer, 1990 Nature 346: 425-433; Osborn, 1990 Cell 62: 3; Hynes, 1992 Cell 9: 11). Las integrinas son glucoproteínas transmembrana heterodiméricas que consisten en una cadena  $\alpha$  (120-180 kDa) y una cadena  $\beta$  (90-110 kDa), que tienen generalmente dominios citoplasmáticos cortos. Por ejemplo, tres integrinas importantes (es decir, LFA-1, Mac-1 y P150,95) tienen diferentes subunidades alfa, designadas CAD 11a, CAD 11b y CD 11c y una subunidad beta común designada CD18. LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) se expresa en linfocitos, granulocitos y monocitos y se une predominantemente a un contra receptor miembro de la familia Ig denominado ICAM-1 y ligandos relacionados. ICAM-1 se expresa en muchas células, incluyendo leucocitos y células endoteliales y se regula positivamente en el endotelio vascular por citocinas tales como TNF e IL-1. Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ) se distribuye en neutrófilos y monocitos y también se une a ICAM-1. La tercera integrina  $\beta_2$ , P150,95 ( $\alpha_X\beta_2$ ), también se encuentra en neutrófilos y monocitos. Las selectinas consisten en L-selectina, E-selectina y P-selectina.

Otros agentes antiinflamatorios que pueden usarse en combinación con los agentes anti alfa-4 incluyen anticuerpos y otros antagonistas de citocinas, tales como interleucinas IL-1 a IL-13, factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ , interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), factor estimulador de colonias (CSF) y factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF). Otros agentes antiinflamatorios incluyen anticuerpos y otros antagonistas de quimiocinas tales como MCP-1, MIP-1  $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, exotaxina e IL-8. Otros agentes antiinflamatorios incluyen AINE, esteroides y otras moléculas pequeñas inhibitoras de inflamación. Las formulaciones, vías de administración y concentraciones eficaces de agentes para terapias combinadas son como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos humanizados contra integrina alfa-4.

Los agentes adicionales para su uso en combinación con agentes que median integrina alfa-4 o dímeros que comprenden integrina alfa-4 y tratan enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), Enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (CU), incluyen pero sin limitación 5-aminosalicilatos, glucocorticoides, derivados de tioguanina, metotrexato (MTX), ciclosporina, antibióticos e infliximab.

Los 5-aminosalicilatos incluyen sulfasalazina (también conocida como Azulfidina) que es un conjugado de mesalamina ligado a sulfapiridina por un enlace diazo y se administra habitualmente en una cantidad de 500 mg/día a aproximadamente 6 g/día. Los 5-aminosalicilatos también pueden coadministrarse con un glucocorticoide. Preferentemente, se usa un 5-aminosalicilato en terapia de combinación con uno de los agentes adicionales analizados en el presente documento para tratar colitis ulcerosa, sin embargo también puede usarse para tratar enfermedad de Crohn. Las formulaciones de mesalamina que no contienen sulfonamida incluyen pero sin limitación ASACOL®, CLAVERSA, SALOFALK, PENTASA®, DIPENTUM®, COLAZIDE y ROWASA®.

Los glucocorticoides han sido un fundamento del tratamiento para empeoramientos graves agudos de IBD desde 1955, cuando se mostró por primera vez que eran eficaces en CU. La prednisona oral puede administrarse junto con cualquiera de los agentes desvelados en presente documento. Normalmente, se administran de 20 a 40 mg de prednisona oral una vez al día. Los glucocorticoides también pueden administrarse por vía intravenosa y mediante enemas en combinación con, simultáneamente con o en un periodo de tiempo corto antes o después de que se administre un agente anti integrina alfa-4. Por ejemplo, la hidrocortisona está disponible como un enema de retención (100 mg/60 ml) y la dosis habitual es un enema de 60 ml por noche durante 2 a 3 semanas. Esto puede alterarse cuando se usa en combinación con las terapias y agentes analizados en el presente documento como se entendería por el experto en la materia. Otros esteroides que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, metasulfobenzato de prednisolona, pivalato de tixocortol, propionato de fluticasona, dipropionato de beclometasona y budesonide.

Los derivados de tioguanina también son útiles en el tratamiento de IBD, CD y CU. Estos incluyen pero sin limitación 6-mercaptopurina (6-MP) y azatioprina (IMURAN). Los dos fármacos pueden usarse de forma intercambiable en combinación con cualquiera de los agentes moduladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento.

También se contempla el metotrexato (MTX) para su uso en combinación con los agentes reguladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento. Preferentemente, MTX se administra mediante inyección intramuscular (i.m.) al sujeto en combinación con un agente anti integrina alfa-4. MTX es eficaz en CD dependiente de esteroides, pero no tan útil en CU. MTX puede administrarse en cantidades de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg por semana por sujeto o según sea necesario como se determine por el experto en la materia.

También pueden usarse ciclosporinas (por ejemplo, SANDIMMUNE®, NEORAL®) en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento para tratar inflamación patológica del intestino. Esto puede usarse para tratar CU grave aguda, que no responde a glucocorticoides.

Infliximab (es decir, REMICADE®) también puede usarse para tratar CD en combinación con los agentes

moduladores de integrina alfa-4 indicados en el presente documento. Infiximab es una inmunoglobulina que se une a TNF y neutraliza de este modo su actividad. Otros anticuerpos anti-TNF tales como CDP571, también pueden usarse en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 analizados en el presente documento.

5 También se contemplan anticuerpos para su uso en combinación con los agentes moduladores de integrina alfa-4 indicados en el presente documento para modular CU, IBD y CD. Por ejemplo, los pacientes pueden tratarse con metronidazol o ciprofloxacina (o equivalentes farmacológicos de los mismos) en combinación con un agente mediador de integrina alfa-4 o en forma de una mezcla.

10 También se contempla el uso de terapias de apoyo para IBD, CD y CU junto con agentes que median integrina alfa-4 o dímeros que comprenden integrina alfa-4 y tratan enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Las terapias de apoyo incluyen, pero sin limitación, analgésicos, agentes anticolinérgicos y antidiarreicos. Combinar tales terapias de apoyo puede ser útil al comienzo de un régimen de tratamiento para reducir los síntomas de un paciente y mejorar su calidad de vida. Las terapias de apoyo incluyen administración oral de hierro, folato y vitamina B<sub>12</sub>. Los agentes antidiarreicos incluyen, pero sin limitación difenoxilato, codeína, loperamida y anticolinérgicos (o equivalentes farmacológicos de los mismos), que pueden administrarse a pacientes con enfermedad suave para reducir la frecuencia de movimientos intestinales y aliviar la urgencia rectal. Puede usarse colestiramina en pacientes para evitar la secreción colónica inducida por sal biliar en pacientes que ya se hayan sometido a resecciones ileocólicas limitadas antes del tratamiento con los regímenes del tratamiento descritos en el presente documento. Los agentes anticolinérgicos incluyen, pero sin limitación, bromuro de clidinio, clorhidrato de diclomina, tintura de belladona y similares y son útiles para reducir calambres abdominales, dolor y urgencia rectal.

20 Para tratamiento de EM, los agentes anti integrina alfa-4 (por ejemplo, anticuerpos anti integrina alfa-4, compuestos pequeños antagonistas de integrina alfa-4 y similares) pueden combinarse con otros compuestos o composiciones usados para tratar, aliviar o paliar síntomas asociados con EM.

25 Otros agentes usados para tratar, aliviar o paliar síntomas asociados con EM, incluyen pero sin limitación: relajantes musculares (por ejemplo, Diazepam, ciclobenzaprina, Clonazepam, clonidina, primidona y similares), anticolinérgicos (por ejemplo, propantelina, dicitlomina y similares), estimulantes del sistema nervioso central (por ejemplo, Pemolina) agentes antiinflamatorios no esteroideos (NE tales como ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno), interferones, inmunoglobulina, glatirámero (Copaxone®), mitoxantrona (Novantrone®), misoprostol, inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (por ejemplo, Pirfenidona, infliximab y similares) y corticosteroides (por ejemplo, glucocorticoides y mineralocorticoides).

30 Los agentes habituales para tratar esclerosis múltiple incluyen interferón beta-1b (Betaseron®), interferón beta-1a (Avonex®), interferón de alta dosis beta-1a (Rebif), Glatirámero (Copaxone®), inmunoglobulina, mitoxantrona (Novantrone®), corticosteroides (por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona y similares). Otros corticosteroides también pueden usarse e incluyen pero sin limitación cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6 $\alpha$ -metilprednisolona, triamcinolona y betametasona.

35 Las formas farmacéuticas de los agentes a usar en combinación con los compuestos y composiciones desvelados en el presente documento variarían dependiendo del sujeto y combinación farmacológica que se usa. Por ejemplo, los interferones se administran normalmente como sigue: interferón beta-1a (Avonex®) se administra a 30  $\mu$ g una vez por semana; interferón beta-1a se administra a aproximadamente 22  $\mu$ g o 44  $\mu$ g tres veces por semana; e interferón beta-1b (Betaseron®) se administra a 250  $\mu$ g en días alternos (Durelli y col., Lancet 359: 1453-60,2002). Normalmente los interferones se administran para esclerosis múltiple recidivante o remitente. De este modo en combinación con los agentes anti integrina alfa-4 desvelados en el presente documento, los intervalos preferidos de interferones pueden incluir de aproximadamente 0,1  $\mu$ g a aproximadamente 250  $\mu$ g y más preferentemente de aproximadamente 0,5  $\mu$ g a aproximadamente 50  $\mu$ g, dependiendo de la manera en la que el agente se administre junto con los otros compuestos anti integrina alfa-4 y composiciones desveladas en el presente documento.

40 Los AINE o NE contemplados para su uso con la presente invención incluyen pero sin limitación inhibidores de COX no selectivos e inhibidores de COX-2 selectivos. Los inhibidores de COX no selectivos incluyen pero sin limitación derivados de ácido salicílico (por ejemplo, aspirina), salicilatos sódicos, trisalicilato magnésico de colina, salsalato, diflunisal, sulfasalazina y olsalazina, derivados de paraaminofenol (por ejemplo, acetaminófenol), ácidos acéticos de indeno e indol (por ejemplo, tolmetina, diclofenaco y ketorolaco), ácidos acéticos de heteroarilo (por ejemplo, abuprofeno, naproxeno, flubiprofeno, ketoprofeno, fenprofeno y oxaprozina), ácidos antranílicos o fenamatos (por ejemplo, ácido mefenámico y ácido meclofenámico), ácidos enólicos (por ejemplo, oxicam tales como piroxicam y meloxicam) y alcanonas (por ejemplo, nabumetona). Los inhibidores de COX-2 selectivos incluyen furanonas sustituidas con diarilo (por ejemplo, rofecoxib), pirazoles sustituidos con diarilo (por ejemplo, celecoxib), ácidos acéticos de indol (por ejemplo, etodolac) y sulfonanilidas (por ejemplo, nimesulida). Los NE se administran con frecuencia en combinación con interferón para reducir los síntomas de tipo gripe experimentados por pacientes que reciben, por ejemplo, Avonex®. Los agentes de NE habituales incluyen naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno. El paracetamol también se administra frecuentemente a los pacientes. Véase, Reess y col., 2002 Mult. Scler. 8: 15-8.

El acetato de glatirámero (GA, Copaxone®) es una molécula sintética que inhibe la activación de los linfocitos T

reactivos a proteína básica de mielina e induce un repertorio de linfocitos T caracterizado por efectos antiinflamatorios. Además, el glatirámero puede acceder al sistema nervioso central (SNC), mientras que el interferón-beta no puede (Dhib-Jalbut, 2002 *Neurology* 58: S3-9; Weinstock-Guttman y col., 2000 *Drugs* 59: 401-10).

5 La mitoxantrona es un agente sintético de antracenediona, que se ha mostrado que es eficaz para tratar esclerosis múltiple progresiva secundaria (EM-PS). Sin embargo, el uso de este fármaco está limitado de nuevo por su cardiotoxicidad acumulativa Weinstock-Guttman y col., 2000).

10 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) puede ser una citocina clave en la desmielinización (Walker y col., 2001 *Mult. Scler.* 7: 305-12). De este modo el uso de agentes que antagonizan la función de TNF- $\alpha$  o inhiben su síntesis pueden ser útiles en combinación con los agentes y compuestos desvelados en el presente documento. Esto puede incluir anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  (por ejemplo, infliximab) así como agentes tales como pirfenidona. La pirfenidona es un fármaco no peptídico, que se ha mostrado que reduce la síntesis de TNF- $\alpha$  y que bloquea receptores para TNF- $\alpha$ . Misma referencia.

15 El principal pilar en la mayoría de las afecciones y enfermedades desmielinizantes ha sido el uso de ACTH, glucocorticoides y corticosteroides. Estos agentes se usan por sus efectos anti-edema y antiinflamatorios. ACTH se administra habitualmente a un sujeto a 80 U proporcionado por vía intravenosa en 500 ml de dextrosa 5 % y agua durante 6-8 horas durante 3 días. También puede administrarse a 40 U/ml por vía intramuscular a una dosis de 40 U cada 12 horas durante 7 días, reduciendo la dosis después cada 3 días. Véase, S. Hauser, "Multiple sclerosis and other demyelinating diseases," en *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2287-95 (13<sup>a</sup> edición, Isselbacher y col., ed. 1994). La metilprednisolona se administra normalmente lentamente en 500 ml de D5W durante 6 horas, preferentemente por la mañana. Las dosificaciones habituales incluyen 1000 mg diarios durante 3 días, 500 mg diarios durante 3 días y 250 mg diarios durante 3 días. Misma referencia. También se administra habitualmente una combinación de metilprednisolona-prednisona. Normalmente se administran aproximadamente 1.000 mg de metilprednisolona intravenosa durante 3 días seguido de prednisona oral a 1 mg/kg por día durante 14 días. Por lo tanto, para su uso en combinación con los compuestos y composiciones desvelados en el presente documento, los esteroides pueden administrarse en cantidades que varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 mg/kg durante aproximadamente 1 a 14 días, según se requiera.

Un efecto secundario en las afecciones desmielinizantes tales como EM, es la fatiga y la reducción de la función cognitiva. Agentes tales como clorhidrato de amantadina y pemolina se han usado frecuentemente para tratar la fatiga asociada con EM (Geisler y col., 1996 *Arch. Neurol.* 53: 185-8).

30 El beneficio de tales terapias de combinación es que pueden reducir los efectos secundarios específicos de agente y específicos de clase que actualmente se encuentran con algunos de los fármacos. Los efectos secundarios específicos de clase de interferón beta incluyen fiebre, escalofríos, mialgias, artralgias y otros síntomas de tipo gripe, que comienzan de 2 a 6 horas después de la inyección y normalmente se resuelven 24 horas después de la inyección. Ocasionalmente el interferón beta también induce empeoramiento transitorio de síntomas de EM preexistentes. Los efectos secundarios específicos de agente incluyen reacciones en el sitio de inyección con interferón beta-1b. El tratamiento de estos efectos puede conseguirse adaptando la dosis y momento de administración, prescribiendo combinaciones apropiadas de acetaminógeno, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NE o AINE) y esteroides. Véase Munschauer y col., 1997 *Clin. Ther.* 19: 883-93.

40 De este modo, las combinaciones de fármacos que pueden reducir la cantidad de un fármaco particular administrado pueden reducir los efectos secundarios adversos experimentados por un paciente.

45 Cuando se administran en combinación, los compuestos pequeños antagonistas de integrina alfa-4 pueden administrarse en la misma formulación que estos otros compuestos o composiciones o en una formulación separada. Cuando se administran en combinación, los anticuerpos anti alfa-4 generalmente se administran en una formulación separada de los otros compuestos y composiciones. Cuando se administran en combinaciones, los agentes anti alfa-4 pueden administrarse antes de, después de o simultáneamente con los otros compuestos y composiciones usados para tratar, aliviar o paliar los síntomas.

### Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de ejemplos representativos de cómo realizar y usar las realizaciones de la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención, ni se pretende que representen que los experimentos posteriores son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A no ser que se indique de otro modo, las partes son partes por peso, el peso molecular es peso molecular medio en peso, la temperatura es en grados centígrados y 55 la presión es atmosférica o cercana.

Ejemplo 1Ensayo controlado de natalizumab en esclerosis múltiple recidivante**Población de Pacientes**

5 Veintiséis centros clínicos en Estados Unidos, Canadá y en el Reino Unido admitieron a 213 pacientes desde Septiembre de 1999 hasta Mayo de 2000. La junta de revisión institucional o el comité de ética central y local aprobaron el protocolo. Todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado por escrito. Se proporcionó supervisión del estudio por un comité de control de datos de seguridad independiente.

10 Se requería que los sujetos seleccionables tuvieran de 18 a 65 años de edad, con EM inequívoca apoyada por laboratorio o clínica definida por criterios de Poser, progresiva secundaria o recidivante-remitente (Poser y col., 1983 Ann. Neurol. 13: 227-31; Lublin y col., 1996 Neurology 46: 907-11), un historial de al menos dos recaídas dentro de los dos años anteriores, una puntuación de estado de discapacidad expandida de Kurtzke de línea basal (EDSS) (Kurtzke, 1983 Neurology 33: 1444-52) entre 2 y 6,5 y un mínimo de tres lesiones en MRI de cerebro ponderado con T<sub>2</sub>. Se excluyó a los pacientes si recibieron tratamientos inmunosupresores o inmunomoduladores en los tres meses anteriores o experimentaron una recaída o recibieron corticosteroides sistémicos en los 30 días anteriores.

**Diseño del Estudio y Selección Aleatoria**

15 Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a uno de tres grupos de tratamiento: natalizumab 3 mg/kg, natalizumab 6 mg/kg o placebo de acuerdo con un programa de selección aleatoria en bloque generado por ordenador. Los pacientes recibieron seis infusiones intravenosas a intervalos de 28 días y después tuvieron 6 meses de seguimiento de seguridad. Al investigador, a todo el resto del personal de estudio y a los pacientes se les impidió conocer la asignación de tratamiento.

**Procedimientos de Estudio y Criterios de Valoración**

20 Se obtuvieron exploraciones de cerebro de MRI ponderado con T<sub>1</sub> potenciado para Gd y ponderado con T<sub>2</sub> de densidad de protones no potenciado durante la fase de exploración (mes -1), inmediatamente antes de cada tratamiento (mes 0-5) y un mes después del último tratamiento (mes 6). Se obtuvieron exploraciones de MRI de seguimiento los meses 9 y 12. Se adquirieron 46 cortes axiales contiguos de 3 mm de grosor a través del cerebro. Se realizó un análisis de MRI por un centro sencillo ciego al tratamiento e historial del paciente. Se identificaron lesiones en imágenes de copia física por dos expertos clínicos experimentados trabajando por consenso.

30 La medida de resultado primaria prospectiva fue el número de nuevas lesiones potenciadoras de Gd durante el periodo de tratamiento de 6 meses, definido como el periodo después de la primera infusión a un mes después de la última infusión. Otros parámetros de MRI evaluados incluyeron: el número de lesiones potenciadoras de Gd persistentes (lesiones potenciadoras que también se habían potenciado en la exploración mensual anterior); el volumen de lesiones potenciadoras de Gd (medido por un procedimiento de establecimiento de umbral local semiautomático; Grimaud y col., 1996 Magn. Reson. Imaging 14: 495-505); el número de nuevas lesiones activas (es decir, nuevas lesiones potenciadoras de Gd más nuevas o crecientes lesiones T<sub>2</sub> no potenciadoras); y el número de exploraciones activas (es decir, que contienen una o más nuevas lesiones potenciadoras de Gd).

35 Los criterios de valoración clínicos incluyeron frecuencia de recaída y cambios en EDSS y una evaluación global autoinformada usando una escala de análogo visual (VAS). Se registraron todos los acontecimientos adversos. Se examinó a los pacientes a intervalos trimestrales programados y en visitas no programadas para recaídas sospechadas por los neurólogos responsables de la evaluación y el tratamiento que desconocían ambos la asignación de tratamiento del paciente. El neurólogo responsable del tratamiento realizó una examinación e historial médico y registró los acontecimientos adversos. El neurólogo responsable de la evaluación evaluó el estado neurológico y asignó una puntuación de EDSS sin conocimiento del historial del paciente o puntuaciones de EDSS anteriores.

45 Se definió una recaída objetiva como la aparición de un episodio agudo de nuevos o peores síntomas de EM que duraran al menos 48 horas después de un periodo estable de al menos 30 días. También se acompañó del aumento de al menos un punto en la puntuación de EDSS, un aumento de al menos un punto en dos puntuaciones de sistema funcional (FSS) o un aumento de al menos dos puntos en un FSS en comparación con línea basal, como se determinó por el neurólogo responsable de la evaluación. Los síntomas neurológicos que no cumplieron los criterios anteriores para recaída, pero que se evaluó por el neurólogo responsable del tratamiento que constituían una recaída, también se registraron (recaídas totales).

50 En una escala de análogo visual (VAS), los pacientes marcaron una localización a lo largo de una línea de 10 cm que reflejaba su evaluación de su bienestar global en línea basal y después de 3 y 6 meses de tratamiento, reflejando mayores puntuaciones mayor bienestar. Los pacientes se siguieron clínicamente hasta el mes 12. Se animó a los pacientes que abandonaron el tratamiento, pero que no alcanzaron el punto final, a volver para evaluaciones de seguimiento.

**Análisis Estadístico**

- 5 Las estimaciones de tamaño de muestra se basaron en el número de nuevas lesiones potenciadores de Gd observadas durante las primeras 12 semanas después de la primera infusión en un ensayo clínico previo de natalizumab (Tubridy y col., 1999 Neurology 53: 466-72). Basándose en los resultados de este ensayo previo y usando metodología de tamaño de muestras apropiada para una comparación de dos caras, dos grupos a un nivel de significación del 5 por ciento, basándose en la estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney (Noether, 1987 J. Amer. Stat. Assoc. 82: 645-7), se calculó que se necesitaban aproximadamente 73 pacientes en cada grupo para una potencia del 80 por ciento.
- 10 La comparación primaria del número de lesiones potenciadoras de Gd entre natalizumab 6 mg/kg y placebo así como volúmenes potenciadores de Gd se evaluó con el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los valores ausentes debido a no haber realizado una o más exploraciones de MRI se imputaron reemplazando el valor ausente con el número medio de lesiones en exploraciones disponibles para ese paciente. Las exploraciones de MRI obtenidas de pacientes que recibieron corticosteroides sistémicos dentro de los 30 días anteriores se descartaron y se trataron como valores ausentes. Se usó la estadística de correlación de Cochran-Mantel-Haenszel,
- 15 usando puntuaciones separadas equitativamente para las puntuaciones de grupos y rangos para la variable de resultado primario, para ensayar con respecto a una relación de respuesta a dosis usando datos de los tres grupos.
- Se usó el ensayo de chi cuadrado de Pearson para comparar las proporciones de pacientes con recaídas. Se analizaron los cambios desde línea basal en EDSS y VAS usando una ANOVA de dos vías con el centro de estudio y los grupos de tratamiento como variables independientes.
- 20 Todos los análisis incluyeron a todos los pacientes seleccionados de forma aleatoria y siguieron el principio de "intención de tratar". Todos los valores de P indicados son de dos colas. No hubo diferencias significativas en las características demográficas, historiales de enfermedad de EM, EDSS de entrada y parámetros de MRI entre los tres grupos en línea basal (Tabla 1).

**Tabla 1:** características de línea basal y demográficas de pacientes seleccionados de forma aleatoria.

CARACTERÍSTICA		Natalizumab		
		PLACEBO (N=71)	3 MG/KG (N=68)	6 MG/KG (N=74)
Edad, años	Media	42,9	42,8	44,9
	Intervalo	22-66	22-65	30-63
Género N (%)	Hombre	25 (35,2)	21 (30,9)	15 (20,3)
	Mujer	46 (64,8)	47 (69,1)	59 (79,7)
Categoría de EM N (%)	R-R	45 (63,4)	47 (69,1)	52 (70,3)
	S-P	26 (36,6)	21 (30,9)	22 (29,7)
EDSS	Media	4,40	4,21	4,32
	Intervalo	2,0-6,5	1,0-6,5	0,0-6,5
Duración de la enfermedad en años	Media	10,2	11,6	13,1
	Intervalo	1-32	0-40	2-39
Número de recaídas en los 2 años anteriores	Media	3	2,9	3,1
	Intervalo	2-12	2-10	2-8
Tiempo desde la última recaída en meses	Media	6,5	7,2	6
	Intervalo	2-17	2-24	2-22
Exploración de MRI ponderado con T <sub>1</sub> (Mes 1)		28 (40)	29 (43)	29 (40)
Número (%) de exploraciones con una o más lesiones potenciadoras de Gd				
Número de lesiones cerebrales potenciadoras de Gd				
	Media	1,6	1,5	1,7
	Intervalo	0-42	0-18	0-23
MRI ponderado con T <sub>1</sub> de línea basal (Mes 0)				
Número (%) de exploraciones con una o más nuevas lesiones potenciadoras de Gd. Número de nuevas lesiones cerebrales		22 (31)	29 (43)	32 (43)

CARACTERÍSTICA	PLACEBO (N=71)	Natalizumab	
		3 MG/KG (N=68)	6 MG/KG (N=74)
potenciadoras de Gd.			
<b>Media</b>	1,3	1,3	1,4
<b>Intervalo</b>	0-28	0-32	0-12

Resultado primario

5 Los pacientes en el grupo de placebo mostraron una media de 9,6 nuevas lesiones potenciadoras de Gd durante el periodo de tratamiento de seis meses. Los valores correspondientes en los grupos que recibieron natalizumab fueron de 0,7 para el grupo de 3 mg/kg (P<0,0001) y 1,1 para el grupo de 6 mg/kg (P<0,0001) (véase Tabla 2). Esta diferencia constituyó una reducción del 93 % y del 88 % en nuevas lesiones potenciadoras de Gd en los grupos de 3 mg/kg y 6 mg/kg, respectivamente. Fue evidente una diferencia entre los grupos de tratamiento en comparación con el placebo después de la primera infusión (Figura 1).

**Tabla 2:** resumen de actividad de MRI durante el tratamiento (meses 1-6) y seguimiento (meses 9 y 12)

	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	P VALOR*
<u>Nuevas lesiones potenciadoras M1</u>				
Media	9,6	0,7	1,1	(i) <0,0001
Mediana	2,0	0	0	(ii) <0,0001
DT	27,4	2,1	2,7	
<u>Lesiones potenciadoras persistentes M1-6</u>				
Media	3,6	0,8	1,3	<0,0001
Mediana	1	0	0	
DT	6,5	1,9	2,6	
<u>Nuevas lesiones activas M1-6</u>				
Media	9,7	0,8	1,1	<0,0001
Mediana	2,0	0	0	
DT	27,4	2,2	3	
Exploraciones activas M1-6 (%)	39 %	9 %	11 %	(i) <0,0001 (ii) <0,0001
<u>Volumen de lesión potenciadora M1-6 (mm<sup>3</sup>)</u>	1169,0	156	279,0	(i) 0,005
Media	266	0	0	(ii) 0,01
Mediana	2666	359,0	632,0	
DT				
<u>Nuevas lesiones potenciadoras M9 y 12</u>				
Media	2,5	2,6	2,1	(i) 0,90
Mediana	1,0	0,5	0	(ii) 0,59
DT	4,37	4,58	4,96	
<u>Lesiones potenciadoras persistentes M9 y 12</u>				
Media	0,2	0,1	0,1	0,029
Mediana	0	0	0	
DT	0,64	0,32	0,3	
<u>Nuevas lesiones activas M9 y 12</u>				
Media	2,7	2,8	2,3	0,424



	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	P VALOR*
Mediana	1,0	0,5	1,0	
DT	4,49	5,69	5,11	
Exploraciones activas M9 y 12 (%)	42 %	40 %	35 %	
Volumen de lesión potenciadora M9 y 12 (mm <sup>3</sup> )				0,260
Media	427,0	323	233	
Mediana	88,0	31,0	0	
	PLACEBO	3 MG/KG	6 MG/KG	P VALOR*
DT	797,0	591,0	686	

\*(i) comparación de placebo frente a natalizumab 3 mg/kg ; (ii) comparación de placebo frente a natalizumab 6 mg/kg

#### Resultados de MRI Secundarios

Hubo una reducción significativa y notable en el número acumulativo de lesiones potenciadoras persistentes, nuevas lesiones activas, volumen total de lesiones potenciadoras y porcentaje de exploraciones activas de los meses 1-6 (Tabla 2; Figura 2).

#### Resultados de eficacia clínica

Durante el periodo de tratamiento de seis meses, se registraron un total de 35 recaídas en 26 de los 71 pacientes con placebo; se registraron 18 recaídas en 13 de los 68 pacientes que recibieron natalizumab 3 mg/kg y se registraron 15 recaídas en 14 de los 74 pacientes que recibieron 6 mg/kg (P=0,05, placebo frente a todos los pacientes tratados con natalizumab). Aplicando los criterios de recaída objetivos más rigurosos, el efecto era igualmente fuerte: 18 recaídas en 15 pacientes de placebo; 3 recaídas en 3 pacientes que recibieron natalizumab 3 mg/kg; 8 recaídas en 8 pacientes que recibieron natalizumab 6 mg/kg (P=0,05). Más recidivas en el grupo de placebo requirieron tratamiento con esteroides que en los brazos tratados (22 en el grupo de placebo, 5 en el de natalizumab 3 mg/kg y 7 en el de natalizumab 6 mg/kg, P=0,007, placebo frente a todos los pacientes tratados con natalizumab).

En la VAS, los pacientes en el grupo de placebo no indicaron cambios, mientras que los de los grupos de natalizumab indicaron una mejoría en su bienestar en el mes 6, momento en el cual la diferencia entre los grupos era significativa (P=0,033, placebo frente a todos los pacientes tratados con natalizumab). No se observaron cambios significativos en EDSS en ningún grupo durante el tratamiento.

#### Concentración de Anticuerpos y Saturación del Receptor

Se recogieron muestras de suero de los pacientes en cada visita y se analizaron cuantitativamente con respecto a anticuerpos dirigidos específicamente contra natalizumab usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). También se midieron los niveles en suero de natalizumab y la ocupación del receptor por natalizumab en un subgrupo de 12 a 14 pacientes por grupo de tratamiento antes de cada infusión y a las 2 horas, 24 horas, 1, 2 y 3 semanas después de la primera y última infusiones.

Se determinaron las concentraciones de anticuerpo en suero usando un ensayo de ELISA. Brevemente, se preparó una solución de 2,0 µg/ml de un anticuerpo de captura que se une específicamente a natalizumab en una solución que contenía bicarbonato sódico a pH 8,3. Se añadieron 100 µl de la solución de anticuerpo a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos Costar. La placa se recubrió con una cinta sellante de placas y se incubó a temperatura ambiente durante 12-26 horas. La placa se aspiró, se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo (caseína 0,25 % en PBS, pH 7,4) a cada pocillo y se incubó durante una hora adicional a temperatura ambiente. Después las placas se desecaron y se almacenaron para su uso posterior o se lavaron una vez con 300 µl de tampón de ensayo (TBS, pH 7,5 que contenía Tween-20 0,05 %). Si las placas se desecaron, se rehidrataron justo antes de su uso añadiendo 300 µl de tampón de lavado a cada pocillo e incubando durante 1-2 minutos. Las placas se aspiraron y se invirtieron sobre pañuelos de papel para absorber el exceso de humedad.

Las muestras de ensayo se diluyeron en diluyente de caseína antes del ELISA (caseína 0,25 % en PBS, con Tween-20 0,05 %, pH 7,4). Normalmente, se ensayan de dos a tres diluciones de cada muestra para asegurar que los valores de natalizumab eran precisos. También se prepararon muestras de control de dilución usando cantidades conocidas de natalizumab para controlar la precisión de las etapas restantes.

Se añadieron 100 µl de patrón de referencia, muestra de ensayo o muestra de control de dilución a cada pocillo y la placa se incubó durante 60-75 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se retiró la humedad restante. Se añadieron 100 µl de conjugado de fosfatasa alcalina IgG4 anti humano de ratón recién diluido a cada pocillo y las placas se incubaron durante 60 minutos adicionales a temperatura ambiente.

Después de la incubación, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y se retiró la humedad restante. Se añadieron 100 µl de sustrato fluorescente A usando un pipeteador multicanal calibrado y las placas se incubaron 45-60 minutos a temperatura ambiente. Los niveles en cada pocillo se determinaron usando un Lector de Microplacas de Fluorescencia fmax usando el archivo de protocolo conc102.ppr de SOFTmax Pro Versión 1.3.1.

- 5 Los resultados son como se muestran en las Figuras 3 y 4. Como se muestra en estas figuras, los niveles de natalizumab se redujeron entre las dosificaciones y en el mes 7 u 8 (es decir, de 2 a 3 meses después de la dosificación final) el anticuerpo no era detectable en la mayoría de los pacientes.

Además de medir la concentración de anticuerpo en suero, se determinaron los niveles de saturación del receptor y específicamente niveles de saturación de VLA-4, durante el estudio de dosificación usando análisis de FACS. La determinación de saturación de VLA-4 se determinó por un inmunoensayo indirecto usando citometría de flujo.

10 Se separó aproximadamente 1 ml de una muestra de sangre de un paciente en alícuotas en dos tubos de polipropileno de 15 ml y se añadió tampón de ensayo frío (suero humano [Scantibodies Laboratory, Inc. Part 3SH341] diluido al 3 % en PBS) hasta la marca de 14 ml en el tubo. Los tubos se centrifugaron a 2.200 rpm durante 5 minutos a 10-15 °C y el líquido se aspiró y se descartó. El sedimento celular se resuspendió en tampón de lavado frío hasta un total de 1 ml.

15 Se preparó un patrón de referencia de reserva de natalizumab 500 µg/ml en tampón de lavado. Se añadieron 20 µl de la referencia de reserva de natalizumab diluida al primer tubo y se añadieron 20 µl de tampón de lavado al segundo tubo. Ambos tubos se incubaron en hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, los tubos se llenaron con tampón de lavado hasta la marca de 14 ml y se centrifugaron a 2.200 rpm durante 5 minutos en frío. El sobrenadante se aspiró y la etapa de lavado se repitió una segunda vez. Después del segundo lavado, las células se resuspendieron en tampón de lavado hasta la marca de 1 ml.

20 Se añadieron 10 µl de anticuerpo anti CDw49d humano conjugado con R-Ficoeritrina (PE) (Pharmingen, Cat. nº 31475X) a cada tubo y los tubos se agitaron por vórtex suavemente. Los tubos se incubaron a 2-8 °C durante 10-15 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, se añadieron 2 ml de solución de lisado 1X, pH 7,4, y cada tubo se agitó en vórtex suavemente. Los tubos se incubaron en hielo durante 10-15 minutos a 2-8 °C, se centrifugaron 5 minutos en frío y el sobrenadante se aspiró del sedimento celular. El sedimento celular se resuspendió en 4 ml de tampón de tinción frío y los tubos se centrifugaron de nuevo a 2.200 rpm en frío. El sobrenadante se retiró después muy cuidadosamente, se añadieron 0,5 ml de una solución fijadora (fijador de Ortho pH 7,6) y los tubos se agitaron por vórtex inmediatamente para asegurar que las células se resuspendieran en el fijador. Los tubos se cubrieron con papel de aluminio hasta el ensayo de FACS.

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

30 Los niveles de saturación del receptor se muestran en la Figura 5. Los niveles de saturación del receptor para los meses 1-4 se determinaron antes de la dosificación de ese mes. Los niveles de saturación del receptor producida por intervalos de dosificación de un mes fueron consistentemente bastante altos y estos niveles crónicos fueron suficientes para mantener una supresión de la inflamación patológica y evidencias fisiológicas asociadas de la enfermedad. En promedio, los niveles de saturación se mantuvieron durante un mes a una media de al menos 67 % y una mediana de al menos 75 %. Estos niveles fueron suficientes para la supresión de lesiones cerebrales en los pacientes tratados (véase Figura 1). El nivel mínimo de saturación determinado en el estudio preinfusión desde el mes 2 hasta el mes 5 (y la semana 21 después de la administración en el mes 5) es particularmente bajo en comparación con los valores medio y mediano debido a un paciente sencillo con una respuesta de anticuerpo a natalizumab.

35 A medida que los niveles de saturación del receptor disminuyeron en los pacientes, también lo hizo la eficacia del tratamiento. Los niveles de saturación del receptor medios de 42 % y niveles de saturación del receptor medianos de 41 % de saturación del receptor en la población tratada no se asociaron con supresión de lesiones cerebrales en la población de pacientes (véase Figuras 2 y 5) y por lo tanto es necesario un nivel de saturación del receptor crónico por encima de este para supresión eficaz de inflamación patológica usando agentes tales como inhibidores de alfa-4.

#### Seguridad y Tolerancia

40 El tratamiento repetido con natalizumab, a dosis de 3 o 6 mg/kg, pareció ser bien tolerado por pacientes con EM durante un periodo de tratamiento de seis meses. Un número similar de pacientes de cada grupo experimentó acontecimientos adversos emergentes por tratamiento. Aunque no eran significativos, ciertos acontecimientos adversos se producían de forma más habitual con natalizumab en comparación con el placebo (Tabla 3). Se vio una linfocitosis suave prolongada en los brazos de natalizumab durante el periodo de tratamiento de seis meses.

55

**Tabla 3:** acontecimientos adversos indicados más habitualmente en pacientes tratados con natalizumab frente a placebo\*

	<b>PLACEBO(71)</b>	<b>3 MG/KG (68)</b>	<b>6 MG/KG (74)</b>
<b>Número total de pacientes con acontecimientos adversos</b>	68 (96 %)	62 (91 %)	70 (95 %)
<b>Cuerpo completo</b> <b>Infección</b>	10 (14 %)	14 (21 %)	14 (19 %)
<b>Sistema digestivo</b> Flatulencia	0	4 (6 %)	0 (0 %)
<b>Sistema nervioso</b> Parestesia circunmoral	1 (1,0 %)	5 (7 %)	2 (3 %)
<b>Sistema respiratorio</b> Sinusitis Faringitis	3 (4 %) 8 (11 %)	7 (10 %) 10 (15 %)	3 (4 %) 15 (20 %)
<b>Piel y apéndices</b> Erupción	4 (6 %)	6 (9 %)	8 (11 %)
<b>Sistema urogenital</b> Infección	10 (14 %)	14 (21 %)	11 (15 %)
*A incluir en la Tabla, se requirió una diferencia de al menos 5 por ciento en la incidencia de acontecimientos adversos entre el brazo de placebo y uno de los brazos de natalizumab.			

5 No hubo diferencias significativas en el número de acontecimientos adversos graves (SAE) indicados en los brazos de placebo y tratamiento (es decir, 7 pacientes tratados con placebo indicaron 11 SAE, 5 pacientes que recibieron natalizumab 3 mg/kg indicaron 5 SAE y 3 pacientes que recibieron natalizumab 6 mg/kg indicaron 4 SAE). De estos, se consideró que cuatro eran mediados de forma inmune y relacionados con el fármaco del estudio. Hubo una reacción anafiláctica con urticaria y broncoespasmos en el grupo de 3 mg/kg, que se revirtió rápidamente con tratamiento de esteroides y antihistaminas. Hubo tres informes de náuseas por suero, una en cada grupo incluyendo placebo. Solamente un acontecimiento se acompañó de un cambio en los niveles de complemento y todos se produjeron en el mismo sitio de investigación. En general, estos acontecimientos complicaron menos de una de cada 250 infusiones.

10 No hubo diferencias en el número de pacientes que abandonaron el tratamiento debido a un acontecimiento adverso entre los grupos (es decir, 3 en el grupo de placebo, 4 en el grupo de 3 mg/kg y 3 en el grupo de 6 mg/kg). Hubo una muerte en el estudio secundaria a carcinomatosis pleural complicada por hemotórax en un paciente con placebo.

15 La tasa de formación de anticuerpos también se evaluó. En general, 15 pacientes tratados con natalizumab (11 por ciento) desarrollaron anticuerpos anti-natalizumab: 13 durante el periodo de tratamiento y 2 durante el periodo de seguimiento post-tratamiento. La relevancia clínica, si la hubiera, de la presencia de anticuerpos anti-natalizumab no se conoce actualmente.

20 Las concentraciones en suero máximas de natalizumab fueron dependientes de dosis y no hubo acumulación significativa observada con dosificación repetida. Los pacientes que recibieron natalizumab a 3 mg/kg mostraron más del 80 % de saturación del receptor VLA-4 durante el periodo de tratamiento; la ocupación del receptor fue mayor (aproximadamente el 90 %) y más prolongada en pacientes que recibieron natalizumab 6 mg/kg.

#### Seguimiento Post-tratamiento: Meses 6-12.

25 El número acumulativo de nuevas lesiones de potenciación y exploraciones activas (meses 9 y 12 combinados) fueron similares en los tres grupos (Tabla 2). Hubo una tendencia a menor actividad en el grupo de 6 mg/kg el mes 9. No hubo una diferencia significativa en el número total de recaídas clínicas indicadas entre los tres grupos: 24 en el grupo de placebo, 24 en el grupo de 3 mg/kg y 26 en el grupo de 6 mg/kg o en el número de recaídas según se determinó por los criterios objetivos predefinidos.

30 Este estudio es el primero que proporciona sólidas pruebas clínicas y MRI en seres humanos de que la inhibición selectiva de tráfico y adhesión de leucocitos mediados por integrina alfa-4 es un enfoque eficaz para el tratamiento

- crónico de la EM. Ambos niveles de dosis del anticuerpo monoclonal humanizado específico de integrina alfa-4 natalizumab demostraron efectos altamente significativos estadísticamente en comparación con placebo en la supresión de nuevas lesiones cerebrales inflamatorias potenciadoras de Gd en pacientes con EM durante el periodo de tratamiento de seis meses. Se observó una reducción de estas lesiones en pacientes tratados con natalizumab un mes después de la primera infusión y se prolongó a lo largo del periodo de tratamiento. Para ambos niveles de dosis, la reducción fue de aproximadamente el 90 %, un efecto mayor que la reducción del 50 al 70 % indicada con interferones beta (Grupo de Análisis MS/MRI, 1995 Neurology 4: 1277-1285; Jacobs y col., 1996 Ann. Neurol. 39: 285-294; y Grupo de Estudio PRISEM (Prevención de Recaídas y Discapacidad por Interferón beta-1a por vía Subcutánea en Esclerosis Múltiple), 1998 Lancet 352: 1498-1504).
- Además, los efectos de natalizumab en los resultados de MRI en este ensayo están apoyados por observaciones clínicas. Este estudio no estaba preparado prospectivamente para mostrar efectos en los resultados clínicos. No obstante, el tratamiento con natalizumab dio como resultado una reducción significativa de la tasa de recaída y una percepción de bienestar aumentado entre los pacientes. Cuando se consideran todas las recaídas clínicas indicadas, ambos grupos de natalizumab experimentaron significativamente menos recaídas que el grupo de placebo durante los seis meses del tratamiento. También se observó una reducción significativa de estos episodios usando criterios de recaída predefinidos; una medida más rigurosa, debido a que requiere un cambio en las señales objetivas. El efecto de natalizumab en recaídas excede el de los tratamientos actualmente aprobados para EM, que presentan un efecto de aproximadamente el 30 % (Grupo de Análisis MS/MRI, mencionado anteriormente; Jacobs y col., mencionado anteriormente; Grupo de Estudio PRISMS, mencionado anteriormente; Johnson y col., 1995 Neurology 45:1268-76).
- Es importante destacar que no se observaron efectos de rebote en nuevas lesiones de MRI o recaídas en los grupos de natalizumab después de la finalización del tratamiento. Además, se toleraron bien las infusiones mensuales de natalizumab durante seis meses y se asociaron con un perfil de seguridad similar al placebo y aceptable para el tratamiento crónico de EM.
- Los resultados del presente estudio proporcionan apoyo adicional para el papel de la integrina alfa-4 y las células inmunes que la expresan, en la patogénesis de lesiones cerebrales inflamatorias agudas en pacientes con EM. La reducción de nuevas lesiones potenciadoras de Gd fue evidente después de un mes de tratamiento. Esta observación sugiere que natalizumab actúa pronto en el desarrollo de la lesión previniendo la aparición de nuevas lesiones.
- En resumen, natalizumab ha demostrado fuertes efectos en parámetros clínicamente significativos en el presente ensayo controlado por placebo en pacientes con EM recidivante. La terapia se toleró bien durante este ensayo de seis meses. Los efectos beneficiosos de natalizumab en la aparición de nuevas lesiones de SNC inflamatorias, la aparición de recaídas clínicas y mejora en el bienestar de los pacientes observados en este estudio indican el potencial para observar efectos en discapacidad en estudios a más largo plazo actualmente en progreso.

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un agente seleccionado de un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a integrina alfa-4 o un dímero que comprende integrina alfa-4 para preparar una composición farmacéutica administrable de forma crónica para reducir la inflamación patológica crónica causada por esclerosis múltiple en el que el agente es natalizumab que debe administrarse cada dos semanas o mensualmente durante un periodo de al menos 6 meses al paciente en una cantidad de 2 a 8 mg/kg del paciente.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la administración crónica es durante un periodo de al menos 12 meses.
3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en el que el agente se une a dímeros de integrina alfa-4.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el dímero de integrina alfa-4 es alfa-4 beta-1.

Número medio acumulativo de nuevas lesiones potenciadoras de GD

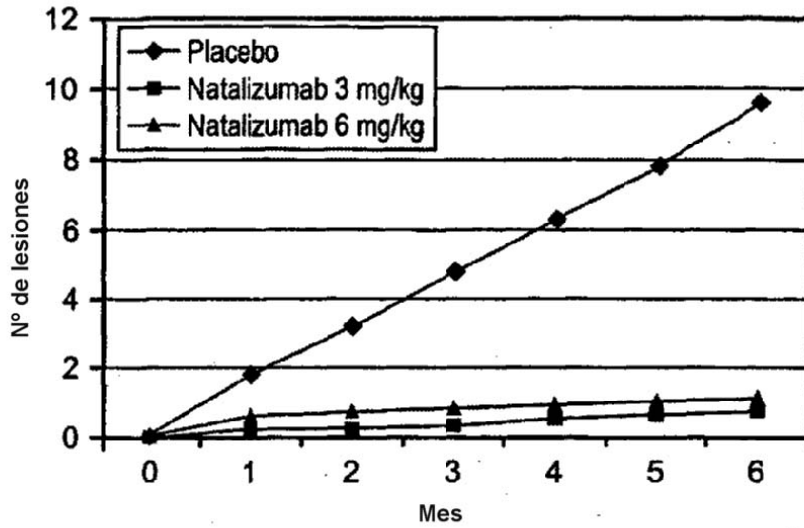


FIG. 1

Proporción de exploraciones de MRI con nuevas lesiones potenciadoras

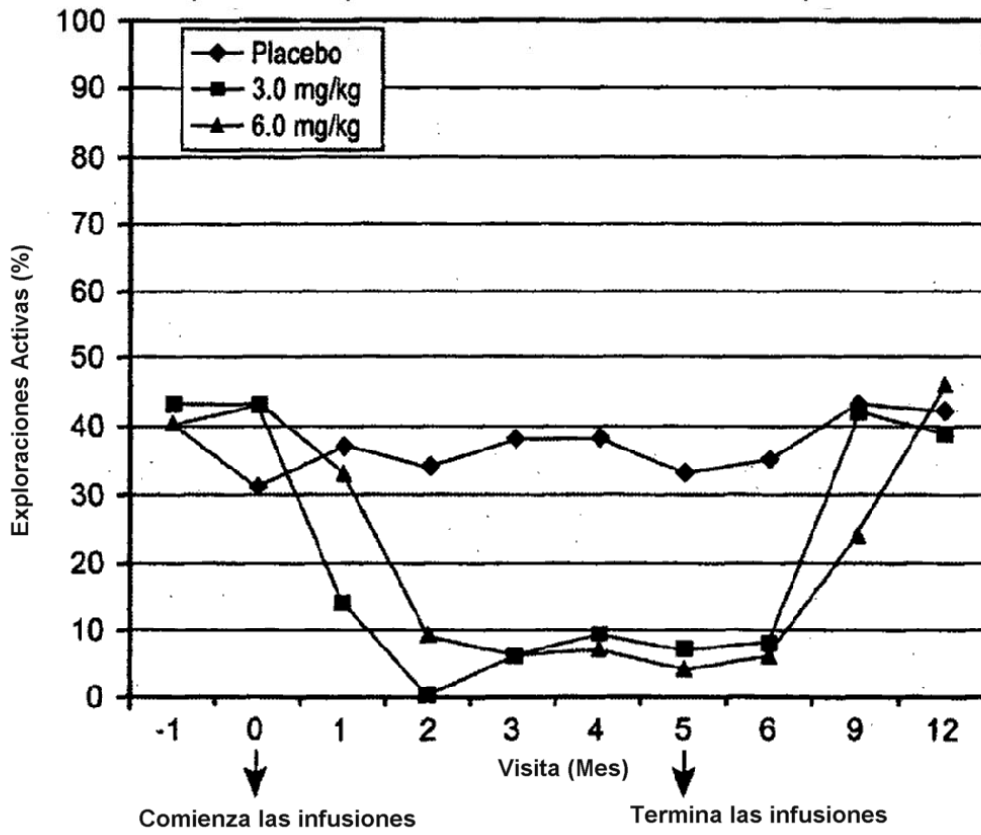


FIG. 2

**Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 3,0 mg/kg**

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

**FIG. 3A**

**Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 3,0 mg/kg**

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

**FIG. 3B**



**Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 3,0 mg/kg**

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

**FIG. 3C**

**Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 6,0 mg/kg**

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

**FIG. 4A**

**Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 6,0 mg/kg**

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

**FIG. 4B**

**Sumario de Concentraciones de Natalizumab en Suero para Natalizumab 6,0 mg/kg**

Paciente	Semana 21	Semana 22	Semana 23	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 12
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
03	43,2	17,2	15,5	10,1	1,3	<0,13	<0,13	ND	ND
04	59,1	38,6	25,1	19,3	3,4	0,2	<0,13	ND	ND
05	46,0	29,3	21,3	24,8	6,5	0,3	0,2	ND	ND
06	78,9	42,9	25,1	17,4	2,9	<0,13	<0,13	ND	ND
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08	50,1	26,0	24,7	21,2	ND	0,7	<0,13	<0,13	ND
09	32,2	30,2	16,6	9,3	1,1	<0,13	<0,13	ND	ND
10	50,7	34,3	17,0	13,1	2,1	<0,13	<0,13	<0,13	ND
11	34,0	30,0	23,7	22,5	4,6	ND	ND	ND	ND
12	NO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	48,1	31,9	19,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	44,8	32,3	15,5	13,6	2,6	ND	ND	ND	ND
N	10	10	10	9	8	7	7	2	0
Media	48,7	31,3	20,4	16,8	3,1	0,2	0,0	0,0	0,0
DT	13,20	6,93	4,08	5,56	1,79	0,26	0,08	0,00	0,00

**FIG. 4C**

**Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM**

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)		
Mes 0	Pre-infusión	N	14	13	14		
		Media	9,82	8,06	7,56		
		DT	5,331	2,192	3,135		
		Mediana	8,3	7,7	6,7		
		Mínimo	4,7	5,9	3,1		
Mes 0	2-horas después de la infusión	Máximo	24,9	14,4	13,3		
		N	14	14	14		
		Media	8,21	99,11	100,97		
		DT	3,567	10,557	4,884		
		Mediana	7,5	102,4	102,1		
		Mínimo	5,2	74,9	93,2		
		Máximo	18,6	110,8	110,7		
					Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
		Mes 0	24-horas después de la infusión	N	12	12	13
				Media	9,30	99,09	98,93
DT	7,328			9,052	12,079		
Mediana	6,7			99,9	97,4		
Mínimo	5,6			81,5	81,2		
Semana 1		Máximo	31,9	109,4	117,5		
		N	14	14	14		
		Media	7,92	93,41	99,61		
		DT	2,579	5,656	12,011		
		Mediana	8,3	94,3	94,9		
		Mínimo	3,5	82,8	83,5		
		Máximo	13,3	100,9	120,8		

**FIG. 5A**

**Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM**

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

**FIG. 5B**

**Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM**

Vísita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 3		N	12	14	12
		Media	6,97	79,47	83,32
		DT	2,720	23,459	18,333
		Mediana	6,5	81,6	88,9
		Mínimo	3,3	8,9	29,2
		Máximo	11,4	104,5	96,3
Mes 4		N	10	14	11
		Media	8,38	77,81	95,51
		DT	3,400	25,375	15,794
		Mediana	7,1	76,0	93,6
		Mínimo	4,9	7,9	78,3
		Máximo	16,9	117,4	139,0

Vísita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 5	Pre-infusión	N	9	13	11
		Media	9,48	70,88	91,94
		DT	2,606	26,535	10,720
		Mediana	9,1	75,1	94,8
		Mínimo	6,1	9,0	75,4
		Máximo	15,6	115,0	106,9
Mes 5	2-Horas después de la infusión	N	9	11	10
		Media	11,03	92,09	99,19
		DT	6,203	8,267	10,200
		Mediana	7,6	95,0	97,4
		Mínimo	4,9	79,7	82,5
		Máximo	21,7	103,4	114,6

**FIG. 5C**

Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM

Visita	Tiempo de toma de muestras 24-Horas después de la infusión	Estadística	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)		Antegren 6,0 mg/kg (n=74)	
			Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Placebo (n=71)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 5		N	8	12	10	10
		Media	7,50	92,04	89,08	89,08
		DT	2,660	15,256	32,364	32,364
		Mediana	6,4	94,6	95,9	95,9
		Mínimo	4,7	49,5	4,8	4,8
		Máximo	12,8	106,4	123,2	123,2
Semana 21		N	8	12	11	11
		Media	8,06	80,25	92,27	92,27
		DT	2,217	24,078	11,557	11,557
		Mediana	8,2	86,2	88,9	88,9
		Mínimo	4,3	5,1	77,3	77,3
		Máximo	11,7	94,6	112,9	112,9
Visita		Estadística	Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Placebo (n=71)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Semana 22		N	7	12	10	10
		Media	8,67	84,98	90,44	90,44
		DT	2,471	25,744	18,174	18,174
		Mediana	8,7	90,5	81,6	81,6
		Mínimo	5,1	6,2	73,5	73,5
		Máximo	12,0	101,7	127,8	127,8
Semana 23		N	7	10	10	10
		Media	9,16	82,89	97,24	97,24
		DT	2,950	27,649	23,374	23,374
		Mediana	8,7	90,2	90,9	90,9
		Mínimo	4,6	6,1	78,8	78,8
		Máximo	14,0	100,5	154,8	154,8

FIG. 5D



**Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM**

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Placebo (n=71)		Antegren 3,0 mg/kg (n=68)		Antegren 6,0 mg/kg (n=74)	
			N	Media	N	Media	N	Media
Mes 6		N	10	13	9			
		Media	8,65	67,32	80,59			
		DT	3,574	29,838	27,738			
		Mediana	8,2	80,2	85,4			
		Mínimo	4,4	6,4	10,0			
		Máximo	16,7	102,5	106,2			
Mes 7		N	10	12	8			
		Media	7,69	42,10	80,46			
		DT	1,281	24,011	27,664			
		Mediana	7,7	41,1	67,2			
		Mínimo	5,1	4,7	62,5			
		Máximo	10,4	88,0	145,2			
Mes 8		N	10	13	8			
		Media	7,60	14,09	34,16			
		DT	1,726	10,214	21,619			
		Mediana	6,9	12,1	29,6			
		Mínimo	6,0	6,2	11,8			
		Máximo	10,7	45,0	59,6			
Mes 9		N	5	7	7			
		Media	9,52	5,88	9,45			
		DT	2,701	2,246	4,644			
		Mediana	9,0	5,6	7,7			
		Mínimo	6,3	3,7	5,5			
		Máximo	13,5	10,4	18,0			

**FIG. 5E**

**Niveles de Saturación del receptor mantenidos en el estudio de EM**

Visita	Tiempo de toma de muestras	Estadística	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)		Antegren 6,0 mg/kg (n=74)	
			Placebo (n=71)	Antegren 3,0 mg/kg (n=68)	Placebo (n=71)	Antegren 6,0 mg/kg (n=74)
Mes 10		N	2	3	4	
		Media	7,78	8,65	9,17	
		DT	2,029	0,635	1,655	
		Mediana	7,8	8,6	9,3	
		Mínimo	6,3	8,0	7,1	
		Máximo	9,2	9,3	11,0	
		N	1	1	1	
		Media	8,80	6,04	6,61	
		DT				
		Mediana	8,8	6,0	6,6	
Mes 12		Mínimo	8,8	6,0	6,6	
		Máximo	8,8	6,0	6,6	
Visita Terminación temprana		N	0	1	1	
		Media		94,51	32,29	
		DT				
		Mediana		94,5	32,3	
		Mínimo		94,5	32,3	
		Máximo		94,5	32,3	

**FIG. 5F**