

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 708**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2000 E 09012818 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2140881**

54 Título: **Métodos de tratamiento de la lesión isquémica o hemorrágica del sistema nervioso central mediante el uso de antagonistas anti-integrina alfa4**

30 Prioridad:

16.12.1999 US 171265 P

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

26.07.2013

73 Titular/es:

**BIAGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US**

72 Inventor/es:

**RELTON, JANE;
LOBB, ROY;
WHALLEY, ERIC y
ADAMS, STEVEN P.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 415 708 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

Métodos de tratamiento de la lesión isquémica o hemorrágica del sistema nervioso central mediante el uso de antagonistas anti-integrina alfa4

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere en general al tratamiento de la lesión aguda del Sistema Nervioso Central (SNC). En particular, la invención se refiere al uso de antagonistas de integrinas $\alpha 4$ para tratar la lesión isquémica del SNC que se produce por un traumatismo craneoencefálico o ictus. El antagonista de integrina $\alpha 4$ elegido es un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo, y se puede usar como el único agente terapéutico o en combinación con otros agentes farmacológicos.

10 Antecedentes de la Invención

15 Las lesiones agudas del sistema nervioso central ("SNC") abarcan una amplia diversidad de lesiones médicas y traumáticas del cerebro y la médula espinal. Por ejemplo, el ictus es la tercera causa principal de muerte en el mundo desarrollado, y se da un ictus aproximadamente cada minuto en los Estados Unidos. La tasa de mortalidad es de alrededor del 30%, pero más de 4 millones de supervivientes de ictus están vivos hoy en día, y a la mayoría de estos individuos les quedan grados variables de discapacidad. Los ensayos clínicos todavía tienen que demostrar una neuroprotección terapéutica en el ictus isquémico (es decir, el ictus relacionado con la interrupción del flujo sanguíneo debida a la formación de coágulos/trombos) y la médula espinal. La terapia trombolítica (definida como el uso de un agente que provoca la disolución o la destrucción de un trombo) tiene muchas limitaciones, pero sigue siendo la única forma aprobada de tratamiento para el ictus isquémico agudo. Las estrategias actuales que se están ensayando en la clínica para inhibir la lesión cerebral isquémica se dirigen a los mecanismos excitotóxicos, el daño neuronal asociado al óxido nítrico, y el daño de la membrana celular neuronal asociado a isquemia. Las estrategias de investigación preclínica también se están dirigiendo a los mecanismos anti-apoptóticos y anti-inflamatorios.

25 Las respuestas patofisiológicas al traumatismo craneoencefálico o TCE (p.ej., traumatismo cerebral producido, entre otras causas, por accidentes o heridas en la cabeza) son similares en muchos aspectos a las del ictus, y se están adoptando aproximaciones similares para desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento del TCE. Se puede determinar si un ictus está provocado o no por mecanismos isquémicos o hemorrágicos mediante un TAC u otro procedimiento clínico, y el modo de tratamiento posterior dependerá de los resultados de este cribado.

30 La adhesión celular y el movimiento a través de la interfase vascular desempeñan un papel esencial en los procesos tanto fisiológicos como patofisiológicos de la lesión cerebral aguda. Son de interés particular en la patología de la lesión cerebral isquémica los leucocitos polimorfonucleares y las células T, que se han implicado en el desarrollo de la lesión cerebral después del ictus experimental (Garcia et al 1994, *Am. J. Pathol.* 144:188; Becker et al, 1997 *PNAS* 94:10873). Se piensa que la infiltración celular en el cerebro se produce después de la lesión cerebral, y puede contribuir a la evolución de la enfermedad. Así, también se puede producir una lesión cerebral secundaria (p.ej., transformación hemorrágica, vasoespasmo cerebral) a partir de una lesión cerebral aguda en un sujeto. La lesión de la médula espinal (LME), como el TCE, se da en una población sana y joven, pero comparte muchas similitudes patológicas con los cambios que se dan en el cerebro después de un ictus. A la luz de tales mecanismos comunes se están desarrollando aproximaciones terapéuticas similares a las del ictus y TCE para el tratamiento de la LME.

40 Las interacciones célula-célula o célula-matriz están mediadas por medio de varias familias de moléculas de adhesión celular, una de cuyas familias incluye las integrinas. Las integrinas son glicoproteínas relacionadas estructuralmente y funcionalmente que consisten en diversos dominios de receptores transmembrana heterodiméricos alfa (alfa 1, alfa 2, hasta alfa 11 en la actualidad) y beta (beta 1 y beta 7) hallados en diversas combinaciones en prácticamente todos los tipos de células de mamífero (para revisiones, véase: E. C. Butcher, *Cell*, 67, 1033 (1991); D. Cox et al., "The Pharmacology of the Integrins". *Medicinal Research Rev.* Vol. 195 (1994) y V. W. Engleman et al., "Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets" en *Ann. Revs. Medicinal Chemistry*, Vol. 31, J. A. Bristol, Ed.; Acad. Press, NY, 1996, pág. 191). Se han descrito dos integrinas que contienen subunidades alfa4, y se denominan alfa4beta1 (VLA-4) y alfa4beta7.

El documento US 5.260.210 A describe un modelo de barrera hematoencefálica diseñado para cribar reactivos útiles para prevenir o mejorar la inflamación cerebral.

50 Se ha descrito un tratamiento con anti-CD18 en la conservación de la función neurológica después de la isquemia del sistema nervioso central en Clark et al. (*Stroke* (1991), vol. 22, nº. 7, páginas 877-883).

Se ha descrito la prevención de la acumulación de leucocitos en el sistema nervioso central y el desarrollo de encefalomielitis autoinmunitaria en Yednock et al. (*Nature* (1992), vol. 356, páginas 63-66).

55 Los experimentos previos mostraron el aumento del contrarreceptor de alfa4beta1 y alfa4beta7, VCAM-1, en el cerebro después de la lesión isquémica, pero no se proporcionaron datos que demostrasen un papel funcional en la enfermedad (Jander et al, 1996, *J. Neuroimmunol.* 70: 75). VLA-4 y alfa4beta7 se expresan en leucocitos

mononucleares (véase Lobb y Adams. 1994; *J. Clin. Invest.* 94:1722).

Sería útil desarrollar métodos de miembros antagonizantes de la familia de integrinas en este contexto. Además, sería útil desarrollar una modalidad terapéutica para el ictus que sea eficaz tanto si la lesión es isquémica como si es hemorrágica.

5 Compendio de la Invención

Hasta la presente descripción, no se había definido el papel patológico de las integrinas que contienen la subunidad alfa4 en la lesión del SNC (p.ej., isquemia cerebral). La presente invención se refiere en parte al efecto protector de la inhibición de las integrinas que contienen la subunidad alfa4 en un modelo de rata de isquemia cerebral focal.

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

10 Se describen métodos para tratar la lesión del SNC, tal como ictus, mediante el uso de inhibidores de alfa4beta1 y/o alfa4beta7.

También se describe un método para tratar la lesión aguda del SNC en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende la administración de un antagonista de integrina que contiene una subunidad alfa4. También se describe un método que incluye además administrar un agente farmacológico al paciente. Preferiblemente, la lesión aguda del SNC es ictus, traumatismo craneoencefálico o lesión de la médula espinal. En ciertas realizaciones, el ictus es ictus isquémico o hemorrágico.

El agente farmacológico puede ser un agente trombolítico tal como activador tisular del plasminógeno o uroquinasa, o puede ser un agente neuroprotector o un agente anti-inflamatorio. En ciertos aspectos de la invención, el agente neuroprotector es un antagonista de un receptor, y el receptor se selecciona del grupo que consiste en: receptor de N-Metil-D-aspartato (NMDA), receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), receptor de glicina, receptor de canal de calcio, receptor de bradiquinina B2 y receptor de canal de sodio. En otros aspectos de la invención, el agente anti-inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en interleucina-1, y miembros de la familia del factor de necrosis tumoral. El agente neuroprotector puede ser también un agonista de un receptor, y el receptor se selecciona del grupo que consiste en: el receptor de bradiquinina B1, receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA) y receptor de adenosina A1.

La invención se refiere además a un método para tratar la lesión cerebral secundaria que se produce por una lesión isquémica en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende la administración de un inhibidor de una integrina que contiene una subunidad α 4.

El inhibidor de la integrina que contiene una subunidad α 4 según la invención es un anticuerpo anti-integrina α 4 o un fragmento de unión a integrina α 4 del mismo.

Se describe un método para tratar el ictus isquémico o hemorrágico mediante el uso de un inhibidor de las integrinas que contienen la subunidad alfa4, alfa4beta1 o alfa4beta7, solo o conjuntamente como agente terapéutico, o solo o conjuntamente en combinación con otros agentes terapéuticos.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para tratar el traumatismo craneoencefálico mediante el uso de un inhibidor de las integrinas que contienen la subunidad alfa4, alfa4beta1 o alfa4beta7, solo o conjuntamente como agente terapéutico, o solo o conjuntamente en combinación con otros agentes terapéuticos.

Se describe además un método para tratar la lesión de la médula espinal mediante el uso de un inhibidor de las integrinas que contienen la subunidad alfa4, alfa4beta1 o alfa4 beta7, solo o conjuntamente como agente terapéutico, o solo o conjuntamente en combinación con otros agentes terapéuticos.

Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar un método para tratar la lesión cerebral secundaria que se da como consecuencia de una lesión isquémica primaria (p.ej., transformación hemorrágica, vasoespasma cerebral) mediante el uso de un inhibidor de las integrinas que contienen la subunidad alfa4, alfa4beta1 o alfa4beta7, solo o conjuntamente como agente terapéutico, o solo o conjuntamente en combinación con otros agentes terapéuticos.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1A representa un gráfico del volumen de infarto (mm^3) en las regiones corticales y subcorticales de los cerebros de ratas Sprague Dawley después del tratamiento con hoe 140 (300 ng/kg/min) y vehículo de control.

La Figura 1B representa un gráfico del volumen de infarto (mm^3) en las regiones corticales y subcorticales de los cerebros de ratas espontáneamente hipertensas después del tratamiento con hoe 140 (300 ng/kg/min) y vehículo de control.

50 La figura 2A representa un gráfico del volumen de infarto (mm^3) en las regiones corticales y subcorticales de los cerebros de ratas Sprague Dawley después del tratamiento con anticuerpo anti-alfa4 de rata (TA-2, 2,5 mg/kg) y anticuerpo de control de isotipo.

La Figura 2B representa un gráfico del volumen de infarto (mm³) en las regiones corticales y subcorticales de los cerebros de ratas espontáneamente hipertensas después del tratamiento con anticuerpo anti-alfa4 de rata (TA-2, 2,5 mg/kg) y anticuerpo de control de isotipo.

Descripción Detallada de la Invención

5 I. Definiciones

Para señalar de forma más clara y concisa el objeto de la invención reivindicada, se proporcionan las siguientes definiciones para los términos específicos usados en la siguiente descripción escrita y en las reivindicaciones adjuntas.

10 La invención se describirá a continuación con referencia a la siguiente descripción detallada de la que se incluyen las siguientes definiciones:

15 La superfamilia de integrinas de antígenos muy tardíos (VLA) está constituida por glicoproteínas relacionadas estructuralmente y funcionalmente, que consisten en moléculas de receptores transmembrana heterodiméricas (alfa y beta) halladas en diversas combinaciones en prácticamente todos los tipos de células de mamífero. (para revisiones véase: E. C. Butcher, Cell, 67, 1033 (1991); D. Cox et al., "The Pharmacology of the Integrins". Medicinal Research Rev. (1994) y V. W. Engleman et al., "Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets." en Ann. Report in Medicinal Chemistry, Vol. 31, J. A. Bristol, Ed.; Acad. Press, NY, 1996, pág. 191). Las integrinas de la familia VLA incluyen (actualmente): VLA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9 y -11, en las que cada una de las moléculas comprende una cadena β 1 unida de forma no covalente a una cadena alfa (α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6 y similares), respectivamente.

20 La integrina alfa 4 beta 1 (α 1 β 1) es un receptor de la superficie celular para VCAM-1, fibronectina y posiblemente otros ligandos (estos últimos ligandos se denominan individual y colectivamente "ligando(s) de alfa4"). El término integrina α 4 β 1 ("VLA-4" ó "a4b1" ó "integrina a4b1", usados de forma intercambiable) se refiere así en la presente memoria a polipéptidos que son capaces de unirse a VCAM-1 y miembros de las proteínas de la matriz extracelular, más en particular fibronectina, u homólogos o fragmentos de los mismos, aunque los expertos en la técnica apreciarán que pueden existir otros ligandos para VLA-4 y se pueden analizar mediante el uso de métodos convencionales. Sin embargo, se sabe que la subunidad alfa4 se asociará con otras subunidades beta además de beta1, de manera que se puede definir el término "integrina alfa (I) 4" o "integrinas que contienen la subunidad alfa (I) 4" como aquellas integrinas cuya subunidad alfa4 se asocia con una u otra de las subunidades beta. Otro ejemplo de una integrina "alfa4", además de VLA4, es alfa4beta7 (Véase Lobb y Adams, anteriormente mencionados).

30 Un "antagonista" de integrina incluye cualquier compuesto que inhibe la unión de las integrinas que contienen la subunidad alfa4 con un ligando y/o receptor de integrina. Es útil un anticuerpo anti-integrina o las proteínas que contienen un homólogo de anticuerpo (tal como se discute más adelante), así como otras moléculas tales como formas solubles de las proteínas ligando para las integrinas. Las formas solubles de las proteínas ligando para las integrinas que contienen la subunidad alfa4 incluyen VCAM-1 soluble, proteínas de fusión de VCAM-1 o proteínas de fusión bifuncionales VCAM-1/Ig. Por ejemplo, se puede administrar una forma soluble de un ligando de integrina o un fragmento del mismo para que se una a la integrina y preferiblemente compita por un sitio de unión a integrina en las células, por lo que se producen efectos similares a la administración de antagonistas tales como anticuerpos anti-integrina (p.ej., VLA-4). En particular, se describen mutantes de integrinas solubles que se unen al ligando, pero que no inducen la señalización dependiente de integrina.

40 Tales mutantes de integrina pueden actuar como inhibidores competitivos de la proteína integrina de tipo natural, y se consideran "antagonistas". Otros antagonistas descritos son "moléculas pequeñas", tal como se define más adelante.

Los agonistas según la invención son anticuerpos anti-integrina α 4 o fragmentos de unión a integrina α 4 de los mismos.

45 También se describen métodos que usan moléculas que antagonizan la acción de más de una integrina que contiene la subunidad alfa4, tales como moléculas pequeñas u homólogos de anticuerpos que antagonizan tanto VLA-4 como alfa4beta7 u otras combinaciones de integrinas que contienen la subunidad alfa4. También se describen métodos que usan una combinación de moléculas de manera que la combinación antagoniza la acción de más de una integrina, y tales métodos usan varias moléculas pequeñas u homólogos de anticuerpos que en combinación antagonizan tanto VLA-4 como alfa4beta7 u otras combinaciones de integrinas que contienen subunidades alfa4.

50 Tal como se discute en la presente memoria, ciertos antagonistas de integrinas se pueden fusionar o conjugar de otra manera, por ejemplo, a un homólogo de anticuerpo tal como una inmunoglobulina o fragmento de la misma, y no se limitan a un tipo o estructura particular de una integrina o ligando u otra molécula. Así, para los fines de la invención, se considera que cualquier agente capaz de formar una proteína quimérica (tal como se define más adelante) y capaz de unirse a ligandos de integrina y que bloquee o recubra de forma eficaz la integrina VLA-4 (p.ej., VLA-4) es un equivalente de los antagonistas usados en los ejemplos de la presente memoria.

"Homólogo de anticuerpo" incluye los anticuerpos intactos que consisten en cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas unidas por medio de puentes disulfuro. El término "homólogo de anticuerpo" también pretende abarcar una proteína que comprende uno o más polipéptidos seleccionados de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, cadenas pesadas de inmunoglobulinas y fragmentos de unión a antígenos de las mismas que son capaces de unirse a uno o más antígenos (es decir, integrina o ligando de integrina). Los polipéptidos componentes de un homólogo de anticuerpo compuesto de más de un polipéptido pueden estar unidos opcionalmente por puentes disulfuro o entrecruzados de forma covalente de otra manera. Por lo tanto, en consecuencia, los "homólogos de anticuerpos" incluyen inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como los subtipos de las mismas), en las que las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas pueden ser de tipo kappa o lambda. Los "Homólogos de anticuerpo" también incluyen porciones de anticuerpos intactos que mantienen la especificidad de unión al antígeno, por ejemplo fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(v), monómeros o dímeros de cadenas pesadas y ligeras o mezclas de los mismos.

"Homólogo de anticuerpo humanizado" es un homólogo de anticuerpo producido mediante tecnología de ADN recombinante, en el que algunos o todos los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina humana que no son necesarios para la unión al antígeno se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina de un mamífero no humano. Un "homólogo de anticuerpo humano" es un homólogo de anticuerpo en el que todos los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (independientemente de si son necesarios o no para la unión al antígeno) proceden de una fuente humana.

Tal como se usa en la presente memoria, un "homólogo de anticuerpo humano" es un homólogo de anticuerpo producido mediante tecnología de ADN recombinante, en el que todos los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina derivan de una fuente humana.

Un "agonista" de integrina incluye cualquier compuesto que activa el ligando de integrina.

"Aminoácido" es una unidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína. Hay veinte aminoácidos que se encuentran en los péptidos, polipéptidos y proteínas naturales, y todos son isómeros L. El término también incluye los análogos de los aminoácidos e isómeros D de los aminoácidos de las proteínas y sus análogos.

"Acoplado covalentemente" significa que los restos especificados de la invención (p.ej., antagonista de integrina alfa4 PEGilado, fragmento de inmunoglobulina/antagonista de integrina alfa4) están unidos directamente de forma covalente entre sí, o están unidos indirectamente de forma covalente entre sí por medio de un resto o restos intermedios, tal como un resto o restos espaciadores. El resto o restos intermedios se denominan "grupo de acoplamiento". El término "conjugado" se usa de forma intercambiable con "acoplado covalentemente". A este respecto, un "espaciador" se refiere a un resto que se puede insertar entre un aminoácido u otro componente de un antagonista o fragmento de una integrina alfa4 y el resto de la molécula. Un espaciador puede proporcionar separación entre el aminoácido u otro componente y el resto de la molécula, de modo que impida que la modificación interfiera con la función de la proteína y/o haga más fácil que el aminoácido u otro componente se una con otro resto.

"Secuencia de control de la expresión" significa una secuencia polinucleotídica que controla y regula la expresión de genes cuando está unida de forma operable a esos genes.

"Vector de expresión" significa un polinucleótido, tal como un plásmido de ADN o un fago (entre otros ejemplos habituales) que permite la expresión de al menos un gen cuando el vector de expresión se introduce en una célula hospedadora. El vector puede, o no, ser capaz de replicarse en una célula.

Una "cantidad eficaz" de un agente de la invención es la cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia en la afección particular que se está tratando.

"Equivalente funcional" de un residuo de aminoácido es (i) un aminoácido que tiene propiedades reactivas similares al residuo de aminoácido que se sustituyó por el equivalente funcional; (ii) un aminoácido de un antagonista de la invención, y el aminoácido tiene propiedades similares al residuo de aminoácido que se sustituyó por el equivalente funcional; (iii) una molécula no aminoacídica que tiene propiedades similares al residuo de aminoácido que se sustituyó por el equivalente funcional.

Un primer polinucleótido que codifica un antagonista proteico de la invención es un "equivalente funcional" en comparación con un segundo polinucleótido que codifica la proteína antagonista si satisface al menos una de las siguientes condiciones:

(a) el "equivalente funcional" es un primer polinucleótido que hibrida con el segundo polinucleótido en condiciones de hibridación habituales y/o está degenerado respecto de la secuencia del primer polinucleótido. Lo más preferiblemente, codifica una proteína mutante que tiene la actividad de una proteína antagonista de integrina;

(b) el "equivalente funcional" es un primer polinucleótido que codifica tras la expresión una secuencia de aminoácidos codificada por el segundo polinucleótido.

Los antagonistas de integrina descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, los agentes enumerados en la presente memoria, así como sus equivalentes funcionales. Tal como se usa en la presente memoria, el término "equivalente funcional" se refiere por tanto a un antagonista de integrina o a un polinucleótido que codifica el antagonista de integrina que tiene el mismo efecto beneficioso o mejorado en el receptor que el antagonista de integrina del que se considera equivalente funcional. Como apreciará el experto en la técnica, se puede producir una proteína funcionalmente equivalente mediante métodos recombinantes, p.ej., expresando un "ADN funcionalmente equivalente". Por lo tanto, la presente invención abarca proteínas integrinas codificadas por ADNs naturales, así como por ADNs no naturales que codifican la misma proteína que codifica el ADN natural. Debido a la degeneración de las secuencias nucleotídicas codificantes, se pueden usar otros polinucleótidos para codificar la proteína integrina. Estos incluyen todas, o porciones, de las secuencias anteriores que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo residuo de aminoácido en la secuencia, por lo que se produce una sustitución silenciosa. Tales secuencias alteradas se consideran equivalentes de estas secuencias. Por ejemplo, Phe (F) está codificada por dos codones, TTC ó TTT, Tyr (Y) está codificada por TAC ó TAT, e His (H) está codificada por CAC ó CAT. Por otra parte, Trp (W) está codificado por un único codón, TGG. Por lo tanto, se apreciará que para una secuencia de ADN determinada que codifica una integrina particular habrá muchas secuencias degeneradas de ADN que la codificarán. Se considera que estas secuencias de ADN degeneradas se hallan dentro del alcance de esta invención.

El término "quimérico", cuando se refiere a un antagonista de la invención, significa que el antagonista está compuesto por una unión (entrecruzamiento químico o covalente o de otro tipo) de dos o más proteínas que tienen estructuras dispares y/o que tienen orígenes dispares. Así, un antagonista quimérico de una integrina alfa4 puede incluir un resto que es un antagonista o fragmento de integrina alfa4 y otro resto que no es un antagonista de integrina alfa4.

Una especie de proteína "quimérica" es una "fusión" o "proteína de fusión" que se refiere a la unión co-lineal, covalente de dos o más proteínas o fragmentos de las mismas por medio de sus esqueletos peptídicos individuales, lo más preferiblemente mediante expresión genética de una molécula polinucleotídica que codifica esas proteínas. Así, las proteínas de fusión preferidas son proteínas quiméricas que incluyen un antagonista de integrina alfa4 o fragmento unido de manera covalente a un segundo resto que no es un antagonista de integrina alfa4. Las proteínas de fusión preferidas de la invención pueden incluir porciones de anticuerpos intactos que mantienen la especificidad de unión al antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(v), monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, y similares.

Las proteínas de fusión más preferidas son quiméricas, y comprenden un resto antagonista de integrina fusionado o unido de otra manera a todo o parte de las regiones bisagra y constantes de una cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada o ambas. Así, esta invención describe una molécula que incluye: (1) un resto antagonista de integrina, (2) un segundo péptido, p.ej., uno que incrementa la solubilidad o la vida in vivo del resto antagonista de integrina, p.ej., un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas o fragmento o porción de la misma, p.ej., una porción o fragmento de IgG, p.ej., la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana, p.ej., CH2, CH3, y las regiones bisagra. De manera específica, una "fusión antagonista de integrina/Ig" es una proteína que comprende una molécula antagonista de integrina biológicamente activa de la invención (p.ej., un ligando de VLA-4 soluble, o un fragmento biológicamente activo del mismo unido al extremo N-terminal de una cadena de inmunoglobulina, en la que una porción del extremo N-terminal de la inmunoglobulina se sustituye por el antagonista de integrina. Una especie de fusión antagonista de integrina/Ig es una "fusión integrina/Fc", que es una proteína que comprende un antagonista de integrina de la invención unido a al menos una parte del dominio constante de una inmunoglobulina. Una fusión de Fc preferida comprende un antagonista de integrina de la invención unido a un fragmento de un anticuerpo que contiene el dominio C-terminal de las cadenas pesadas de inmunoglobulina.

El término "proteína de fusión" también significa un antagonista de integrina unido químicamente por medio de una molécula mono- o hetero-funcional a un segundo resto que no es un antagonista de integrina (lo que da como resultado una molécula "quimérica"), y se hace de novo a partir de una proteína purificada como se describe más adelante. Así, un ejemplo de una molécula quimérica químicamente unida, a diferencia de recombinantemente unida, que es una proteína de fusión puede comprender: (1) un resto de selección como objetivo de una subunidad de integrina alfa4 (p.ej., un resto VCAM-1 capaz de unirse a VLA-4) en la superficie de células que albergan VLA-4; (2) una segunda molécula que incrementa la solubilidad o la vida in vivo del resto de selección del objetivo, p.ej., un polímero de polialquilen glicol tal como polietilenglicol (PEG). El resto de selección del objetivo de alfa4 puede ser cualquier ligando natural de alfa4 o fragmento del mismo, p.ej. un péptido de VCAM-1 o una secuencia de aminoácidos similar sustituida de forma conservativa.

"Promotor heterólogo", tal como se usa en la presente memoria, es un promotor que no está asociado de forma natural a un gen o un ácido nucleico purificado.

"Homología", tal como se usa en la presente memoria, es sinónimo del término "identidad", y se refiere a la similitud de secuencias entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de

los dos polipéptidos está ocupado por una lisina), entonces las moléculas respectivas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias, dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes o son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas al 60%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten el 50% de homología (3 de las 6 posiciones totales coinciden). En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la homología máxima. Tal alineación se puede proporcionar mediante el uso, por ejemplo, del método de Needleman et al., *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970), implementado de manera conveniente mediante programas informáticos descritos con más detalle más adelante. Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácidos idénticos o similares, en los que los residuos similares son sustituciones conservativas para, o "mutaciones puntuales permitidas" de, los residuos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una "sustitución conservativa" de un residuo en una secuencia de referencia son aquellas sustituciones que son físicamente o funcionalmente similares a los residuos de referencia correspondientes, p.ej., que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, lo que incluye la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas especialmente preferidas son aquellas que cumplen los criterios definidos para una "mutación puntual aceptada" en Dayhoff et al., 5: Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: Supl. 3, capítulo 22: 354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D.C. (1978).

"Homología" e "identidad" se refieren cada una a la similitud de secuencias entre dos secuencias de polipéptidos, siendo la identidad una comparación más estricta. Se puede determinar la homología y la identidad comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear con el objetivo de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por el mismo residuo de aminoácido, los polipéptidos se pueden denominar idénticos en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo aminoácido (p.ej., idéntico) o un aminoácido similar (p.ej., similar en naturaleza estérica y/o eléctrica), las moléculas se pueden denominar homólogas en esa posición. El porcentaje de homología o identidad entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40 por ciento de identidad, aunque preferiblemente menos del 25 por ciento de identidad, con una secuencia AR de la presente invención.

Se pueden usar diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, que incluyen FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.) y se pueden usar, p.ej., con los ajustes por defecto. ENTREZ está disponible a través del National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. En una realización, se puede determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias mediante el programa GCG con un peso por hueco de 1, p.ej., cada hueco de aminoácido se considera como si fuera un emparejamiento incorrecto de un único aminoácido o nucleótido entre dos secuencias.

"Aislado" (usado de forma intercambiable con "sustancialmente puro"), cuando se aplica al ácido nucleico, es decir, secuencias polinucleotídicas que codifican antagonistas de integrinas, significa un polinucleótido de ADN o ARN, porción de un polinucleótido genómico, cADN o polinucleótido sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (i) no está asociado con la totalidad de un polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza (p.ej., está presente en una célula hospedadora como un vector de expresión o una porción del mismo); o (ii) está asociado a un ácido nucleico u otro resto químico diferente de aquel al que está asociado en la naturaleza; o (iii) no se da en la naturaleza. Mediante "aislado" se quiere decir además una secuencia polinucleotídica que: (i) se amplifica in vitro, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) se sintetiza químicamente; (iii) se produce de forma recombinante mediante clonación; o (iv) se purifica, como mediante escisión y separación en gel. Así, un "ácido nucleico sustancialmente puro" es un ácido nucleico que no está inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias codificantes con las que normalmente está contiguo en el genoma natural del organismo del que procede el ácido nucleico. El ADN sustancialmente puro incluye además un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica secuencias de integrinas adicionales.

"Aislado" (usado de forma intercambiable con "sustancialmente puro"), cuando se aplica a polipéptidos, significa un polipéptido o una porción del mismo que, en virtud de su origen o manipulación: (i) está presente en una célula hospedadora como producto de expresión de una porción de un vector de expresión; o (ii) está unido a una proteína u otro resto químico diferente de aquel al que está unido en la naturaleza; o (iii) no se produce en la naturaleza, por ejemplo, una proteína que se manipula químicamente agregando o añadiendo al menos un resto hidrófobo a la proteína de modo que la proteína esté en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Mediante "aislado" se quiere decir además una proteína que: (i) se sintetiza químicamente; o (ii) se expresa en una célula hospedadora y se purifica de las proteínas asociadas y contaminantes. El término significa en general un polipéptido que se ha separado de otras proteínas y ácidos nucleicos con los se da de forma natural. Preferiblemente, el polipéptido también se separa de sustancias tales como anticuerpos o matrices de geles (poliacrilamida) que se usan para purificarlo.

"Complejo proteico multivalente" se refiere a una diversidad de antagonistas de integrinas (es decir, uno o más). Se puede entrecruzar o unir un homólogo o fragmento de anticuerpo anti-integrina a otro homólogo o fragmento de anticuerpo. Cada proteína puede ser igual o diferente y cada homólogo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o

diferente.

"Mutante" significa cualquier cambio en el material genético de un organismo, en particular cualquier cambio (es decir, delección, sustitución, adición o alteración) en una secuencia polinucleotídica de tipo natural o cualquier cambio en una proteína de tipo natural. El término "mutante" se usa de forma intercambiable con "mutante".

- 5 "Unido de forma operable" significa que una secuencia polinucleotídica (ADN, ARN) está unida de forma operable a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y la traducción de esa secuencia polinucleotídica. El término "unido de forma operable" incluye tener una señal de iniciación adecuada (p.ej., ATG) delante de la secuencia polinucleotídica a expresar, y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia polinucleotídica bajo control de la secuencia de control de la expresión, y la producción del polipéptido deseado codificado por la secuencia polinucleotídica.

- 10 Un "agente farmacológico" se define como uno o más compuestos o moléculas u otras entidades químicas administradas a un sujeto (además de los antagonistas de la invención) que afecta a la acción del antagonista. El término "agente farmacológico", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a tal(es) agente(s) que se administra(n) durante una "terapia de combinación" en la que el antagonista de la invención se administra antes, después o de manera simultánea con la administración de uno o más agentes farmacológicos.

- 15 "Proteína" significa cualquier polímero que consiste esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos. Aunque "polipéptido" se usa a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se usa a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y varía. El término "proteína", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a péptidos, proteínas y polipéptidos, a menos que se indique de otra manera.

- 20 Los términos "péptido(s)", "proteína(s)" y "polipéptido(s)" se usan en la presente memoria de forma intercambiable. Los términos "secuencia polinucleotídica" y "secuencia nucleotídica" también se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

- 25 "Recombinante", tal como se usa en la presente memoria, significa que una proteína deriva de sistemas de expresión de mamífero recombinantes. Debido a que la integrina no está glicosilada ni contiene puentes disulfuro, se puede expresar en la mayoría de los sistemas de expresión procariotas y eucariotas.

"Molécula pequeña" tiene la misma definición que en la Sección A2.

La frase "aminoácido superficial" significa cualquier aminoácido que está expuesto al disolvente cuando una proteína se pliega en su forma nativa.

- 30 "Condiciones de hibridación habituales" significa unas condiciones salinas y de temperatura sustancialmente equivalentes a SSC 0,5X hasta alrededor de SSC 5X y 65 °C tanto para la hibridación como para el lavado. El término "condiciones de hibridación habituales", tal como se usa en la presente memoria, es por lo tanto una definición operativa, y abarca un intervalo de condiciones de hibridación. Las condiciones más rigurosas, por ejemplo, pueden incluir hibridar con tampón de cribado en placa (polivinilpirrolidona al 0,2%, Ficoll 400 al 0,2%; albúmina de suero bovino al 0,2%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 1 M; pirofosfato sódico al 0,1%; SDS al 1%); sulfato de dextrano al 10% y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonificado a 65 °C durante 12-20 horas, y lavar con NaCl 75 mM/citrato sódico 7,5 mM (SSC 0,5X)/SDS al 1% a 65 °C. Las condiciones menos rigurosas, por ejemplo, pueden incluir hibridar con tampón de cribado en placa, sulfato de dextrano al 10% y 110 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonificado a 55 °C durante 12-20 horas, y lavar con NaCl 300 mM/citrato sódico 30 mM (SSC 2,0X)/SDS al 1% a 55 °C. Véase también Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, Secciones 6.3.1-6.3.6, (1989).

Una "composición terapéutica", tal como se usa en la presente memoria, se define por comprender los antagonistas de la invención y otros ingredientes biológicamente compatibles. La composición terapéutica puede contener excipientes tales como agua, minerales y vehículos tales como proteínas.

- 45 Se dice que un antagonista de la invención (y su composición terapéutica) tienen "eficacia terapéutica", y se dice que una cantidad del agente es "terapéuticamente eficaz" si la administración de esa cantidad del agente es suficiente para producir una mejora clínicamente significativa en la recuperación neurológica en un ensayo neurológico estándar (Sección IV) cuando se administra a un sujeto (p.ej., un modelo animal o un paciente humano) tras una lesión cerebral (p.ej., isquemia cerebral o ictus).

- 50 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, química de proteínas, farmacología e inmunología, que se hallan dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía.

II. Descripción de las Realizaciones preferidas

General

Se ha descubierto que la inhibición de las integrinas $\alpha 4$, $\alpha 4\beta 1$ y/o $\alpha 4\beta 7$ protege al cerebro de la lesión inducida por una agresión aguda. Mediante el uso de un modelo de rata de ictus producido por la oclusión temporal de la arteria cerebral media, se demostró que se producía una reducción significativa del infarto cerebral tras el tratamiento con un antagonista de integrina alfa 4. La importancia de los modelos animales de ictus ha sido revisada por Hunter et al (1996) *Trends in Pharmacological Sciences* 6:123. El modelo de rata de oclusión reversible de la arteria cerebral media tanto en ratas Sprague Dawley (SD) como en ratas espontáneamente hipertensas (SHRs) se considera en términos generales como el más relevante clínicamente de los modelos de ictus en roedores. (Hunter et al (1996) *Trends in Pharmacological Sciences* 6:123).

A. Antagonistas de Integrina

Para los fines de la invención, se puede describir un antagonista de integrina como un antagonista de cualquier interacción entre una integrina y su ligando o receptor afín, de modo que se altera la función normal inducida por las interacciones ligando-receptor (es decir, se previene o ralentiza o se modifica de otra manera). Una realización preferida de un antagonista de integrina es un antagonista de las interacciones de integrinas alfa4 con sus ligandos, tal como la interacción VCAM-1/VLA-4. Este es un agente, p.ej., un polipéptido u otra molécula, que puede inhibir o bloquear la unión mediada por VCAM-1 y/o VLA-4 o que puede modular de otra manera la función de VCAM-1 y/o VLA-4, p.ej., inhibiendo o bloqueando la transducción de señales de VLA-4 mediada por el ligando de VLA-4 o la transducción de señales de VCAM-1 mediada por el ligando de VCAM-1, y que es eficaz en el tratamiento de la lesión cerebral aguda, preferiblemente de la misma manera que lo son los anticuerpos anti-VLA-4.

Un antagonista de la interacción VCAM-1/ VLA-4 es un agente que tiene una o más de las siguientes propiedades: (1) recubre o se une a VLA-4 en la superficie de una célula que alberga VLA-4 (p.ej., una célula endotelial) con una especificidad suficiente para inhibir una interacción ligando de VLA-4/VLA-4, p.ej., la interacción VCAM-1/VLA-4; (2) recubre o se une a VLA-4 en la superficie de una célula que alberga VLA-4 (es decir, un linfocito) con una especificidad suficiente para modificar, y preferiblemente para inhibir, la transducción de una señal mediada por VLA-4, p.ej., la señalización mediada por VLA-4/VCAM-1; (3) recubre o se une a un ligando de VLA-4 (p.ej., VCAM-1) en células endoteliales con una especificidad suficiente para inhibir la interacción VLA-4/VCAM-1; (4) recubre o se une a un ligando de VLA-4 (p.ej., VCAM-1) con una especificidad suficiente para modificar, y preferiblemente para inhibir, la transducción de la señalización de VLA-4 mediada por ligando de VLA-4, p.ej., la señalización de VLA-4 mediada por VCAM-1. En las realizaciones preferidas, el antagonista tiene una o ambas de las propiedades 1 y 2. En otras realizaciones preferidas, el antagonista tiene una o ambas de las propiedades 3 y 4. Además, se puede administrar más de un antagonista a un paciente, p.ej., se puede combinar un agente que se une a VLA-4 con un agente que se une a VCAM-1.

Tal como se discute en la presente memoria, los antagonistas descritos no se limitan a un tipo o estructura particular de molécula de modo que, para los fines de la invención, cualquier agente capaz de unirse a integrinas alfa4 (p.ej., VLA-4) en la superficie de células o a un ligando de alfa4, tal como VCAM-1 en la superficie de células que albergan un ligando de alfa4, y que bloquea o recubre de forma eficaz una integrina alfa 4 (p.ej., VLA-4) o un ligando de alfa4 (p.ej., VCAM-1), denominado "agente de unión a integrina alfa4" y "agente de unión a un ligando de integrina alfa4", respectivamente, se considera que es un equivalente de los antagonistas usados en los ejemplos en la presente memoria.

Por ejemplo, son útiles los anticuerpos u homólogos de anticuerpos (discutidos más adelante) así como las formas solubles de las proteínas de unión naturales para VLA-4 y VCAM-1. Las formas solubles de las proteínas de unión naturales para VLA-4 incluyen péptidos solubles de VCAM-1, proteínas de fusión de VCAM-1, proteínas de fusión bifuncionales VCAM-1/Ig (p.ej., moléculas "quiméricas", discutidas anteriormente), fibronectina, fibronectina con un segmento de conexión que no es de tipo III con corte y empalme alternativo, y péptidos de fibronectina que contienen la secuencia de aminoácidos EILDV o una secuencia de aminoácidos similar sustituida de forma conservativa. Las formas solubles de las proteínas de unión naturales para VCAM-1 incluyen péptidos de VLA-4 solubles, proteínas de fusión de VLA-4, proteínas de fusión bifuncionales VLA-4/Ig, y similares. Tal como se usa en la presente memoria, un "péptido de VLA-4 soluble" o un "péptido de VCAM-1 soluble" es un polipéptido de VLA-4 o VCAM-1 incapaz de anclarse en una membrana. Tales polipéptidos solubles incluyen, por ejemplo, polipéptidos de VLA-4 y VCAM que carecen de una porción suficiente del dominio que atraviesa la membrana para anclar el polipéptido, o que están modificados de modo que el dominio que atraviesa la membrana no es funcional. Estos agentes de unión pueden actuar compitiendo con la proteína de unión a la superficie celular para VLA-4 o alterando de otra manera la función de VLA-4. Por ejemplo, se puede administrar una forma soluble de VCAM-1 (véase, p.ej, Osborn et al. 1989, *Cell*, 59: 1203-1211) o un fragmento del mismo para unirse a VLA-4, y preferiblemente competir por un sitio de unión a VLA-4 en células que albergan VCAM-1, por lo que se producen efectos similares a la administración de antagonistas tales como moléculas pequeñas o anticuerpos anti-VLA-4.

1. Homólogos de Anticuerpos Anti-Integrina

En otras realizaciones preferidas, los antagonistas usados en el método de la invención para unirse, lo que incluye bloquear o recubrir, a una integrina alfa4 de la superficie celular (tal como VLA-4 o alfa4beta7) y/o ligando de la superficie celular para una integrina alfa 4 (tal como VCAM-1) es un anticuerpo monoclonal anti-VLA-4 y/o anti-VCAM-1 o un homólogo de anticuerpo, como se definió previamente. Los anticuerpos y homólogos preferidos para el tratamiento, en particular para el tratamiento de seres humanos, incluyen homólogos de anticuerpos humanos, homólogos de anticuerpos humanizados, homólogos de anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), y monómeros o dímeros de cadenas ligeras o pesadas de anticuerpos o mezclas de los mismos. Los anticuerpos monoclonales hacia VLA-4 son un agente de unión preferido en el método de la invención.

2. Antagonistas de Integrina de Molécula Pequeña

El término antagonista de integrina de "molécula pequeña" se refiere a agentes químicos (es decir, moléculas orgánicas) capaces de romper la interacción integrina/ligando de integrina, por ejemplo, bloqueando las interacciones VLA-4/VCAM mediante la unión a VLA-4 en la superficie de las células o mediante la unión a VCAM-1 en la superficie de las células. Tales moléculas pequeñas también se pueden unir a los receptores de VLA-4 y VCAM-1 respectivos. Los inhibidores de molécula pequeña de VLA-4 y VCAM-1 pueden ser ellos mismos péptidos, compuestos semipeptídicos o compuestos no peptídicos, tales como moléculas orgánicas pequeñas que son antagonistas de la interacción VCAM-1/VLA-4. Una "molécula pequeña", tal como se define en la presente memoria, no pretende abarcar un anticuerpo u homólogo de anticuerpo. El peso molecular de las moléculas pequeñas ejemplares es en general menor de 1000.

Por ejemplo, se pueden emplear moléculas pequeñas tales como oligosacáridos que imitan el dominio de unión de un ligando de VLA-4 y se ajustan al dominio receptor de VLA-4. (Véase, J.J. Devlin et al., 1990, Science 249: 400-406 (1990), J.K. Scott y G.P. Smith. 1990, Science 249: 386-390, y la patente de EE.UU. 4.833.092 (Geysen)).

A la inversa, se pueden emplear moléculas pequeñas que imitan el dominio de unión de un ligando de VCAM-1 y se ajustan al dominio receptor de VCAM-1.

Se pueden encontrar ejemplos de otras moléculas pequeñas en Komoriya et al. ("The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-Specific Adhesion Site (CS1) Within the Alternatively Spliced Type III Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine", J. Biol. Chem., 266 (23), págs. 15075-79 (1991)). Se identificó la secuencia de aminoácidos mínima activa necesaria para unirse a VLA-4 y se sintetizó una diversidad de péptidos solapantes basados en la secuencia de aminoácidos de la región CS-1 (el dominio de unión a VLA-4) de una especie particular de fibronectina. Se identificó un péptido de 8 aminoácidos, Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr, así como dos pentapéptidos solapantes más pequeños, Glu-Ile-Leu-Asp-Val y Leu-Asp-Val-Pro-Ser, que poseían actividad inhibitoria hacia la adhesión celular dependiente de fibronectina. Posteriormente se demostró que ciertos péptidos más largos que contenían la secuencia LDV eran activos in vivo (T. A. Ferguson et al., "Two Integrin Binding peptides Abrogate T-cell-Mediated Immune Responses In Vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, págs. 8072-76 (1991); y S. M. Wahl et al., "Synthetic Fibronectin Peptides Suppress Arthritis in Rats by Interrupting Leukocyte Adhesion and Recruitment", J. Clin. Invest., 94, págs. 655-62 (1994)). También se ha descrito un pentapéptido cíclico, Arg-Cys-Asp-TPro-Cys (en el que TPro representa 4-tioprolina), que puede inhibir la adhesión tanto de VLA-4 como de VLA-5 a fibronectina. (Véase, p.ej., D.M. Nowlin et al. "A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits Alpha4Beta1 Integrin-mediated Cell Adhesion", J. Biol. Chem., 268(27), págs. 20352-59 (1993); y la publicación PCT/US91/04862). Este pentapéptido se basó en la secuencia del tripéptido Arg-Gly-Asp de fibronectina que se había conocido como un motivo común en el sitio de reconocimiento de varias proteínas de la matriz extracelular. Se han descrito ejemplos de otros inhibidores de VLA-4, por ejemplo, en Adams et al. "Cell Adhesion Inhibitors", documento PCT US97/13013, que describe compuestos peptidílicos lineales que contienen beta-aminoácidos que tienen actividad inhibitoria de la adhesión celular. Las solicitudes de patente internacionales WO 94/15958 y WO 92/00995 describen péptidos cíclicos y compuestos peptidomiméticos con actividad inhibitoria de la adhesión celular. Las solicitudes de patente internacionales WO 93/08823 y WO 92/08464 describen compuestos inhibidores de la adhesión celular que contienen guanidinilo, urea y tiourea. La patente de Estados Unidos N° 5.260.277 describe compuestos para la modulación de la adhesión celular de guanidinilo. Se han descrito otros antagonistas peptidílicos de VLA-4 en D. Y. Jackson et al., "Potent α 4 β 1 peptide antagonist as potential anti-inflammatory agents", J. Med. Chem., 40:3359 (1997); H. Shroff et al., "Small peptide inhibitors of α 4 β 7 mediated MadCAM-1 adhesion to lymphocytes", Bio. Med. Chem. Lett., 1 2495 (1996); patente de EE.UU. 5.510.332, publicaciones PCT WO98/53814, WO97/03094, WO97/02289, WO96/40781, WO96/22966, WO96/20216, WO96/01644, WO96/06108, y WO95/15973, y otras.

Se pueden producir tales agentes de molécula pequeña sintetizando una diversidad de péptidos (p.ej., 5 a 20 aminoácidos de longitud), compuestos semipeptídicos, compuestos orgánicos no peptídicos, y después cribando la capacidad de esos compuestos en la interacción VLA-4/VCAM. Véase en general la patente de EE.UU. N° 4.833.092, Scott y Smith, "Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library", Science, 249, págs. 386-90 (1990), y Devlin et al., "Random Peptide Libraries: A Source of Specific Protein Binding Molecules", Science, 249, págs. 40407 (1990).

B. Métodos para Producir Homólogos de Anticuerpos Anti-Integrina

Los antagonistas de integrina preferidos contemplados en la presente memoria se pueden expresar a partir de ADN genómico o cADN intacto o truncado o de ADNs sintéticos en células hospedadoras procariotas o eucariotas. Las proteínas dimericas se pueden aislar del medio de cultivo y/o replegar y dimerizar in vitro para formar composiciones biológicamente activas. Se pueden formar los heterodímeros in vitro combinando cadenas de polipéptidos distintas, separadas. De manera alternativa, se pueden formar los heterodímeros en una única célula co-expresando ácidos nucleicos que codifican cadenas de polipéptidos distintas, separadas. Véase, por ejemplo, el documento WO93/09229, o la Pat. de EE.UU. N° 5.411.941, para varios protocolos de producción de proteínas heterodiméricas recombinantes ejemplares. Actualmente, las células hospedadoras preferidas incluyen, sin limitación, procariotas que incluyen *E. coli*, o eucariotas que incluyen levaduras, *Saccharomyces*, células de insecto o células de mamífero, tales como células CHO, COS o BSC. Alguien de experiencia habitual en la técnica apreciará que se pueden usar otras células hospedadoras de manera ventajosa. Las descripciones detalladas de las proteínas útiles en la práctica de esta invención, lo que incluye cómo producirlas, usarlas y ensayar su actividad condrogénica, se describen en numerosas publicaciones, que incluyen las Pat. de EE.UU. N°s 5.266.683 y 5.011.691.

Se conoce bien la tecnología para producir homólogos de anticuerpos monoclonales. Brevemente, se fusiona una línea celular inmortal (generalmente células de mieloma) con linfocitos (generalmente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con células enteras que expresan un antígeno determinado, p.ej., VLA-4, y se criban los sobrenadantes de los cultivos de las células de hibridoma resultantes en busca de anticuerpos hacia el antígeno. Véase, en general, Kohler et al., 1975, *Nature*, 265: 295-297. La inmunización se puede llevar a cabo mediante el uso de procedimientos habituales. La dosis unitaria y el régimen de inmunización dependen de la especie de mamífero inmunizada, su estado inmunitario, el peso corporal del mamífero, etc. En general, a los mamíferos inmunizados se les extrae sangre y se ensaya el suero de cada muestra de sangre en busca de anticuerpos particulares mediante el uso de ensayos de cribado adecuados. Por ejemplo, se pueden identificar anticuerpos anti-VLA-4 mediante inmunoprecipitación de lisados celulares marcados con 125I de células que expresan VLA-4. (Véase, Sanchez-Madrid et al. 1986. *Eur. J. Immunol.*, 16: 1343-1349 y Hemler et al. 1987, *J. Biol. Chem.*, 262, 11478-11485). También se pueden identificar los anticuerpos anti-VLA-4 mediante citometría de flujo, p.ej., midiendo la tinción fluorescente de células Ramos incubadas con un anticuerpo que se cree que reconoce VLA-4 (véase, Elices et al., 1990 *Cell*, 60: 577-584). Los linfocitos usados en la producción de células de hibridoma se aíslan generalmente de mamíferos inmunizados cuyos sueros ya han dado positivo para la presencia de anticuerpos anti-VLA-4 usando tales ensayos de cribado.

En general, la línea celular inmortal (p.ej., una línea celular de mieloma) procede de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). En general, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón mediante el uso de polietilenglicol de peso molecular 1500 ("PEG 1500"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan después usando medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de manera improductiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no están transformados). Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado se detectan mediante cribado de los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma. Por ejemplo, los hibridomas preparados para producir anticuerpos anti-VLA-4 se pueden cribar ensayando el sobrenadante del cultivo de hibridoma en busca de anticuerpos secretados que tienen la capacidad de unirse a una línea celular que expresa la subunidad alfa4 recombinante (véase, Elices et al., anteriormente mencionado).

Para producir homólogos de anticuerpo anti-VLA-4 que son inmunoglobulinas intactas, se cultivaron las células de hibridoma que dieron positivas en tales ensayos de cribado en un medio nutritivo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que las células de hibridoma secretasen los anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo. Se conocen bien las técnicas de cultivo de tejidos y los medios de cultivo adecuados para las células de hibridoma. Se puede recoger el sobrenadante del cultivo de hibridoma acondicionado, y opcionalmente los anticuerpos anti-VLA-4 se pueden purificar adicionalmente mediante métodos muy conocidos.

De manera alternativa, se puede producir el anticuerpo deseado inyectando las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón sin inmunizar. Las células de hibridoma proliferan en la cavidad peritoneal, secretando el anticuerpo que se acumula como líquido ascítico. El anticuerpo se puede recoger retirando el líquido ascítico de la cavidad peritoneal con una jeringa.

Se han descrito previamente varios anticuerpos monoclonales anti-VLA-4. Véase, p.ej., Sanchez-Madrid et al., 1986, anteriormente mencionado; Hemler et al., 1987, anteriormente mencionado; Pulido et al., 1991. *J. Biol. Chem.*, 266 (16), 10241-10245; Issekutz y Wykretowicz, 1991, *J. Immunol.*, 147: 109 (mab TA-2). Estos anticuerpos monoclonales anti-VLA-4 y otros anticuerpos anti-VLA-4 (p.ej., patente de EE.UU. 5.888.507 - Biogen, Inc. y las referencias citadas en ella) capaces de reconocer la cadena alfa y/o beta de VLA-4 serán útiles en los métodos de tratamiento según la presente invención. Se prefieren los anticuerpos anti-VLA-4 que reconocerán los epítomos de la cadena alfa4 de VLA-4 implicados en la unión a los ligandos VCAM-1 y fibronectina (es decir, los anticuerpos que se pueden unir a VLA-4 en un sitio implicado en el reconocimiento del ligando y que bloquean la unión de VCAM-1 y fibronectina). Tales anticuerpos se han definido como anticuerpos específicos de epítomo B (B1 o B2) (Pulido et al., 1991, anteriormente mencionado) y también son anticuerpos anti-VLA-4 según la presente invención.

Los homólogos de anticuerpos monoclonales completamente humanos hacia VLA-4 son otro agente de unión preferido que puede bloquear o recubrir los ligandos de VLA-4 en el método de la invención. En su forma intacta, se pueden preparar mediante el uso de esplenocitos humanos sensibilizados *in vitro*, como describió Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147, 86-95. De manera alternativa, se pueden preparar mediante clonación de un repertorio como describió Persson et al., 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 2432-2436 o Huang y Stollar, 1991, *J. Immunol. Methods* 141, 227-236. La patente de EE.UU. 5.798.230 (25 de agosto de 1998, "Process for the preparation of human monoclonal antibodies and their use") describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B humanas. Según este procedimiento, las células B humanas que producen el anticuerpo se immortalizan mediante infección con un virus de Epstein-Barr, o un derivado del mismo, que expresa el antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr (EBNA2). La función de EBNA2, que es necesaria para la immortalización, se inactiva posteriormente, lo que da como resultado un aumento de la producción del anticuerpo.

En otro método para producir anticuerpos completamente humanos, la patente de Estados Unidos 5.789.650 (4 de agosto de 1998, "Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies") describe animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos y animales transgénicos no humanos que tienen inactivados genes de inmunoglobulinas endógenas. Los genes de las inmunoglobulinas endógenas se eliminan mediante polinucleótidos antisentido y/o mediante antisuero dirigido hacia las inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos heterólogos están codificados por genes de inmunoglobulinas que normalmente no se hallan en el genoma de esa especie de animal no humano. Se introducen uno o más transgenes que contienen secuencias de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas humanas heterólogas sin reordenar en un animal no humano, por lo que se forma un animal transgénico capaz de reordenar funcionalmente las secuencias transgénicas de inmunoglobulinas y de producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulinas humanas. Tales anticuerpos heterólogos humanos se producen en células B que posteriormente se immortalizan, p.ej., fusionándolas con una línea celular immortalizada tal como un mieloma, o manipulando tales células B mediante otras técnicas para perpetuar una línea celular capaz de producir un homólogo de anticuerpo monoclonal heterólogo completamente humano.

También se pueden usar grandes bibliotecas de expresión en fagos humanas sin inmunizar para aislar anticuerpos de afinidad elevada que se pueden desarrollar como agentes terapéuticos humanos mediante el uso de la tecnología estándar de fagos (Vaughan et al., 1996).

Aún otro agente de unión preferido que puede bloquear o recubrir ligandos de integrina en el método de la invención es un homólogo de anticuerpo recombinante humanizado que tiene especificidad anti-integrina. Después de los primeros métodos para la preparación de "anticuerpos quiméricos" auténticos (en los que la totalidad de las regiones constante y variable derivan de fuentes diferentes), se describió una nueva aproximación en el documento EP 0239400 (Winter et al.) mediante la cual los anticuerpos se alteran mediante sustitución (dentro de una región variable determinada) de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) para una especie con las de la otra. Este procedimiento se puede usar, por ejemplo, para sustituir las CDRs de los dominios de la región variable de Ig de las cadenas pesadas y ligeras humanas con CDRs alternativas de dominios de la región variable murina. Estas regiones variables de Ig alteradas se pueden combinar posteriormente con regiones constantes de Ig humana para crear anticuerpos que tienen una composición totalmente humana, excepto por las CDRs murinas sustituidas. Se prediría que sería menos probable que tales anticuerpos con CDRs sustituidas generasen una respuesta inmunitaria en seres humanos en comparación con los anticuerpos quiméricos verdaderos, porque los anticuerpos con CDRs sustituidas contienen considerablemente menos componentes no humanos. El procedimiento para la humanización de anticuerpos monoclonales por medio del "injerto" de CDRs se ha denominado "remodelado". (Riechmann et al., 1988, *Nature* 332, 323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239, 1534-1536).

En general, se trasplantan las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo murino en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano, ya que las CDR (tres en las cadenas pesadas del anticuerpo, tres en las cadenas ligeras) son las regiones del anticuerpo de ratón que se unen a un antígeno específico. El trasplante de CDRs se lleva a cabo mediante ingeniería genética, por lo que las secuencias de ADN de las CDRs se determinan mediante clonación de segmentos de genes de la región variable (V) de la cadena pesada y ligera murina, y después se transfieren a las regiones V humanas correspondientes mediante mutagénesis dirigida. En la fase final del procedimiento, se añaden segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL), y los genes de la cadena pesada y ligera humanizadas se co-expresan en células de mamífero para producir un anticuerpo humanizado soluble.

La transferencia de estas CDRs a un anticuerpo humano confiere a este anticuerpo las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo murino original. Las seis CDRs del anticuerpo murino se ensamblan estructuralmente en una región "estructural" de la región V. La razón por la que el injerto de CDR tiene éxito es que las regiones estructurales entre los anticuerpos humanos y de ratón pueden tener estructuras 3D muy similares con puntos similares de unión para CDRs, de modo que las CDRs se pueden intercambiar. Se pueden preparar tales homólogos de anticuerpos humanizados como se ejemplifica en Jones et al., 1986, *Nature* 321, 522-525; Riechmann, 1988, *Nature* 332, 323-327; Queen et al., 1989, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 10029; y Orlandi et al., 1989, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 3833.

Sin embargo, se cree que ciertos aminoácidos de las regiones estructurales interactúan con las CDRs e influyen

en la afinidad global de la unión al antígeno. La transferencia directa de las CDRs de un anticuerpo murino para producir un anticuerpo recombinante humanizado sin modificaciones en las regiones estructurales de las regiones V humanas con frecuencia da como resultado una pérdida parcial o completa de la afinidad de unión. En algunos casos, parece ser crítica la alteración de residuos en las regiones estructurales del anticuerpo aceptor para obtener la actividad de unión.

Queen et al., 1989 (anteriormente mencionado) y el documento WO 90/07861 (Protein Design Labs) han descrito la preparación de un anticuerpo humanizado que contiene residuos modificados en las regiones estructurales del anticuerpo aceptor combinando las CDRs de un MAb murino (anti-Tac) con regiones estructurales y constantes de inmunoglobulina humana. Se ha demostrado una solución al problema de la pérdida de afinidad de unión que con frecuencia se produce por la transferencia directa de CDRs sin modificaciones de los residuos estructurales de las regiones V humanas; la solución implica dos etapas clave. Primero, se eligen las regiones estructurales de la región V humana mediante análisis informático con una homología óptima de secuencias de proteínas para la región estructural de la región V del anticuerpo murino original, en este caso, el MAb anti-Tac. En la segunda etapa, se modela informáticamente la estructura terciaria de la región V murina para visualizar los residuos de aminoácidos estructurales que es más probable que interactúen con las CDRs murinas, y después se superponen estos residuos de aminoácidos murinos sobre la región estructural humana homóloga. Véanse también las patentes de EE.UU. 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 (Protein Design Labs).

Se puede usar una aproximación diferente (Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9, 266-271) y utilizar, como patrón, las regiones estructurales de la región V derivadas de las cadenas pesadas y ligeras NEWM y REI, respectivamente, para el injerto de CDR sin la introducción radical de residuos de ratón. Una ventaja de usar la aproximación de Tempest et al. para construir anticuerpos humanizados basados en NEWM y REI es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables de NEWM y REI se conocen de la cristalografía de rayos X, y de esta manera se pueden modelar las interacciones específicas entre las CDRs y los residuos estructurales de la región V.

Independientemente de la aproximación utilizada, los ejemplos de los homólogos de anticuerpos humanizados iniciales preparados hasta la fecha han demostrado que no es un proceso directo. Sin embargo, incluso reconociendo que tales cambios en la región estructural pueden ser necesarios, no es posible predecir, basándose en la técnica anterior disponible, qué residuos estructurales será necesario alterar, si hace falta, para obtener anticuerpos recombinantes humanizados funcionales de la especificidad deseada. Así, los resultados hasta la fecha indican que los cambios necesarios para conservar la especificidad y/o afinidad son en la mayor parte únicos para un anticuerpo determinado, y no se pueden predecir basándose en la humanización de un anticuerpo diferente.

Ciertos antagonistas de integrinas que contienen subunidades alfa4 útiles en la presente invención incluyen homólogos de anticuerpos recombinantes quiméricos y humanizados (es decir, inmunoglobulinas intactas y porciones de las mismas) con especificidad de epítipo B que se han preparado y se describen en la patente de EE.UU. 5.932.214 (mab HP1/2). El material de partida para la preparación de homólogos de anticuerpos anti-integrina quiméricos (variable de ratón-constante humana) y humanizados puede ser un anticuerpo monoclonal anti-integrina murino como se ha descrito previamente, un anticuerpo monoclonal anti-integrina disponible comercialmente (p.ej., HP2/1, Amac International, Inc., Westbrook, Maine) o un anticuerpo monoclonal anti-integrina preparado según las enseñanzas de la presente memoria. Otros homólogos de anticuerpo anti-VLA4 humanizados preferidos los describe Athena Neurosciences, Inc. en el documento PCT/US95/01219 (27 de julio de 1995) y la patente de EE.UU. 5.840.299.

Estos anticuerpos anti-VLA-4 humanizados comprenden una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. La cadena ligera humanizada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad correspondientes de una cadena ligera de inmunoglobulina de ratón 21-6, y una región estructural de la región variable de una secuencia estructural de la región variable de la cadena ligera kappa humana, excepto en que en al menos una posición, la posición de un aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la región estructural de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón 21.6. La cadena pesada humanizada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad correspondientes de una cadena pesada de inmunoglobulina de ratón 21-6, y una región estructural de la región variable de una secuencia estructural de la región variable de la cadena pesada humana excepto en que en al menos una posición, la posición de un aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la región estructural de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón 21-6.

C. Producción de Fragmentos y Análogos

También se pueden producir de manera eficaz fragmentos de un anticuerpo de integrina alfa4 aislado (p.ej., los fragmentos de homólogos de anticuerpo descritos en la presente memoria) mediante métodos recombinantes, mediante digestión proteolítica o mediante síntesis química usando métodos conocidos para los expertos en la técnica. En los métodos recombinantes, se pueden generar fragmentos internos o terminales de un polipéptido eliminando uno o más nucleótidos de un extremo (para un fragmento terminal) o de ambos extremos (para un

fragmento interno) de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de tipo Hedgehog aislado. La expresión del ADN mutagenizado produce fragmentos de polipéptidos. La digestión con endonucleasas de "desgaste de extremos" también puede generar ADN que codifican una colección de fragmentos. También se pueden generar ADN que codifican fragmentos de una proteína mediante corte aleatorio, digestión de restricción o una combinación o ambos.

5 Los fragmentos de proteína se pueden generar directamente a partir de proteínas intactas. Los péptidos se pueden escindir específicamente mediante enzimas proteolíticas, que incluyen, pero sin limitación, plasmina, trombina, tripsina, quimotripsina o pepsina. Cada una de estas enzimas es específica del tipo de enlace peptídico que ataca. La tripsina cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos en los que el grupo carbonilo es de un aminoácido básico, normalmente arginina o lisina. La pepsina y quimotripsina catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de aminoácidos aromáticos, tales como triptófano, tirosina y fenilalanina. Se generan grupos alternativos de fragmentos proteicos escindidos impidiendo la escisión en un sitio que es susceptible a una enzima proteolítica. Por ejemplo, la reacción del grupo ϵ -aminoácido de la lisina con trifluoroacetato de etilo en una solución moderadamente básica produce residuos de aminoácidos bloqueados cuyo enlace peptídico adyacente ya no es susceptible a la hidrólisis mediante tripsina. Las proteínas se pueden modificar para crear enlaces peptídicos que sean susceptibles a las enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la alquilación de residuos de cisteína con β -haloetilaminas produce enlaces peptídicos que se hidrolizan mediante tripsina (Lindley, (1956) *Nature* 178, 647). Además, se pueden usar reactivos químicos que escinden las cadenas peptídicas en residuos específicos. Por ejemplo, el bromuro de cianógeno escinde péptidos en residuos de metionina (Gross y Witkip, (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1510). Así, tratando las proteínas con diversas combinaciones de modificadores, enzimas proteolíticas y/o reactivos químicos, las proteínas se pueden dividir en fragmentos de una longitud deseada sin solapamiento de los fragmentos, o se pueden dividir en fragmentos solapantes de una longitud deseada.

También se pueden sintetizar fragmentos químicamente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como la química de fase sólida Fmoc o t-Boc de Merrifield. Merrifield, *Recent Progress in Hormone Research* 23: 451 (1967).

25 Los ejemplos de los métodos de la técnica anterior que permiten la producción y el ensayo de fragmentos y análogos se describen más adelante. Se pueden usar éstos, o métodos análogos, para producir y cribar fragmentos y análogos de un antagonista de integrina alfa4 aislado que se puede demostrar que tiene una actividad biológica. Un método ejemplar para ensayar si los fragmentos y análogos de antagonistas de integrina que contiene la subunidad alfa 4 tienen actividad biológica se encuentra en la Sección IV y los Ejemplos.

30 D. Producción de Secuencias Alteradas de ADN y Péptidos: Métodos Aleatorios

Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la proteína o una porción particular del mismo. Los métodos útiles incluyen la mutagénesis mediante PCR y la mutagénesis de saturación. También se puede generar una biblioteca de variantes de secuencia de aminoácidos aleatorias mediante la síntesis de una serie de secuencias oligonucleotídicas degeneradas. Los métodos para generar variantes de secuencia de aminoácidos de una proteína dada mediante el uso de ADN y péptidos alterados se conocen bien en la técnica. No se pretende que los siguientes ejemplos de tales métodos limiten el alcance de la presente invención, sino que únicamente sirvan para ilustrar las técnicas representativas. Los expertos en la técnica reconocerán que también son útiles otros métodos a este respecto, tales como mutagénesis mediante PCR, mutagénesis de saturación y mutagénesis con oligonucleótidos degenerados, como se describe en las referencias citadas más adelante.

Mutagénesis mediante PCR: Véase, por ejemplo, Leung et al., (1989) *Technique* 1, 11-15.

Mutagénesis de Saturación: Se describe un método en general en Mayers et al., (1989) *Science* 229, 242.

Mutagénesis con Oligonucleótidos Degenerados: Véase, por ejemplo, Harang, S.A., (1983) *Tetrahedron* 39, 3; Itakura et al., (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 323 e Itakura et al., *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules*, págs. 273-289 (A.G. Walton, ed.), Elsevier, Amsterdam, 1981.

45 E. Producción de Secuencias Alteradas de ADN y Péptidos: Métodos Dirigidos

La mutagénesis no aleatoria o dirigida proporciona secuencias o mutaciones específicas en porciones específicas de una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido aislado, para proporcionar variantes que incluyen delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de la secuencia de aminoácidos conocida del polipéptido aislado.

50 Los sitios de mutación se pueden modificar individualmente o en serie, por ejemplo: (1) sustituyendo primero con aminoácidos conservados y después con elecciones más radicales, dependiendo de los resultados obtenidos; (2) delecionando el residuo objetivo; o (3) insertando residuos de la misma clase o una diferente adyacentes al sitio localizado, o combinaciones de las opciones 1-3.

Evidentemente, tales métodos dirigidos son una manera con la que se puede introducir una cisteína N-terminal (o un equivalente funcional) en una secuencia polipeptídica determinada para proporcionar el sitio de unión para un resto hidrofóbico. Otros métodos muy conocidos de mutagénesis dirigida se detallan en las referencias citadas más adelante, que se incorporan como referencia en la presente memoria.

Mutagénesis por barrido de alaninas: Véase Cunningham y Wells, (1989) Science 244, 1081-1085).

Mutagénesis mediada por oligonucleótidos: Véase, por ejemplo, Adelman et al., (1983) DNA 2, 183.

Mutagénesis mediante Casete: Véase Wells et al., (1985) Gene 34, 315.

Mutagénesis Combinatoria: Véase, por ejemplo, Ladner et al., documento WO 88/06630.

- 5 Estrategias de Expresión en Fagos: Véase, por ejemplo, la revisión de Marks et al., J. Biol. Chemistry: 267 16007-16010 (1992).

F. Otras Variantes de los Antagonistas de Integrinas Alfa 4

10 Las variantes pueden diferir de otros antagonistas de integrinas alfa 4 en la secuencia de aminoácidos o de maneras que no implican la secuencia, o ambos. Los polipéptidos más preferidos de la invención tienen modificaciones preferidas que no son de secuencia, que incluyen la derivatización química in vivo o in vitro (p.ej., de su extremo N-terminal), así como posibles cambios de acetilación, metilación, fosforilación, amidación, carboxilación o glicosilación.

15 Otros análogos incluyen una proteína o sus fragmentos biológicamente activos cuyas secuencias difieren de TA2 o las halladas en las patentes de EE.UU. 5.840.299 o 5.888.507; 5.932.214 o PCT US/94/00266, por una o más sustituciones conservativas de aminoácidos o por una o más sustituciones no conservativas de aminoácidos, o por delecciones o inserciones que no anulan la actividad biológica de la proteína aislada. Las sustituciones conservativas incluyen en general la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, tales como sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, alanina y glicina; leucina e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrofóbicos apolares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los expertos en la técnica pueden conocer fácilmente otras sustituciones conservativas. Por ejemplo, para el aminoácido alanina, se puede tomar una sustitución conservativa de cualquiera de D-alanina, glicina, beta-alanina, L-cisteína y D-cisteína. Para la lisina, una sustitución puede ser cualquiera de D-lisina, arginina, D-arginina, homoarginina, metionina, D-metionina, ornitina o D-ornitina.

25 Otros análogos usados en la invención son aquellos con modificaciones que incrementan la estabilidad del péptido. Tales análogos pueden contener, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que sustituyen a los enlaces peptídicos) en la secuencia peptídica. También se incluyen: análogos que incluyen residuos diferentes de los L-aminoácidos naturales, tales como D-aminoácidos o aminoácidos no naturales o sintéticos, tales como beta o gamma aminoácidos y análogos cíclicos. La incorporación de D-aminoácidos en vez de L-aminoácidos en el polipéptido de tipo Hedgehog aislado puede aumentar su resistencia a las proteasas. Véase la patente de EE.UU. 5.219.990, anteriormente mencionada.

35 Los homólogos de anticuerpos preferidos incluyen una secuencia de aminoácidos al menos un 60%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homóloga a una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo TA2 o una secuencia al menos un 60%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% homóloga a secuencias de aminoácidos descritas, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.840.299 (p.ej., SEQ ID N° 15, región variable de la cadena ligera; SEQ ID N°: 17, región variable de la cadena pesada); patente de EE.UU. 5.932.214 (p.ej., SEQ ID N°s: 2 y 4); y la solicitud de patente publicada WO94/16094 (las secuencias halladas en el anticuerpo anti-VLA4 de la línea celular ATCC CRL 11175).

40 G. Formas Conjugadas a Polímeros

Dentro del amplio alcance de la presente invención, se puede emplear una única molécula de polímero para la conjugación con un antagonista de integrina alfa4, aunque también se contempla que se puede unir también más de una molécula de polímero. Las composiciones de antagonistas conjugados de integrina alfa4 de la invención pueden hallar utilidad tanto en aplicaciones in vivo como in vitro. Además, se reconocerá que el polímero que se conjuga puede utilizar cualquier otro grupo, resto u otra especie conjugada, según sea apropiado para la aplicación final. A modo de ejemplo, en algunas aplicaciones puede ser útil unir de forma covalente al polímero un resto funcional que confiera resistencia a la degradación UV, o antioxidación u otras propiedades o características al polímero. Como ejemplo adicional, en algunas aplicaciones puede ser ventajoso funcionalizar el polímero para hacerlo reactivo y permitir que se entrecruce con una molécula de fármaco, para potenciar diversas propiedades o características del material conjugado global. Por lo tanto, el polímero puede contener cualquier funcionalidad, grupos repetitivos, uniones u otras estructuras constituyentes que no impidan la eficacia de la composición del antagonista conjugado de integrina alfa4 para el propósito deseado. Otros objetivos y ventajas de la presente invención serán más completamente evidentes a partir de la descripción subsiguiente y las reivindicaciones adjuntas.

55 Los polímeros ilustrativos que se pueden emplear de manera provechosa para alcanzar estas características deseables se describen más adelante en la presente memoria en los esquemas de reacción ejemplares. En los conjugados antagonista/polímero unidos de manera covalente, el polímero se puede funcionalizar y después acoplar

a aminoácido(s) libre(s) del antagonista para formar enlaces lábiles.

Los antagonistas de integrinas alfa4 se conjugan lo más preferiblemente por medio de un grupo reactivo terminal del polímero, aunque la conjugación también puede ser ramificada desde grupos reactivos que no son terminales. El polímero con el/los grupo(s) reactivo(s) se denomina en la presente memoria "polímero activado". El grupo reactivo reacciona selectivamente con los grupos reactivos amino libres u otros grupos de la molécula de antagonista. El/los polímero(s) activado(s) se hace(n) reaccionar de manera que se pueda producir la unión en cualquier grupo amino disponible del antagonista de integrina alfa4, tal como los grupos alfa-amino o los grupos épsilon-amino de las lisinas. También se pueden usar como sitios de unión grupos carboxílicos libres, grupos carbonilo activados de forma adecuada, grupos hidroxilo, guanidilo, restos de carbohidrato oxidados y grupos mercapto del antagonista de integrina alfa4 (si están disponibles).

Aunque el polímero se puede unir en cualquier lugar de la molécula de antagonista de integrina alfa4, un sitio preferido para el acoplamiento del polímero a los antagonistas de integrina (en especial aquellos que son proteínas) es el extremo N-terminal del antagonista de integrina alfa4. El/los sitio(s) secundario(s) está(n) en o cerca del extremo C-terminal, y por medio de restos de carbohidrato (si los hay). Así, la invención contempla: (i) conjugados de polímero acoplados en el extremo N-terminal de los antagonistas de integrina alfa4; (ii) conjugados de polímero acoplados en el extremo C-terminal de los antagonistas de integrina alfa4; (iii) conjugados acoplados mediante carbohidratos; (iv) así como conjugados de polímeros acoplados en N-, C- y carbohidratos de los antagonistas de integrina alfa4.

En general, se emplean de alrededor de 1,0 a alrededor de 10 moles de polímero activado por mol de antagonista, dependiendo de la concentración de antagonista. La cantidad final es un equilibrio entre maximizar el nivel de la reacción a la vez que se minimizan las modificaciones inespecíficas del producto y, al mismo tiempo, se define la química que mantendrá la actividad óptima, mientras que al mismo tiempo se optimiza, si es posible, la vida media del antagonista. Preferiblemente, se mantiene al menos alrededor de un 50% de la actividad biológica del antagonista, y lo más preferiblemente se mantiene un 100%.

Las reacciones pueden tener lugar mediante cualquier método adecuado reconocido en la técnica usado para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes. En general, el procedimiento implica preparar un polímero activado (que puede tener al menos un grupo hidroxilo terminal) y posteriormente hacer reaccionar el antagonista con el polímero activado para producir la proteína soluble adecuada para la formulación. La reacción de modificación anterior se puede llevar a cabo mediante varios métodos, que pueden implicar una o más etapas.

Como se mencionó anteriormente, ciertas realizaciones de la invención utilizan el extremo N-terminal de un antagonista de integrina alfa4 como la unión al polímero. Hay disponibles métodos convencionales adecuados para obtener de forma selectiva un antagonista de integrina alfa4 modificado en el extremo N-terminal. Se ejemplifica un método mediante un método de alquilación reductora que aprovecha la reactividad diferencial de los diferentes tipos de grupos amino primarios (los grupos épsilon-amino de la lisina frente a los grupos amino en una metionina N-terminal) disponibles para la derivatización en un antagonista de integrina alfa4 adecuado. En las condiciones de selección adecuadas, se puede alcanzar la derivatización sustancialmente selectiva de un antagonista de integrina alfa4 adecuado en el extremo N-terminal del mismo con un polímero que contiene un grupo carbonilo. La reacción se lleva a cabo a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos épsilon-amino de los residuos de lisina y el del grupo alfa-amino de un residuo N-terminal de un antagonista de integrina alfa4. Este tipo de procedimiento químico es muy conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica.

Una estrategia para dirigir un polímero de polialquilen glicol, tal como PEG, al extremo C-terminal de un antagonista de integrina alfa4 (p.ej., una proteína) sería unir químicamente o modificar genéticamente un sitio que se pueda usar para dirigir el resto de polímero. Por ejemplo, la incorporación de una Cys en un sitio que está en o cerca del extremo C-terminal de una proteína permitiría la modificación específica mediante el uso de derivados de polialquilen glicol (p.ej., PEG) activados con maleimida, vinilsulfona o haloacetato reconocidos en la técnica. Estos derivados se pueden usar específicamente para la modificación de las cisteínas manipuladas debido a la elevada selectividad de estos reactivos por Cys. Otras estrategias, tales como la incorporación de una etiqueta de histidina que se puede seleccionar como objetivo (Fancy et. al., (1996) Chem. & Biol. 3: 551) o un sitio de glicosilación adicional en una proteína, representan otras alternativas para la modificación del extremo C-terminal de un antagonista de integrina alfa4.

Los métodos para seleccionar como objetivo carbohidratos como sitios para la modificación química también se conocen bien, y por lo tanto es probable que se pueda añadir directa y específicamente un polímero de polialquilen glicol a carbohidratos (si los hay) en un antagonista de integrina alfa4 que se hayan activado mediante oxidación. Por ejemplo, se puede generar un polietilenglicol-hidrazida que forma enlaces hidrazona relativamente estables mediante condensación con aldehídos y cetonas. Esta propiedad se ha usado para la modificación de proteínas mediante enlaces de oligosacáridos oxidados. Véase Andresz, H. et al., (1978), Makromol. Chem. 179: 301. En particular, el tratamiento de PEG-carboximetilhidrazida con nitrito produce PEG-carboximetilazida, que es un grupo electrofílicamente activo reactivo hacia los grupos amino. Esta reacción también se puede usar para preparar proteínas modificadas con polialquilen glicol. Véanse las patentes de EE.UU. 4.101.380 y 4.179.337.

Se puede usar la química mediada por ligadores tiol reconocida en la técnica para facilitar adicionalmente el entrecruzamiento de proteínas para formar composiciones de antagonistas de integrinas alfa4 multivalentes. En particular, se pueden generar aldehídos reactivos en restos de carbohidrato con peryodato sódico, formando conjugados de cistamina por medio de los aldehídos e induciendo el entrecruzamiento por medio de los grupos tiol de las cistaminas. Véase Pepinsky, B. et al., (1991), J. Biol. Chem., 266: 18244-18249 y Chen, L.L. et al., (1991) J. Biol. Chem., 266: 18237-18243. Por lo tanto, este tipo de procedimiento químico también sería adecuado para la modificación con polímeros de polialquilen glicol en los que se incorpora un ligador en el carbohidrato, y el polímero de polialquilen glicol se une al ligador. Mientras los ligadores que contienen aminotiol o hidrazina permitirán la adición de un único grupo polimérico, la estructura del ligador puede variar de manera que se añadan múltiples polímeros, y/o que cambie la orientación espacial del polímero con respecto al antagonista de integrina alfa4.

En la práctica de la presente invención, se incorporan residuos de polialquilen glicol de polialquilen glicol de alquilo C1-C4, preferiblemente polietilen glicol (PEG), o residuos de poli(oxi)alquilen glicol de tales glicoles de forma ventajosa en los sistemas poliméricos de interés. Así, el polímero al que se une la proteína puede ser un homopolímero de polietilen glicol (PEG) o es un poliol polioxietilado, con tal de que en todos los casos el polímero sea soluble en agua a temperatura ambiente. Los ejemplos no limitantes de tales polímeros incluyen homopolímeros de poli(óxido de alquilen) tales como PEG o polipropilen glicoles, glicoles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos, con tal de que se mantenga la solubilidad en agua del copolímero en bloque. Los ejemplos de polioles polioxietilados incluyen, por ejemplo, glicerol polioxietilado, sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada o similares. El esqueleto de glicerol del glicerol polioxietilado es el mismo esqueleto que se da de forma natural, por ejemplo, en los mono-, di- y triglicéridos animales y humanos. Por lo tanto, esta ramificación no se detectaría necesariamente como un agente exógeno en el organismo.

Como alternativa a los poli(óxidos de alquilen), se pueden usar polímeros basados en polivinilpirrolidonas, poli(acrilamidas), poli(alcoholes vinílicos), carbohidratos y similares. Los expertos en la técnica reconocerán que la lista anterior es simplemente ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tengan las cualidades descritas en la presente memoria.

No es necesario que el polímero tenga un peso molecular particular, pero se prefiere que el peso molecular esté entre alrededor de 300 y 100.000, más preferiblemente entre 10.000 y 40.000. En particular, los mejores tamaños son los de 20.000 o más para prevenir la pérdida del producto debido a la filtración en los riñones.

La derivatización con polialquilen glicol tiene varias propiedades ventajosas en la formulación de conjugados polímero-antagonista de integrina alfa4, asociadas a las siguientes propiedades de los derivados de polialquilen glicol: mejora de la solubilidad acuosa, mientras que al mismo tiempo no inducen una respuesta antigénica o inmunogénica; grados elevados de biocompatibilidad; ausencia de biodegradación in vivo de los derivados de polialquilen glicol; y facilidad de excreción por los organismos vivos.

Además, en otro aspecto de la invención, se puede utilizar un antagonista de integrina alfa4 unido covalentemente al componente polimérico en el que la naturaleza de la conjugación implica enlaces químicos covalentes escindibles. Esto permite el control en términos de transcurso del tiempo durante el cual el polímero puede ser escindido del antagonista de integrina alfa4. Este enlace covalente entre el antagonista de integrina alfa4 y el polímero se puede escindir mediante una reacción química o enzimática. El producto polímero-antagonista de integrina alfa4 mantiene una cantidad aceptable de actividad. Al mismo tiempo, hay presentes porciones de polietilen glicol en el polímero de conjugación para dotar al conjugado polímero-antagonista de integrina alfa4 con una solubilidad acuosa elevada y una capacidad de circulación sanguínea prolongada. Como resultado de estas características mejoradas, la invención contempla la administración parenteral, nasal y oral de la especie activa de polímero-antagonista de integrina alfa4 y, tras la escisión hidrolítica, la biodisponibilidad del antagonista de integrina alfa4 por sí mismo, en aplicaciones in vivo.

Se debe entender que los esquemas de reacción descritos en la presente memoria se proporcionan con fines de ilustración solamente, y no deben ser limitantes con respecto a las reacciones y estructuras que se pueden utilizar en la modificación del antagonista de integrina alfa4, p.ej., para alcanzar la solubilidad, estabilización y afinidad por la membrana celular para la administración parenteral y oral. La actividad y estabilidad de los conjugados de antagonista de integrina alfa4 se pueden variar de diversas maneras, mediante el uso de un polímero de diferente tamaño molecular. Las solubilidades de los conjugados se pueden variar cambiando la proporción y el tamaño del fragmento de polietilen glicol incorporado en la composición polimérica.

III. Aplicaciones Terapéuticas

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los vehículos para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Se debería entender, sin embargo, que una dosis y régimen de tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y el juicio del médico que aplica el tratamiento, y la gravedad de la enfermedad particular que se trata. La cantidad de ingrediente activo también puede depender del agente terapéutico o profiláctico, si lo hay, con el que el ingrediente se co-

administra.

La dosis y tasa de dosis de los compuestos de esta invención eficaces para prevenir, suprimir o inhibir la adhesión celular dependerán de una diversidad de factores, tales como la naturaleza del inhibidor, el tamaño del paciente, el objetivo del tratamiento, la naturaleza de la patología a tratar, la composición farmacéutica específica usada y el juicio del médico que aplica el tratamiento. Son útiles los niveles de dosis entre alrededor de 0,001 y alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente entre alrededor de 0,1 y alrededor de 50 mg/kg de peso corporal por día del compuesto de ingrediente activo. Lo más preferiblemente, el agente de unión a VLA-4, si es un anticuerpo o derivado de anticuerpo, se administrará a una dosis que oscila entre alrededor de 0,1 mg/kg de peso corporal/día y alrededor de 20 mg/kg de peso corporal/día, preferiblemente entre alrededor de 0,1 mg/kg de peso corporal/día y alrededor de 10 mg/peso corporal/día y a intervalos de 1-14 días. Para agentes de unión que no son anticuerpos o moléculas pequeñas, el intervalo de dosis estaría preferiblemente entre cantidades equivalentes molares de esas cantidades de anticuerpo. Preferiblemente, una composición de anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para proporcionar un nivel plasmático de anticuerpo de al menos 1 mg/ml. La optimización de las dosis se puede determinar mediante la administración de los agentes de unión, seguido de la determinación del recubrimiento de células positivas para integrina por el agente a lo largo del tiempo tras la administración a una dosis determinada in vivo.

La presencia del agente administrado se puede detectar in vitro (o ex vivo) mediante la incapacidad o capacidad disminuida de las células del individuo de unirse al mismo agente que se ha marcado (p.ej., mediante un fluorocromo). La dosis preferida debería producir un recubrimiento detectable de la gran mayoría de células positivas para integrina. Preferiblemente, el recubrimiento continúa en el caso de un homólogo de anticuerpo durante un periodo de 1-14 días.

Otra modalidad preferida para introducir el antagonista es mediante la terapia de combinación con un agente farmacológico. El agente farmacológico es preferiblemente un agente con cierto grado de eficacia terapéutica en el tratamiento de la lesión cerebral aguda. Tales agentes pueden incluir, pero sin limitación, agentes trombolíticos tales como plasminógeno o uroquinasa, agentes dirigidos a mecanismos excitotóxicos tales como Selfotel™ y Aptiganel™, agentes dirigidos a la lesión neuronal asociada a óxido nítrico tales como Lubeluzol™, agentes dirigidos a la lesión en la membrana celular neuronal asociada a isquemia tales como Tirilizad™, agentes dirigidos a mecanismos anti-inflamatorios tales como Enlimomab™. El agente se puede combinar con los antagonistas de integrina alfa4 de la invención antes de, durante o después de la administración de los antagonistas.

IV. Formulaciones y Métodos para el tratamiento

El método de tratamiento según esta invención implica administrar de manera interna o tópica una cantidad eficaz de compuesto activo al sujeto. Las dosis de compuestos activos en el método inventivo son una cantidad eficaz atóxica. Los expertos en la técnica del uso de ensayos clínicos rutinarios son capaces de determinar las dosis óptimas para la enfermedad particular a tratar.

Los expertos en la técnica emplearán ensayos habituales para la recuperación neurológica (p.ej., escala de ictus del NIH, índice de Barthel, escala de Rankin modificada, escala pronóstica de Glasgow) para determinar la eficacia. La dosis deseada se administra a un sujeto una o más veces al día, de manera intravenosa, oral, rectal, parenteral, intranasal, tópica o mediante inhalación. La dosis deseada también se puede administrar mediante infusión intravenosa continua.

En la administración parenteral de los inhibidores de integrinas alfa4 según esta invención, los compuestos se pueden formular en una solución acuosa para inyección que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, etc. Las soluciones de inyección improvisadas se pueden preparar a partir de píldoras, gránulos o comprimidos estériles que pueden contener diluyentes, agentes dispersantes y tensioactivos, aglutinantes y lubricantes, cuyos materiales conoce bien el técnico experto.

En el caso de administración oral, se pueden formular polvos o gránulos finos del compuesto con diluyentes y agentes dispersantes y tensioactivos, y se pueden preparar en agua o en un jarabe, en cápsulas u obleas en estado seco o en una suspensión no acuosa en la que se puede incluir un agente de suspensión. Los compuestos se pueden administrar también en forma de comprimido junto con aglutinantes y lubricantes opcionales, o en una suspensión en agua o jarabe o un aceite o en una emulsión de agua en aceite, y pueden incluir agentes aromatizantes, conservantes, de suspensión, espesantes y emulsionantes. Los gránulos o comprimidos para la administración oral pueden estar recubiertos, o se pueden utilizar otros agentes y formulaciones farmacéuticamente aceptables, todos muy conocidos para los expertos en la técnica farmacéutica.

También se pueden usar vehículos sólidos o líquidos. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato cálcico dihidrato, yeso, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato magnésico y ácido esteárico. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, solución salina y agua. Las pomadas y cremas se preparan mediante el uso de materiales poliméricos conocidos, tales como diversos polímeros acrílicos seleccionados para proporcionar las características de liberación deseadas. Los supositorios se preparan a partir de bases habituales, tales como polietilén glicol y manteca de cacao.

Los métodos de tratamiento proporcionados por la presente invención se refieren a métodos para el tratamiento de lesiones del SNC en un paciente, que comprenden la administración de una integrina alfa4. En otras realizaciones, los métodos incluyen además la administración de un agente farmacológico al paciente. En las realizaciones preferidas, el agente farmacológico es un agente trombolítico, un agente neuroprotector, un agente anti-inflamatorio, un esteroide, una citocina o un factor de crecimiento. El agente trombolítico usado en la presente invención es preferiblemente un activador de plasminógeno tisular o uroquinasa. El agente neuroprotector usado en la presente invención es, por ejemplo, un agonista de un receptor seleccionado del grupo que consiste en: un receptor de N-metil-D aspartato (NMDA), un receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), un receptor de glicina, un receptor de canal de calcio, un receptor de bradiquinina B2 y un receptor canal de sodio, o un agonista seleccionado del grupo que consiste en: un receptor de bradiquinina B1, un receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA) y un receptor de adenosina A1. Los agentes anti-inflamatorios para el uso en la presente invención incluyen interleucina-1 y miembros de la familia de factores de necrosis tumoral.

Como contempla la presente invención, el antagonista de integrina alfa4 usado en los métodos de tratamiento puede ser un homólogo de anticuerpo, y preferiblemente un homólogo de anticuerpo humanizado o un fragmento de un homólogo de anticuerpo. En otras realizaciones, el homólogo de anticuerpo puede estar unido a una molécula de polímero. En los métodos de la presente invención, el antagonista de integrina alfa4 puede ser capaz alternativamente de antagonizar una única integrina que contiene una subunidad alfa4 o más de una integrina que contiene una subunidad alfa4.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Protocolo para la Oclusión Reversible de la Arteria Cerebral Media en Rata

Se anestesiaron ratas Sprague Dawley (SD) macho o espontáneamente hipertensas (SHRS) mediante el uso de isoflurano, y se ocluyó la arteria cerebral media derecha (MCAO) mediante la inserción de un monofilamento de nailon 4-0 por encima de la arteria carótida interna hasta el origen de la arteria cerebral media (MCA) (Zea Longa et al, 1989 *Stroke* 20:84). Después de 1 hora se retiró el filamento, la zona isquémica se reperfundió y se dejó que el animal se recuperara. Después de 24 h las ratas se sacrificaron, en cuyo momento se extrajeron los cerebros y se analizaron histológicamente para cuantificar el volumen de infarto.

Se trataron grupos de animales con vehículo (PBS) o el antagonista del receptor de bradiquinina B₂ Hoe 140 (Hoechst) mediante infusión subcutánea continua por medio de mini-bombas osmóticas. Se implantaron mini-bombas osmóticas cebadas (Alza Corp.) en el espacio subcutáneo del cogote inmediatamente antes de la inducción de la isquemia cerebral. Las bombas se cargaron para liberar 300 ng/kg/min de Hoe 140 y administraron el compuesto o el vehículo a un caudal de 8 μ l/h.

En un experimento diferente, se trataron grupos de animales con vehículo (solución salina isotónica estéril), TA2 (anti-VLA4 de rata de ratón: Seikagaku America Inc.) o un anticuerpo de control de isotipo (anti-LFA3 humano de ratón: obtenido de Biogen, Inc.). Todos los tratamientos se administraron 24 h antes de la cirugía de manera intravenosa (2,5 mg/kg o un volumen apropiado de vehículo).

Ejemplo 2: Resultados del Modelo de Oclusión Reversible de la Arteria Cerebral Media

Las ratas de control tratadas con vehículo que se sometieron a MCAO sufrieron lesiones extensas en las regiones corticales y subcorticales del cerebro. El hemisferio isquémico se inflamó notablemente y se observaron deficiencias de comportamiento significativas (p.ej., hemiparesia que produjo rotación y debilidad en las extremidades). Las ratas espontáneamente hipertensas sufrieron infartos cerebrales más extensos y reproducibles que las ratas Sprague Dawley sometidas al mismo procedimiento quirúrgico. Los volúmenes de infarto se expresan como valores medios \pm e.e.m. Se realizó el análisis estadístico mediante el uso de la prueba t de Student para datos independientes (* indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$).

El tratamiento con el antagonista del receptor de bradiquinina B₂ Hoe 140 (n=9) redujo significativamente el volumen de infarto total, cortical y subcortical, en un 37%, un 43% y un 17%, respectivamente, en comparación con los controles tratados con vehículo (n=8) medido 24 h después de la inducción de isquemia cerebral en SHRs. En ratas SD el tratamiento con la misma dosis de Hoe 140 (n=6) redujo el volumen de infarto total, cortical y subcortical, en un 57%, un 93% y un 24%, respectivamente, en comparación con los controles tratados con vehículo (n=7) medido 24 h después de la inducción de la isquemia cerebral. Estos datos son coherentes con hallazgos anteriores (Relton et. al, 1997 *Stroke* 28:1430) y se tomaron como un control positivo.

En SHRs el pre-tratamiento con el anticuerpo anti- α 4, TA-2 (2,5 mg/kg iv, n=10), 24 h antes de la inducción de la isquemia cerebral, redujo significativamente los volúmenes de infarto total, cortical y subcortical, en un 43%, un 47% y un 33%, respectivamente, en comparación con los animales tratados con la misma dosis de un anticuerpo de control de isotipo (n=15) medido 24 h tras de la inducción de la isquemia cerebral. En ratas SD, mediante el uso del mismo protocolo, el volumen de infarto total, cortical y subcortical se redujo significativamente en un 64%, un 65% y un 38%, respectivamente.

Los gráficos de las figuras 1A y 1B muestran el efecto de Hoe 140 sobre el tamaño del infarto 24 horas después de

MCAO de 60 minutos en ratas Sprague Dawley y espontáneamente hipertensas. Las figuras muestran la inhibición del infarto cerebral después del tratamiento con Hoe 140 (300 ng/kg/min) mediante infusión subcutánea continua en comparación con los animales de control tratados con vehículo. El tamaño del infarto se reduce en las regiones cortical y subcortical del cerebro en ambas cepas de ratas.

- 5 Los gráficos mostrados en las Figuras 2A y 2B muestran el efecto del anticuerpo anti-alfa4 de rata (TA-2, 2,5 mg/kg) sobre el tamaño del infarto 24 horas después de MCAO de 60 minutos en ratas Sprague Dawley y espontáneamente hipertensas. La figura muestra una inhibición significativa del infarto cerebral después del pre-tratamiento intravenoso con anticuerpo TA-2 en comparación con los animales tratados con un anticuerpo de control de isotipo. Se observó protección contra la lesión cerebral en ambas cepas de ratas.
- 10 Estos datos demuestran el efecto protector de la inhibición de las integrinas $\alpha 4$ en un modelo de isquemia cerebral focal reversible en rata. La patología de este modelo es clínicamente representativa de la afección humana del ictus, y los datos presentes sugieren que los inhibidores de integrinas que contienen subunidades alfa4 pueden tener un beneficio significativo en el tratamiento de este y otros trastornos relacionados con la isquemia.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento profiláctico de lesiones secundarias asociadas a traumatismo craneoencefálico, en el que las lesiones secundarias son isquémicas.
- 5 2. Un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo para el uso en el tratamiento profiláctico de lesiones secundarias asociadas a traumatismo craneoencefálico, en el que las lesiones secundarias son isquémicas.
3. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 2, en el que la composición farmacéutica comprende además un agente farmacológico.
- 10 4. El uso o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 3, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: un agente neuroprotector, un agente anti-inflamatorio, un esteroide, una citocina, un factor de crecimiento o un agente trombolítico.
5. El uso o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 4, en el que dicho agente neuroprotector es
 - 15 (i) un antagonista de un receptor seleccionado del grupo que consiste en: un receptor de N-Metil-D aspartato (NMDA), un receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), un receptor de glicina, un receptor de canal de calcio, un receptor de bradiquinina B2 y un receptor de canal de sodio; o
 - (ii) un agonista de un receptor seleccionado del grupo que consiste en: un receptor de bradiquinina B1, un receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA) y un receptor de adenosina A1.
- 20 6. El uso o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 4, en el que dicho agente anti-inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en: una interleucina-1 y un miembro de la familia de factores de necrosis tumoral.
7. El uso o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 4, en el que dicho agente trombolítico se selecciona del grupo que consiste en un activador del plasminógeno tisular y una uroquinasa.
- 25 8. El uso de un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención de la lesión cerebral secundaria que se produce por una lesión isquémica.
9. Un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo para el uso en la prevención de la lesión cerebral secundaria que se produce por una lesión isquémica.
- 30 10. El uso de la reivindicación 8 o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 9, en el que la lesión cerebral secundaria está provocada por una transformación hemorrágica o un vasoespasma cerebral.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 8 o 10 o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o 9 a 10, en el que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo se selecciona del grupo que consiste en:
 - 35 (i) un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ monoclonal o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo;
 - (ii) un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ monoclonal humanizado o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo;
 - (iii) un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ monoclonal humano o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo;
 - 40 (iv) un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ quimérico o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo; y
 - (v) un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ específico de epítipo B o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 8, 10 o 11 o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o 9 a 11, en el que el fragmento de unión anti-integrina $\alpha 4$ del mismo está unido a una molécula polimérica.
- 45 13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 8, o 10 a 12 o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o 9 a 12, en el que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo es capaz de antagonizar una integrina que contiene una única subunidad $\alpha 4$ o una integrina que contiene más de una subunidad $\alpha 4$.
14. El uso o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 13, en el que el

anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo es capaz de antagonizar VLA-4 y $\alpha 4\beta 7$.

5 15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 8, o 10 a 14 o del anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o 9 a 14, en el que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo es un anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ específico de epítipo B humano o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo.

16. El uso o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ del mismo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, o un fragmento Fv.

10 17. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$ o fragmento de unión a integrina $\alpha 4$ de la reivindicación 2, en el que las lesiones secundarias comprenden transformaciones hemorrágicas o vasoespasmos cerebrales.

EFEECTO DE HOE 140 SOBRE EL TAMAÑO DE INFARTO 24 H TRAS MCAO DE 60 MIN EN RATAS SD

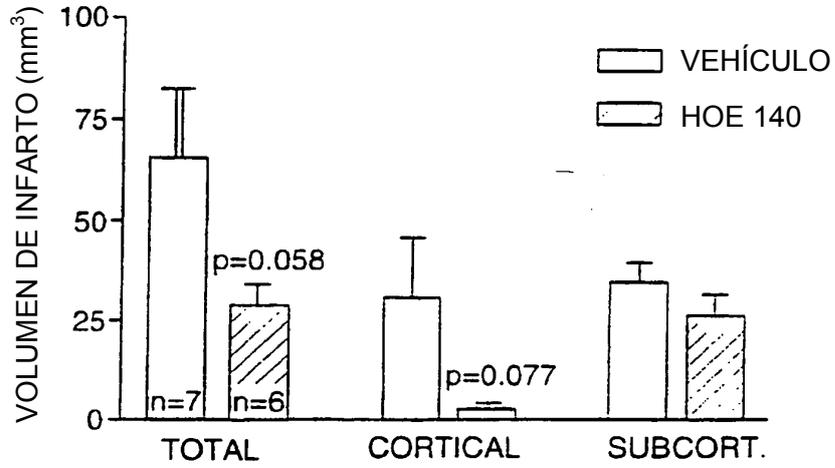


FIG. 1A

EFEECTO DE HOE 140 SOBRE EL TAMAÑO DE INFARTO 24 H TRAS MCAO DE 60 MIN EN SHRs

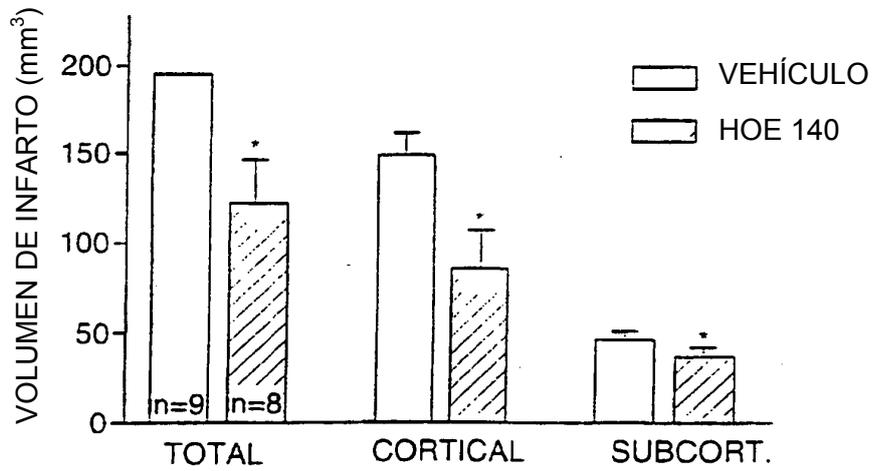


FIG. 1B

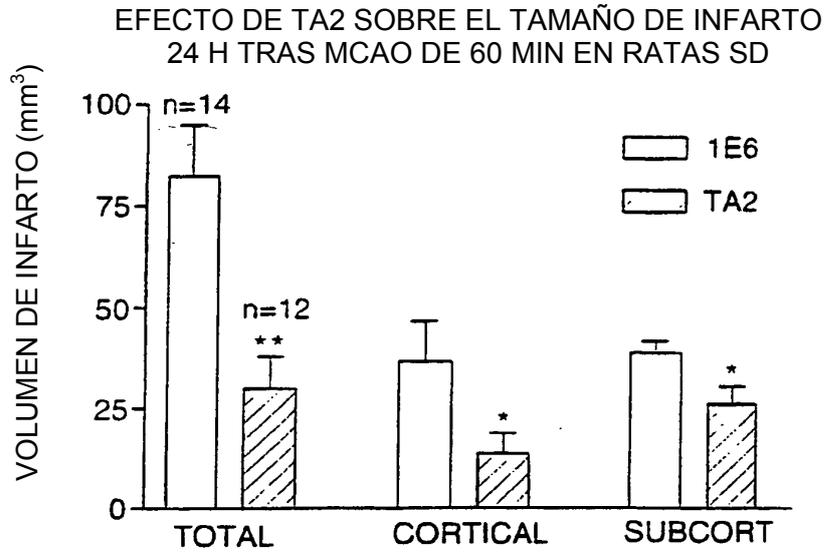


FIG. 2A

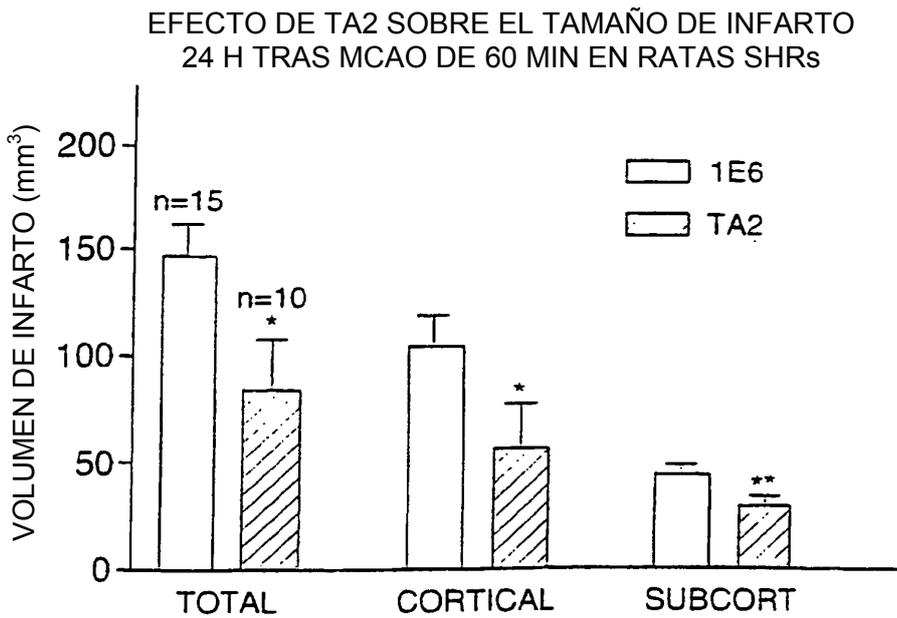


FIG. 2B