

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 754**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2005 E 05768245 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 1734997**

54 Título: **Natalizumab para tratar enfermedades que necesitan tratamiento con esteroides**

30 Prioridad:

01.04.2004 US 558120 P

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

23.12.2015

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es:

LIEBERBURG, IVAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 554 754 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

Natalizumab para tratar enfermedades que necesitan tratamiento con esteroides

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de natalizumab o a un fragmento inmunológicamente activo de éste para la preparación de un medicamento destinado a la administración a un sujeto en una cantidad eficaz para economizar esteroides a fin de reducir o eliminar la necesidad del tratamiento con esteroides en el sujeto que sufre una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones, donde el sujeto está en tratamiento con esteroides.

10 **Antecedentes de la invención**

La inflamación es una respuesta de los tejidos vascularizados a una infección o lesión y se ve afectada por la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y a su infiltración en los tejidos circundantes. En la inflamación normal, los leucocitos infiltrantes liberan mediadores tóxicos para matar los organismos invasores, fagocitan desechos y células muertas y juegan un papel en la reparación de los tejidos y la respuesta inmunitaria. Sin embargo, en la inflamación patológica, los leucocitos infiltrantes responden en exceso y pueden causar daños graves o mortales. Véase, por ej., Hickey, *Psychoneuroimmunology II* (Academic Press 1990).

Las integrinas son una familia de glucoproteínas de la superficie celular involucradas en la adhesión celular, la activación y la migración de los inmunocitos. La integrina alfa-4 es expresada por todos los leucocitos circulantes excepto los neutrófilos, y forma receptores heterodiméricos en conjunción con las subunidades de integrina beta-1 (β_1) o beta-7 (β_7); tanto alfa-4 beta-1 ($\alpha_4\beta_1$) como alfa-4 beta-7 ($\alpha_4\beta_7$) juegan un papel en la migración de los leucocitos a través del endotelio vascular (Springer et al., *Cell* 1994, 76: 301-14; Butcher et al., *Science* 1996,272: 60-6) y contribuyen a la activación y la supervivencia celular dentro del parénquima (Damle et al., *J. Immunol.* 1993; 151: 2368-79; Koopman et al., *J. Immunol* 1994, 152: 3760-7; Leussink et al., *Acta Neuropathol.* 2002, 103: 131-136). $\alpha_4\beta_1$ es expresada constitutivamente en los linfocitos, los monocitos, los macrófagos, los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos.

$\alpha_4\beta_1$ (también conocida como antígeno 4 muy tardío, VLA-4), se une a la molécula de adhesión celular vascular-1 (Lobb et al., *J. Clin. Invest.* 1994, 94: 1722-8), que es expresada por el endotelio vascular en muchos sitios de inflamación crónica (Bevilacqua et al., 1993 *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767-804; Postigo et al., 1993 *Res. Immunol.* 144: 723-35). $\alpha_4\beta_1$ tiene otros ligandos, que incluyen fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular (MEC).

El dímero $\alpha_4\beta_7$ interacciona con la molécula de adhesión celular adhesina de la mucosa (MAdCAM-1), y actúa de mediador en el regreso de los linfocitos al intestino (Farstad et al., 1997 *Am. J. Pathol.* 150: 187-99; Issekutz, 1991 *J. Immunol.* 147: 4178-84). La expresión de MAdCAM-1 en el endotelio vascular también aumenta en los sitios de inflamación del tracto intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Briskin et al., 1997 *Am. J. Pathol.* 151: 97-110).

Las moléculas de adhesión como las integrinas α_4 son posibles objetivos de agentes terapéuticos. Por ejemplo, el receptor de VLA-4 del cual la integrina α_4 es una subunidad es un objetivo importante a causa de su interacción con un ligando que reside en las células endoteliales del cerebro. Las enfermedades y afecciones que resultan de la inflamación cerebral tienen consecuencias particularmente graves. En otro ejemplo, el dímero de integrina $\alpha_4\beta_7$ es un objetivo importante debido a su participación en el regreso de los linfocitos al intestino y la inflamación patológica en el tubo gastrointestinal.

La integrina $\alpha_4\beta_1$ es expresada en la superficie extracelular de los linfocitos y monocitos activados, que han sido implicados en la patogenia de lesiones cerebrales inflamatorias agudas y la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) asociadas a la esclerosis múltiple (EM) (Coles et al., 1999 *Ann. Neurol.* 46(3): 296-304). Se ha probado el potencial antiinflamatorio de agentes terapéuticos contra la integrina α_4 tanto *in vitro* como *in vivo*. Véanse Yednock et al., *Nature* 1992, 356: 63-66; patente de Estados Unidos N° 5,840,299 para Bendig et al., expedida el 24 de noviembre de 1998 y patente de Estados Unidos N° 6,001,809 para Thorsett et al., expedida el 14 de diciembre de 1999. Los experimentos *in vitro* demuestran que los anticuerpos anti-integrina α_4 bloquean la unión de los linfocitos a las células endoteliales del cerebro. Los experimentos que prueban el efecto de los anticuerpos anti-integrina α_4 en animales que tienen una afección inducida artificialmente que simula la esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), demostraron que la administración de anticuerpos anti-integrina α_4 previene la inflamación cerebral y la consiguiente parálisis en los animales. Colectivamente, estos experimentos identifican anticuerpos anti-integrina α_4 como posibles agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de la esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos inflamatorios.

55 A menudo se indican esteroides para el tratamiento de afecciones inflamatorias, pero no pueden ser utilizados con seguridad durante períodos de tiempo prolongados. Los esteroides reducen la inflamación, los cuales debilitan el sistema inmunitario. Los pacientes que toman esteroides se pueden volver dependientes, intolerantes o resistentes a

los esteroides. Los ejemplos de esteroides son hidrocortisona, betametasona, fluorometolona, prednisolona, prednisona, medrisona, dexametasona, metilprednisolona, rimexolona y triamcinolona.

Muchos efectos secundarios graves se asocian al uso de esteroides. El uso prolongado de esteroides es desalentado por el alto riesgo de efectos secundarios de larga duración. Algunos efectos secundarios comunes incluyen inmunosupresión, diabetes, aumento de peso, acné, cataratas, hipertensión, psicosis, hirsutismo, cambios de humor, gastritis, debilidad muscular, hematomas, osteoporosis, mayor riesgo de infección y necrosis aséptica. A menudo los pacientes que toman esteroides por más de dos meses deben tomar calcio y suplementos de vitamina D u otros medicamentos, como los bifosfonatos, para prevenir la osteoporosis. El uso de esteroides a largo plazo en los niños conlleva el riesgo de un retraso en el crecimiento, así como los efectos secundarios que ocurren en los adultos.

Hasta la fecha, no se han descubierto terapias que permitan un tratamiento seguro y eficaz de afecciones inflamatorias como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías, sin necesidad de esteroides o que permitan disminuir gradualmente o discontinuar los esteroides. Son necesarios y se continúa buscando agentes economizadores de esteroides y métodos para utilizar dichos agentes a fin de reducir o eliminar la necesidad de esteroides en un sujeto que es insensible, o intolerante a los mismos, o dependiente del tratamiento con éstos en una cantidad estadísticamente significativa, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

US 2004/009169 A1 da a conocer en general un antiinflamatorio que se une a la integrina alfa-4; dicha inflamación es causada por esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal o colitis ulcerosa. US 2004/009169 A1 también da a conocer el uso general de natalizumab para mejorar dichas enfermedades inflamatorias, así como una terapia de combinación con infliximab, interferones, antiinflamatorios no esteroides, metotrexato, etc.

WO 03/072040 A2 apunta al uso general de un agente que se une específicamente a la integrina alfa-4, más específicamente natalizumab, solo o en terapia de combinación, para suprimir la inflamación patológica relacionada a la esclerosis múltiple o enfermedades del tubo gastrointestinal como colitis ulcerosa.

Sorbera et al (2000 Drugs of the Future 25(9): 917-921) indican en general que el natalizumab es un anticuerpo anti-integrina alfa-4 y un posible fármaco para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la enfermedad inflamatoria intestinal. Dan a conocer los resultados de estudios doble ciego y controlados con placebo en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, en los que no se permitió un tratamiento concomitante con esteroides.

WO 02/070007 A1 da a conocer métodos para prevenir, tratar o mejorar la esclerosis múltiple, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn por administración de antagonistas de la integrina $\alpha_4\beta_3$.

Resumen de la invención

Basándose en lo anterior, se necesitan nuevas composiciones y métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias que impliquen el uso de esteroides que traten eficazmente o inhiban estas enfermedades de modo que los pacientes pueden lograr una vida larga y mejor calidad de vida.

Esta invención se refiere en general al uso de natalizumab o a un fragmento inmunológicamente activo de éste para la preparación de un medicamento economizador de esteroides destinado a la administración a un sujeto en una cantidad eficaz para economizar esteroides a fin de reducir o eliminar la necesidad del tratamiento con esteroides en el sujeto que sufre una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones, donde el sujeto está en tratamiento con esteroides.

Se ha descubierto sorprendentemente que el agente de la presente invención o, más bien que natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste es economizador de esteroides. A menudo se indican esteroides para el tratamiento de afecciones inflamatorias, pero no pueden ser utilizados con seguridad durante períodos de tiempo prolongados. Los esteroides reducen la inflamación, los cuales debilitan el sistema inmunitario. Los pacientes que toman esteroides se pueden volver dependientes, intolerantes o resistentes a los esteroides.

Por ende, el agente de la presente invención permite un tratamiento seguro y eficaz de afecciones inflamatorias como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías, sin necesidad de esteroides, o permite disminuir gradualmente o discontinuar los esteroides.

El agente economizador de esteroides de la presente invención es un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo de éste, concretamente la inmunoglobulina anti- α_4 , natalizumab (Tysabri®) o un fragmento inmunológicamente activo de éste. Como tal, la inmunoglobulina anti- α_4 se debe administrar a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías. Cuando se administra en una cantidad eficaz para economizar

esteroides, la inmunoglobulina anti- α_4 permite al sujeto disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides. En consecuencia, se ha descubierto sorprendentemente que cuando se administra la inmunoglobulina anti- α_4 a un sujeto en una cantidad eficaz para economizar esteroides, el sujeto requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de esteroides que es

5 menor que la que sería necesaria en ausencia de la administración de la inmunoglobulina anti- α_4 de la presente invención.

La invención también se refiere en general a las terapias de combinación para el tratamiento de estas afecciones. Como tal, el agente economizador de esteroides de la invención se puede administrar en combinación con un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide, una composición anti-TNF, una composición 5-ASA y sus combinaciones.

La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un portador farmacéutico aceptable y una cantidad eficaz para economizar esteroides del economizador de esteroides, como el dado a conocer, que cuando se administra a un sujeto que lo necesita permite reducir o eliminar el uso de esteroides.

La composición de la invención se puede administrar por diversos modos de administración incluidas las vías de administración oral, parenteral (por ej., subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o intralesional), tópica, localizada (por ej., aplicación quirúrgica o supositorio quirúrgico), rectal y pulmonar (por ej., aerosoles, inhalación o polvo). Preferentemente, las composiciones de esta invención se administran por vía parenteral.

Estos y otros objetivos, ventajas y características de la invención se tornarán evidentes a los expertos en el área al leer los detalles de los métodos y las formulaciones que se describen más extensamente a continuación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un gráfico de la respuesta al natalizumab cuando se administra a los pacientes en un ensayo clínico de la enfermedad de Crohn (véase ejemplo 2).

La figura 2 muestra un gráfico del nivel de remisión en respuesta al natalizumab cuando se administra a pacientes en un ensayo clínico de la enfermedad de Crohn (véase ejemplo 2).

La figura 3 muestra un gráfico del nivel de remisión en respuesta al natalizumab cuando se administra a pacientes en un ensayo clínico de la enfermedad de Crohn (véase ejemplo 2) en diversas poblaciones: la población con intención de tratar (ITT), la población con proteína C reactiva (CRP) elevada, la población insensible o intolerante a los inmunosupresores (inmuno UI) y la población insensible o intolerante a los esteroides, o dependiente de éstos (esteroides UID). Estas categorizaciones se basaron en los antecedentes del paciente respecto al uso previo de estos medicamentos.

Descripción detallada de la invención

Se debe comprender que la terminología utilizada en este documento tiene únicamente el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intercalado, hasta un décimo de la unidad del valor límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor indicado o intercalado en el rango establecido, está comprendido por la invención. Los límites superior e inferior de esos rangos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los rangos más pequeños, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención. También se contemplan todos los valores comprendidos dentro de los rangos citados.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que le da comúnmente un experto en el área a la que pertenece esta invención. Aunque también se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y los materiales preferidos se describen ahora.

1. Abreviaturas y definiciones

De conformidad con esta descripción detallada, aplican las abreviaturas y definiciones siguientes. Cabe destacar que, según se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto claramente estipule lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y la referencia a "la dosis" incluye la referencia a una o más dosis y sus equivalentes conocidos por los expertos en el área, etc.

5 Las publicaciones examinadas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación provistas pueden diferir de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

1.1 Abreviaturas

En este documento se utilizaron las abreviaturas siguientes

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ANA	Anticuerpos antinucleares
ac o ac.	Acuoso
BHE	Barrera hematoencefálica
C	Región constante de una inmunoglobulina
EC	Enfermedad de Crohn
IAEC	Índice de actividad de la enfermedad de Crohn
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDR	Región determinante de complementariedad
CDR1	Región determinante de complementariedad 1
CDR2	Región determinante de complementariedad 2
CDR3	Región determinante de complementariedad 3
SNC	Sistema nervioso central
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CRP	Proteína C reactiva
SC	Síndrome de Cockayne
CSF	Factor estimulante de colonias
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalomiелitis autoinmunitaria experimental
EBNA2	Antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr
MEC	Matriz extracelular
ELAMS	Moléculas de adhesión endotelial

ES 2 554 754 T3

ME	Microscopia electrónica
FACS	Clasificador de células activadas por fluorescencia
FR	Región marco
FR1	Región marco 1
FR2	Región marco 2
FR3	Región marco 3
GM-CSF	Factor estimulante de las colonias de granulocitos y monocitos
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
h o hr	Hora
H	Cadena pesada de una inmunoglobulina
HAMA	Anticuerpo humano anti-ratón
H-E	Hematoxilina-eosina
hex A	Hexoaminidasa A
HIC	Cromatografía de interacción hidrófoba
HIG	Inmunoglobulina humana
HMSN IV	Neuropatía hereditaria motora y sensorial IV (también conocida como heredopatía atáctica polineuritifórmis)
H ₂ O	Agua
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-8	Interleucina-8
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
CEII	Cuestionario sobre la enfermedad inflamatoria intestinal

ES 2 554 754 T3

inmuno UI	Población insensible o intolerante a los inmunosupresores
ITT	Intención de tratar (incluye todos los sujetos aleatorizados independientemente de si fueron dosificados)
L	Cadena ligera de una inmunoglobulina
LFA-1	Antígeno 1 asociado a función del linfocito (también conocido como integrina β_2 , CD11a/CD18 y $\alpha_L\beta_2$)
MAb	Anticuerpos monoclonales
Mac-1	Integrina $\alpha_M\beta_2$ (también conocida como CD11b/CD18)
MAdCAM-1	Molécula de adhesión celular adresina de mucosa
MALDI/TOF MS	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo desorción/ionización láser asistida por matriz
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MeOH	Metanol
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta
MLD	Leucodistrofia metacromática
EM	Esclerosis múltiple
N	Normal
AINE	Antiinflamatorio no esteroide
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PKU	Fenilcetonuria
PLP	Proteína proteolipídica
ARN	Ácido ribonucleico
ta	Temperatura ambiente
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
EAG	Evento adverso grave
SDS PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SF-36	Cuestionario de calidad de vida

SAMIs	Inhibidores selectivos de las moléculas de adhesión
sat o sat.	Saturado
scFv	Fragmento Fv monocatenario
Esteroides UID	Población insensible o intolerante a los esteroides o dependiente de éstos
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
TLC o tlc	Cromatografía en capa delgada
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
V _H	Cadena pesada del dominio variable
V _L	Cadena ligera del dominio variable
VLA-4	Antígeno muy tardío 4 (también conocido como alfa-4 beta-1, $\alpha_4\beta_1$)

1.2 Definiciones

Las abreviaturas para los veintidós aminoácidos de origen natural siguen el uso convencional (IMMUNOLOGY-A SYNTHESIS (2ª ed., E. S. Golub & D. R. Gren, eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 1991)). Los estereoisómeros (p. ej., los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados de los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmethionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ej. 4-hidroxiprolina). Además, los aminoácidos se pueden modificar por glucosilación, fosforilación y similares.

En la notación de los polipéptidos de este documento, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxi-terminal, conforme al uso estándar y la convención. Análogamente, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarios es el extremo 5'; la dirección de las secuencias de polinucleótidos bicatenarios se indica como en dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de la transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se mencionan "como secuencias en dirección 5' (secuencia arriba)"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en dirección 3' (secuencia abajo)"

La frase "secuencia de polinucleótido" se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que se leen del extremo 5' al extremo 3'. Incluye los plásmidos autorreplicantes, los polímeros infecciosos de ADN o ARN y ADN o ARN no funcionales.

Las expresiones siguientes se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o la secuencia génica indicada en una lista de secuencias, o puede comprender una secuencia de ADN o génica completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud. Dado que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) contener una secuencia (es decir, una porción de la secuencia del polinucleótido completo) que sea similar entre los dos

polinucleótidos, y (2) puede contener además una secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos, se realiza habitualmente comparación de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos por comparación de las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", según se usa en este documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos donde una secuencia de polinucleótido se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y donde la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede abarcar adiciones o supresiones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no incluye adiciones ni supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de esos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics edición 7, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección, y se elige la mejor alineación (es decir la que resulta en el mayor porcentaje de similitud de secuencia en la ventana de comparación) generada por los diversos métodos. La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, en una base nucleótido por nucleótido) en la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales se encuentra la base de ácido nucleico (por ej., A, T, C, G, U o I) idéntica, para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Las expresiones "identidad sustancial" según se usa en este documento indica una característica de una secuencia de polinucleótido, en la que el polinucleótido contiene una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más generalmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, con frecuencia en una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula mediante la comparación de la secuencia de referencia con la secuencia del polinucleótido que puede incluir supresiones o adiciones que suman 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Según se aplica a polipéptidos, la expresión "identidad de secuencia" significa que los péptidos comparten aminoácidos idénticos en las posiciones correspondientes. La expresión "similitud de secuencia" significa péptidos que tienen aminoácidos idénticos o similares (es decir, sustituciones conservadoras) en las posiciones correspondientes. La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas óptimamente, por ejemplo mediante los programas GAP o BESTFIT usando los pesos de los huecos predeterminados, comparten al menos 80% de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 95% de identidad de secuencia o más (por ej., 99% de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticos se diferencian por sustituciones conservadoras de aminoácidos. La expresión "similitud sustancial" significa que dos secuencias peptídicas comparten los porcentajes correspondientes de similitud de secuencia.

La expresión "sustancialmente similar" según se usa en este documento pretende significar cualquier polipéptido que tiene una alteración en la secuencia de modo que un aminoácido funcionalmente equivalente es sustituido por uno o más aminoácidos en el polipéptido, produciendo así un cambio que no tiene efecto o tiene relativamente poco efecto sobre las propiedades de unión del polipéptido. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de una polaridad similar o un tamaño similar.

La expresión "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto constituye al menos 50 por ciento (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura constituirá más de aproximadamente 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Muy preferentemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición por métodos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Para el propósito de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan de la manera siguiente: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y el grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras consisten en el intercambio de un miembro de una de esas clases por otra.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de las inmunoglobulinas se designan Hx y Lxx respectivamente, donde "x" es un número que designa la posición de un aminoácido según el esquema de Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) (de aquí en adelante mencionado colectivamente como "Kabat"). Kabat enumera muchas secuencias de aminoácidos de anticuerpos para cada subclase y lista el aminoácido que más comúnmente ocurre para cada posición del residuo en esa subclase. Kabat utiliza un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia listada y este método para asignar números de residuos se ha convertido en estándar en el área. El esquema de Kabat es extensible a otros anticuerpos no incluidos en el compendio mediante alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso de Kabat. El uso del sistema de numeración de Kabat identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en anticuerpos diferentes. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo de ratón.

En general, el término "reactivo" o "agente" se utiliza para indicar una molécula biológicamente activa que se une al receptor de un ligando. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de estos que reaccionan inmunológicamente con el receptor VLA-4 o VCAM-1 pueden eliminar la necesidad de esteroides en un sujeto insensible o intolerante a los esteroides o dependiente de éstos. También se contemplan los péptidos o peptidomiméticos o compuestos relacionados que pueden actuar para unirse al receptor de la superficie celular, y se pueden preparar sintéticamente por métodos conocidos en el área.

Sin embargo, con referencia a la presente invención, el término "reactivo" o "agente" o "compuesto" sólo incluye natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste.

Un "agente economizador de esteroides" se refiere en general a los agentes que reducen o eliminan la necesidad de esteroides en un sujeto insensible o intolerante a los esteroides, o dependiente de éstos, que está en tratamiento con esteroides en una cantidad estadísticamente significativa. Por ejemplo, dichos agentes incluyen inmunoglobulinas (por ej., anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos o fragmentos producidos por vía recombinante), polipéptidos (p. ej., formas solubles de las proteínas ligandos de integrinas) y moléculas pequeñas, que cuando se administran en una cantidad eficaz, reducen o eliminan la necesidad de esteroides en un sujeto insensible o intolerante a los esteroides, o dependiente de éstos, que está en tratamiento con esteroides. Estos agentes pueden ser agentes anti-integrina α_4 (por ej. antagonistas anti- $\alpha_4\beta_1$ o anti- $\alpha_4\beta_7$) y agentes anti-VCAM-1. Sin embargo, con referencia a la presente invención, dichos agentes anti-integrina α_4 sólo incluyen natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste que cuando se administra en una cantidad eficaz para economizar esteroides reduce o elimina la necesidad de esteroides en un sujeto que es insensible o intolerante a los esteroides, o dependiente de éstos, y que está en tratamiento con esteroides.

La expresión "agente anti-integrina α_4 " se refiere en general a cualquier agente que se una específicamente a una integrina que comprende una subunidad α_4 e inhiba la actividad de la integrina.

La expresión "antagonista de la integrina" se refiere en general a cualquier agente que inhiba a las integrinas que contienen la subunidad α_4 de unirse a un ligando de integrina y/o un receptor. Por ejemplo, el antagonista de la integrina inhibe al dímero $\alpha_4\beta_1$ y/o al dímero $\alpha_4\beta_7$ de unirse a su(s) ligando(s) cognado(s). Dichos antagonistas pueden incluir generalmente anticuerpos anti-integrinas o proteínas que contienen anticuerpos homólogos, así como otras moléculas como formas solubles de las proteínas ligandos de las integrinas. Las formas solubles de las proteínas ligandos de las integrinas que contienen la subunidad α_4 incluyen en general VCAM-1 soluble, proteínas de fusión de VCAM-1, o proteínas de fusión bifuncionales VCAM-1/Ig.

Mediante "natalizumab" o "Tysabri®" se quiere dar a entender un anticuerpo humanizado contra VLA-4 como se describe en las patentes de Estados Unidos de propiedad común N° 5,840,299 y 6,033,665. También se conocen otros anticuerpos específicos contra VLA-4. Dichas inmunoglobulinas incluyen en general las inmunoglobulinas descritas en las patentes de Estados Unidos N° 6,602,503 y 6,551,593, la solicitud de Estados Unidos publicada N° 20020197233 (Relton et al.)

El término "eficacia" según se usa en este documento en el contexto de un régimen de dosificación crónico se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento en particular. La eficacia se puede medir basándose en el cambio en el curso de la enfermedad en respuesta a un agente de la presente invención. Por ejemplo, en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la eficacia se puede medir por la frecuencia de las recaídas en la EM recurrente-remitente, y por la presencia o ausencia de nuevas lesiones en el sistema nervioso central detectadas mediante métodos como IRM.

El término "éxito" según se usa en este documento en el contexto de un régimen de tratamiento crónico se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento en particular. Esto incluye un equilibrio entre eficacia, toxicidad (por ej., efectos secundarios y tolerancia del paciente a una formulación o forma farmacéutica), obediencia del paciente y similares. Para que un régimen de administración crónica se considere "exitoso" debe equilibrar diferentes aspectos de la atención del paciente y la eficacia para producir el resultado más favorable para el paciente.

La expresión "específicamente se une" o "se une específicamente" según se usa en este documento se refiere a la situación en la cual un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a otras

moléculas que no sean su contraparte de unión específica (por ej., una afinidad de aproximadamente 1000 veces o más por su contraparte de unión). En la presente invención, los compuestos pequeños como éster isopropílico de N-[N-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaproliil]-O-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, no mostrarán ninguna unión significativa a ningún polipéptido que no sea una integrina α_4 o un receptor que comprenda una integrina α_4 . Por ejemplo, los compuestos pequeños utilizados en los métodos de la invención que se unen a una integrina α_4 con una afinidad de unión mayor a 0.3 nM se dice que se unen específicamente a una integrina α_4 .

Las expresiones "provoca una respuesta inmunitaria" y "provoca una respuesta inmunitaria del huésped" según se usan en este documento se refieren a la producción de una respuesta inmunitaria a un receptor que comprende una integrina α_4 en un sujeto luego de la introducción de un agente de la invención en el sujeto. Una respuesta inmunitaria en el sujeto se puede caracterizar por la reactividad del suero con un receptor de la integrina α_4 que sea al menos dos veces la de un sujeto sin tratar, más preferentemente tres veces la reactividad de un sujeto sin tratar, e incluso más preferentemente al menos cuatro veces la reactividad de un sujeto sin tratar, midiéndose la inmunorreactividad del suero con una dilución del suero de aproximadamente 1:100.

La expresión "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" pretende dar a entender cualquier compuesto utilizado para formar una parte de la formulación, que se pretende que actúe simplemente como un portador, es decir, que no se pretende que tenga una actividad biológica propia. El portador o excipiente farmacéuticamente aceptable es generalmente seguro, atóxico y no es indeseable desde el punto de vista biológico ni de otra manera. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable según se usa en esta memoria y las reivindicaciones incluye uno o más de dichos portadores.

Los términos "tratar", "tratamiento" y similares según se usan en este documento significan en general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Más específicamente, el reactivo de la presente invención se usa para reducir o eliminar la necesidad de esteroides en un sujeto que es insensible o intolerante a los mismos, o dependiente de éstos, que está en tratamiento con esteroides. Por lo tanto, el efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir o prevenir parcialmente una enfermedad, un síntoma o una afección de ésta y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, una afección, un síntoma o un efecto adverso atribuido a la enfermedad dependiendo de la afección o la enfermedad que se está tratando. El término "tratamiento" según se usa en este documento abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente a un ser humano e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a dicha enfermedad pero que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir detener su evolución; o (c) aliviar la enfermedad es decir, causar la regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o afecciones. La invención está dirigida a tratar el sufrimiento de una enfermedad de un paciente que está relacionada con inflamación patológica. La presente invención está implicada en la prevención, la inhibición o el alivio de los efectos adversos atribuidos a la inflamación patológica, preferentemente una enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn, asma, EM, AR o diversas espondiloartropatías, durante largos períodos de tiempo y/o que sean causadas por las respuestas fisiológicas a una inflamación inadecuada presente en un sistema biológico durante largos períodos de tiempo.

Mediante "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere dar a entender una cantidad de un agente, un reactivo o una combinación de reactivos que cuando se administra a un mamífero es suficiente para reducir o eliminar la necesidad de esteroides en un sujeto que es insensible o intolerante a los mismos, o dependiente de éstos, que está en tratamiento con esteroides en una cantidad estadísticamente significativa.

Con la expresión "cantidad eficaz para economizar esteroides" se quiere dar a entender una cantidad del agente, el reactivo o la composición de la presente invención eficaz para reducir o eliminar la necesidad de esteroides en un sujeto que es insensible o intolerante a los mismos, o dependiente de éstos, que está en tratamiento con esteroides en una cantidad estadísticamente significativa. La "cantidad eficaz para economizar esteroides" variará dependiendo del compuesto o la composición, la enfermedad específica a tratar y su gravedad, y la edad, el peso, etc. del mamífero que se va a tratar.

Mediante "administración crónica" se quiere dar a entender la administración del agente, el reactivo o la terapia de combinación de la invención en una cantidad y con una periodicidad que resulten en la reducción o la eliminación de la necesidad de esteroides en un sujeto que es insensible o intolerante a los mismos, o dependiente de éstos, que está en tratamiento con esteroides. La administración es preferentemente quincenal, semanal, mensual o cada dos meses, pero puede ser diaria. Más preferentemente, el tratamiento es semanal o mensual y se administra durante 6 meses a varios años o el resto de la vida del paciente según la enfermedad o afección a tratar.

Otras definiciones correspondientes a los compuestos de fórmula I a fórmula IX son las definidas en ellas.

2. Aspectos generales de la invención

2.1 Enfermedades y afecciones

Las enfermedades o afecciones siguientes se pueden tratar y prevenir con el agente economizador de esteroides de la presente invención.

2.1.1 Enfermedades inflamatorias intestinales

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es el nombre general dado enfermedades que causan inflamación en los intestinos. Las enfermedades inflamatorias intestinales incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

2.1.1.1 Enfermedad de Crohn

5 La enfermedad de Crohn causa inflamación en el intestino delgado. La enfermedad de Crohn se produce habitualmente en la parte inferior del intestino delgado, es decir el íleon, pero puede afectar cualquier parte del tubo digestivo. La inflamación se extiende profundamente en el revestimiento del órgano afectado, causando dolor y haciendo que los intestinos se vacíen con frecuencia. La enfermedad de Crohn también se denomina ileítis o enteritis. La enfermedad de Crohn afecta a hombres y mujeres por igual y puede darse en algunas familias.
10 Alrededor del 20 por ciento de las personas con enfermedad de Crohn tienen un pariente sanguíneo con algún tipo de enfermedad inflamatoria intestinal.

La causa de la enfermedad de Crohn es incierta. Una teoría es que el sistema inmunitario reacciona a un virus o una bacteria causando inflamación continua en el intestino. Los pacientes que sufren de enfermedad de Crohn suelen tener anomalías del sistema inmunitario, pero no está claro si estas anomalías son causa o resultado de la enfermedad.
15

Los síntomas más comunes de la enfermedad de Crohn incluyen dolor abdominal, a menudo en la zona inferior derecha y diarrea. También pueden producirse hemorragia rectal, pérdida de peso y fiebre. La hemorragia puede ser grave y persistente, resultando en anemia. Los niños con enfermedad de Crohn pueden sufrir retraso en el desarrollo e inhibición del crecimiento.

20 La complicación más común de la enfermedad de Crohn es la obstrucción intestinal. La obstrucción se produce porque la enfermedad de Crohn causa un engrosamiento de la pared intestinal con inflamación y tejido cicatricial, estrechando el pasaje intestinal. La enfermedad de Crohn también puede causar llagas y úlceras que forman túneles a través de la zona afectada en los tejidos circundantes como la vejiga, la vagina o la piel. Los túneles denominados fístulas, son una complicación común y a menudo se infectan. A veces las fístulas se pueden tratar con medicación pero a menudo requieren cirugía.
25

Las complicaciones nutricionales, como deficiencias de proteínas, calorías y vitaminas, son comunes en la enfermedad de Crohn. Otras complicaciones asociadas a la enfermedad de Crohn incluyen artritis, problemas cutáneos, inflamación en los ojos o la boca, cálculos renales, cálculos biliares u otras enfermedades del hígado y del sistema biliar.

30 El tratamiento para la enfermedad de Crohn depende de la localización y la gravedad de la enfermedad, las complicaciones y la respuesta al tratamiento anterior. Los objetivos del tratamiento son controlar la inflamación, corregir las deficiencias nutricionales y aliviar los síntomas como dolor abdominal, diarrea y rectorragias. El tratamiento puede incluir medicamentos, suplementos nutricionales, cirugía o una combinación de estas opciones. En este momento, el tratamiento no cura. Algunos pacientes tienen largos períodos de remisión, sin síntomas. Sin embargo, la enfermedad de Crohn se repite generalmente en varias ocasiones a lo largo de la vida de una persona. Predecir cuándo puede producirse una remisión o cuándo volverán los síntomas no es posible.
35

La mayoría de los pacientes es tratada primero con fármacos que contienen mesalamina, una sustancia que ayuda a controlar la inflamación. La sulfasalazina también se usa comúnmente. Los pacientes que no se benefician de ella, o que no la pueden tolerar, pueden tratarse con otros fármacos que contienen mesalamina, conocidos generalmente como agentes 5-ASA, como Dipentum® o Pentasa®. Los posibles efectos secundarios de las preparaciones de mesalamina incluyen náuseas, vómitos, acidez gástrica, diarrea y cefalea.
40

Algunos pacientes reciben esteroides, como budesonida, para controlar la inflamación. Estos fármacos son los más eficaces para la enfermedad de Crohn activa, pero pueden causar efectos secundarios graves como mayor propensión a la infección. Los fármacos supresores del sistema inmunitario también se usan para tratar la enfermedad de Crohn. Los más comunes incluyen la 6-mercaptopurina y azatioprina. Los inmunosupresores actúan bloqueando la inmunorreacción que contribuye a la inflamación. Estos fármacos pueden causar efectos secundarios como náuseas, vómitos y diarrea y disminuir la resistencia del paciente a la infección.
45

Los antibióticos se utilizan para tratar el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado causado por estenosis, fístulas o cirugía previa. Para este problema común, el médico puede prescribir antibióticos como ampicilina, sulfonamida, cefalosporina, tetraciclina o metronidazol.
50

También se usan productos biológicos en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Infliximab (Remicade®) está indicado para el tratamiento de la enfermedad de Crohn moderada a grave que no responde a las terapias estándar (es decir, sustancias de mesalamina, corticosteroides e inmunosupresores) y para el tratamiento de fístulas abiertas, que drenan. Infliximab es una sustancia anti-factor de necrosis tumoral (TNF). TNF es una proteína producida por el sistema inmunitario que puede causar la inflamación asociada a la enfermedad de Crohn.
55

Una cirugía para extraer una parte del intestino puede ayudar en la enfermedad de Crohn pero no la cura. La inflamación tiende a volver al área del intestino próxima a la que se ha extraído. Muchos pacientes con enfermedad de Crohn necesitan cirugía, o bien para aliviar los síntomas que no responden a la terapia médica, o para corregir complicaciones como obstrucción, perforación, absceso o hemorragia intestinal. Algunos pacientes necesitan que se les extirpe todo el colon por colectomía. Véanse Harrison's PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE; 13ª Ed., (1994) McGraw Hill, Nueva York, pp. 1403-1405; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE; 58ª Ed. (2004) Thomson PDR, Montvale, NJ, pp. 402, 1130, 2707, 3153-3155, 3173.

2.1.1.2 Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa es una enfermedad crónica, inflamatoria y ulcerosa, que se presenta en la mucosa colónica. Se desconoce la causa de la colitis ulcerosa. La evidencia sugiere que una predisposición genética causa una respuesta inmunitaria intestinal desregulada a un agente ambiental, de la dieta o infeccioso. Sin embargo, no se ha identificado ningún antígeno instigador.

Los cambios patológicos comienzan con degeneración de las fibras de reticulina por debajo del epitelio de la mucosa, obstrucción de los capilares subepiteliales y progresiva infiltración de la lámina propia con células plasmáticas, eosinófilos, linfocitos y mastocitos. En última instancia se producen abscesos de cripta, necrosis epitelial y ulceración de la mucosa. La enfermedad comienza generalmente en el rectosigmoide y se puede extender a todo el colon, o puede involucrar a la mayor parte del intestino grueso.

Los síntomas incluyen diarrea con sangre, peritonitis y toxemia profunda. Algunos casos surgen después de una infección documentada (es decir, por amebiasis o disentería bacilar). Puede haber malestar general, fiebre, anemia, anorexia, pérdida de peso, leucocitosis e hipoalbuminemia. La hemorragia es la complicación local más común. Otra complicación grave, la colitis tóxica, se produce cuando la extensión de la ulceración produce íleo localizado y peritonitis. A medida que progresa la colitis tóxica, el colon pierde tono muscular y comienza a dilatarse en el transcurso de horas o días.

Existe megacolon tóxico (o dilatación tóxica) cuando el diámetro del colon transversal supera los 6 centímetros, lo que resulta en fiebre alta, leucocitosis, dolor abdominal y sensibilidad de rebote. El tratamiento debe hacerse en las primeras etapas para evitar complicaciones peligrosas, como perforación, peritonitis generalizada y septicemia. La incidencia del cáncer de colon aumenta cuando está implicado todo el colon y la enfermedad dura más de diez años, independientemente de la actividad de la enfermedad. Aunque la incidencia de cáncer es mayor en los casos de colitis ulcerosa universal, el riesgo aumenta significativamente con cualquier extensión de la colitis ulcerosa por encima del sigmoide.

Otras complicaciones incluyen artritis periférica, espondilitis anquilosante, sacroileítis, uveítis anterior, eritema nodoso, complicaciones cutáneas, y en los niños, retraso del crecimiento y el desarrollo. Se puede manifestar una enfermedad hepática como hígado graso o más gravemente hepatitis autoinmunitaria, colangitis esclerosante primaria o cirrosis.

La colitis ulcerosa es crónica y tiene repetidas remisiones y exacerbaciones. Casi un tercio de los pacientes con colitis ulcerosa extensa requiere cirugía. La proctocolectomía total es curativa: la esperanza de vida y la calidad de vida se restauran a su estado normal, y se elimina el riesgo de cáncer de colon.

Los síntomas de colitis ulcerosa pueden responder a medicamentos antidiarreicos y cambios en la dieta. Los síntomas de moderados a graves pueden requerir uno o más medicamentos. Para la enfermedad sólo en el recto, se indica terapia tóxica. La inflamación en todo el colon requiere medicación que actúe sobre todo el cuerpo, como los medicamentos inmunosupresores (azatioprina, 6-mercaptopurina o ciclosporina) y para controlar la inflamación (esteroides). Véanse HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE; 13ª Ed., (1994) McGraw Hill, Nueva York, pp. 1403-1405; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE; 58ª Ed. (2004) Thomson PDR, Montvale, NJ, pp. 402, 1130, 2707, 3153-3155, 3173.

2.1.2 Enfermedad injerto contra huésped (EICH) y enfermedad huésped contra injerto

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) es un trastorno raro que puede atacar a las personas cuyo sistema inmunitario está suprimido y, o bien han recibido una transfusión de sangre o un trasplante de médula ósea. La enfermedad huésped contra injerto se produce en pacientes con el sistema inmunitario suprimido y que recibieron un trasplante de órgano. Los síntomas para estas afecciones pueden incluir urticaria, problemas intestinales similares a la colitis y disfunción hepática.

Con EICH, los linfocitos T de un donante inmunológicamente competente reaccionan contra los antígenos de un receptor inmunológicamente deprimido. Los síntomas de la EICH aguda incluyen fiebre, dermatitis exfoliativa, hepatitis con hiperbilirrubinemia, vómitos, diarrea y dolor abdominal, que pueden progresar a un íleo y pérdida de peso. EICH continúa siendo la principal causa de morbilidad grave después de trasplantes de médula ósea (BMT) alogeneicos.

Aproximadamente 1/3 a 1/2 de los receptores de trasplantes de médula ósea presentan una forma crónica de EICH. Aunque la piel, el hígado y el intestino siguen siendo los órganos principalmente afectados, también se observan otras áreas de implicación (es decir, articulación, pulmón). En última instancia, 20 a 40% de los pacientes mueren de las complicaciones asociadas a la EICH.

- 5 Un método de tratamiento es la eliminación de las células de la médula del donante con anticuerpos monoclonales, usando una técnica de formación de rosetas o separación mecánica, antes de la reinfusión de la médula. El agotamiento de linfocitos T ha sido muy eficaz para disminuir tanto la incidencia como la gravedad de EICH. Sin embargo, la incidencia del fracaso del injerto y la recidiva son mayores. Una posible explicación es que las citocinas generadas en la reacción de injerto contra huésped promueven la multiplicación de células madre y la maduración necesaria para el injerto. Otros agentes utilizados para prevenir o tratar EICH incluyen metotrexato, corticosteroides y anticuerpos monoclonales contra antígenos expresados en linfocitos T maduros.

- 10 También se puede producir EICH luego de transfusiones de sangre en casos excepcionales, porque incluso una pequeña cantidad de linfocitos T del donante puede causar EICH. Estos casos incluyen transfusiones de sangre fetales intrauterinas y transfusiones en pacientes inmunodeprimidos, como los receptores de trasplante de médula ósea, o que sufren leucemia, linfoma, neuroblastoma, enfermedad de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano. Véase THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION (1997), Merck Research Laboratories, West Point, PA, pp. 836-837.

2.1.3 Esclerosis múltiple

- 20 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica crónica, que aparece en la edad adulta temprana y progresa a una discapacidad significativa en la mayoría de los casos. Hay aproximadamente 350 000 casos de EM sólo en los Estados Unidos. Aparte del traumatismo, la EM es la causa más frecuente de discapacidad neurológica en la edad adulta temprana a media.

- 25 La causa de la EM todavía debe ser determinada. La EM se caracteriza por la inflamación crónica, desmielinización y gliosis (cicatrices). La desmielinización puede resultar en efectos ya sea positivos o negativos en la conducción axonal. Las anomalías de conducción positivas incluyen conducción axonal enlentecida, bloqueo variable de la conducción que se produce en presencia de trenes de impulsos de alta pero no baja frecuencia o bloqueo completo de la conducción. Las anomalías de la conducción positiva incluyen generación de impulsos ectópicos, espontáneamente o luego de esfuerzos mecánicos y "cross-talk" (interferencia) anómala entre exones desmielinizados.

- 30 Se ha observado que los linfocitos T reactivos contra las proteínas de la mielina, ya sea proteína básica de mielina (MBP) o proteína proteolipídica de mielina (PLP) son mediadores de la inflamación del SNC en la encefalomyelitis alérgica experimental. También se ha observado que los pacientes tienen elevados niveles de inmunoglobulina (Ig) del SNC. Además es posible que algo del daño tisular observado en la esclerosis múltiple sea mediado por productos de citocina de los linfocitos T activados, los macrófagos o los astrocitos.

- 35 Al día de hoy, 80% de los pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple vive 20 años después del inicio de la enfermedad. Las terapias para el manejo de EM incluyen (1) tratamiento dirigido a modificar el curso de la enfermedad, incluido el tratamiento de la exacerbación aguda y dirigido a la supresión a largo plazo de la enfermedad; (2) tratamiento de los síntomas de la esclerosis múltiple; (3) prevención y tratamiento de complicaciones médicas, y (4) manejo de los problemas personales y sociales secundarios.

- 40 El inicio de la EM puede ser dramático o tan leve que no provoque que el paciente busque atención médica. Los síntomas más comunes incluyen debilidad en una o más extremidades, visión borrosa debido a neuritis óptica, alteraciones sensoriales, ataxia y diplopía. El curso de la enfermedad puede ser estratificado en tres categorías generales: (1) EM recidivante (2) EM progresiva crónica y (3) EM inactiva. La EM recidivante se caracteriza por ataques recurrentes de disfunción neurológica. Los ataques de EM evolucionan generalmente en días a semanas y pueden ser seguidos por una recuperación parcial o completa, o ninguna recuperación. La recuperación de los ataques se produce generalmente en un plazo de semanas a varios meses desde el pico de los síntomas, aunque rara vez algo de la recuperación puede continuar durante 2 o más años.

- 45 La EM progresiva crónica resulta en un empeoramiento progresivo gradual sin períodos de estabilización ni remisión. Esta forma se presenta en pacientes con antecedentes de EM recidivante, aunque en el 20% de los pacientes, no pueden recordarse recaídas. Las recaídas agudas también pueden ocurrir durante el curso progresivo.

Una tercera forma es la EM inactiva. La EM inactiva se caracteriza por déficits neurológicos fijos de magnitud variable. La mayoría de los pacientes con EM inactiva tienen antecedentes de EM recidivante.

- 55 La evolución de la enfermedad también depende de la edad del paciente. Por ejemplo, los factores de pronóstico favorable incluyen inicio temprano (excepto infantil), un curso recidivante y pequeña discapacidad residual 5 años después del inicio. Por el contrario, un mal pronóstico se asocia a una edad de inicio tardía (es decir, 40 años o más) y un curso progresivo. Estas variables son interdependientes, puesto que la EM progresiva crónica tiende a comenzar a una edad más tardía que la EM recidivante. La discapacidad de la EM progresiva crónica se debe

generalmente a paraplejía o cuadriplegia (parálisis) progresiva en los pacientes. En un aspecto de la invención, los pacientes se tratarán preferentemente cuando el paciente esté en remisión en vez de en un estado recidivante de la enfermedad.

- 5 El uso a corto plazo de la hormona adrenocorticotrópica o de corticosteroides orales (p. ej., prednisona oral o metilprednisolona intravenosa) es la única medida terapéutica específica para tratar pacientes con exacerbación aguda de la esclerosis múltiple.

Terapias más nuevas para la EM incluyen el tratamiento del paciente con interferón beta-1b, interferón beta-1a y Copaxone® (antes conocido como copolímero 1). Estos tres fármacos han demostrado reducir significativamente la tasa de recidiva de la enfermedad. Estos fármacos se autoadministran por vía intramuscular o subcutánea.

10 **2.1.4 Asma**

El asma es una enfermedad del sistema respiratorio que implica la inflamación de los bronquios o vías respiratorias que llevan aire a los pulmones. Las vías respiratorias reaccionan de manera exagerada a los alérgenos, así como al humo, el aire frío y/u otros factores ambientales. Las vías respiratorias se estrechan produciendo dificultad para respirar. Los alérgenos pueden causar inflamación crónica.

- 15 El asma aparece a menudo en la niñez o la adolescencia y es la enfermedad crónica infantil más común. La mayoría de los casos de asma puede ser controlada. Sin embargo, en casos graves, los ataques de asma pueden causar la muerte. El número de casos de asma ha aumentado constantemente en los últimos 30 años, lo que la convierte en uno de los principales problemas de salud pública en los Estados Unidos y el resto del mundo.

- 20 El asma es causada por factores genéticos, ambientales e inmunológicos, que se combinan para causar la inflamación que puede conducir a episodios de asma. En algunos pacientes, las vías respiratorias inflamadas reaccionan de manera exagerada a sustancias del ambiente, como el humo o el aire frío. En otros pacientes, el sistema inmunitario libera células que causan la inflamación en respuesta a los alérgenos.

- 25 El asma puede aparecer en diferentes momentos y debido a diversos factores. El humo del cigarrillo y la contaminación del aire pueden provocar un ataque. Además, las expresiones de emociones fuertes como reír o llorar mucho, pueden provocar un ataque,

Los síntomas de un episodio de asma pueden ser de leves a graves y pueden incluir, pero no exclusivamente, sibilancias, tos, opresión en el pecho, respiración rápida poco profunda o dificultad para respirar, falta de aliento y cansancio que surge rápidamente durante el ejercicio.

- 30 El tratamiento consiste en tomar medicación para controlar los episodios de inflamación y asma, y evitar las sustancias que aumenten la inflamación. Si la inflamación no se controla, el asma puede llevar a cambios permanentes en los bronquios.

- 35 Los corticosteroides inhalados (como budesonida y fluticasona), reducen la inflamación y son un tratamiento común para el asma persistente. En casos raros, se pueden utilizar corticosteroides orales (como prednisona y dexametasona) para ayudar a controlar el asma. También pueden ser indicados agonistas beta2 de acción prolongada (como salmeterol y formoterol). Los medicamentos que se administran para el alivio rápido incluyen los agonistas beta2 de acción rápida (como salbutamol y terbutalina) y los anticolinérgicos (tales como ipratropio). Véase THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION (1997), Merck Research Laboratories, West Point, PA, pp. 133-137.

2.1.5 Artritis reumatoide

- 40 La artritis reumatoide (AR) es un síndrome crónico caracterizado por inflamación de las articulaciones periféricas, que da por resultado la destrucción progresiva de las estructuras articulares y periarticulares. Se desconoce la causa de la artritis reumatoide. Sin embargo, se ha identificado una predisposición genética y, en las poblaciones blancas, se ha localizado un pentapéptido en el locus HLA-DR 1 de genes de histocompatibilidad de clase II. Los factores ambientales también pueden jugar un papel. Los cambios inmunológicos pueden ser iniciados por múltiples factores.
- 45 Aproximadamente el 1% de todas las poblaciones se ve afectado, las mujeres dos a tres veces más a menudo que los hombres. El inicio puede ser a cualquier edad, más a menudo entre los 25 y 50 años.

- 50 Las anomalías inmunológicas prominentes que pueden ser importantes en la patogenia son complejos inmunitarios que se encuentran en las células del líquido articular y en vasculitis. Las células plasmáticas producen anticuerpos que contribuyen a estos complejos. Los linfocitos que infiltran el tejido sinovial son principalmente linfocitos T cooperadores, que pueden producir citocinas proinflamatorias. El aumento de moléculas de adhesión contribuye a la emigración de células inflamatorias y retención en el tejido sinovial.

Se producen nódulos reumatoides hasta en un 30% de los pacientes, generalmente subcutáneamente en los sitios de irritación crónica. Se puede encontrar vasculitis en la piel, los nervios o los órganos viscerales en los casos graves de AR pero es clínicamente significativa sólo en unos pocos casos.

El inicio es normalmente insidioso, con compromiso articular progresivo, pero puede ser abrupto, con inflamación simultánea en múltiples articulaciones. Son comunes la sensibilidad en casi todas las articulaciones inflamadas y el engrosamiento sinovial. Las manifestaciones iniciales se pueden producir en cualquier articulación.

5 Es común una rigidez que dura menos de 30 minutos que se presenta en la mañana o después de inactividad prolongada. Los nódulos reumatoides subcutáneos no son generalmente una manifestación precoz. Otras manifestaciones son nódulos viscerales, vasculitis que causa úlceras en la pierna o mononeuritis múltiple, efusiones pleurales o pericárdicas, linfadenopatía, síndrome de Felty, síndrome de Sjögren y episcleritis. Puede haber fiebre.

10 Tanto como el 75% de los pacientes mejoran sintomáticamente con el tratamiento conservador durante el primer año de la enfermedad. Sin embargo, menos del 10% quedan finalmente considerablemente discapacitados a pesar del tratamiento completo. La enfermedad afecta en gran medida la vida de la mayoría de los pacientes con AR. Ocasionalmente se indica reposo total en cama por un corto período durante la fase más activa y dolorosa de la enfermedad grave. En casos menos graves, se debe prescribir reposo regular.

15 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos pueden brindar un alivio sintomático importante y pueden ser adecuados como tratamiento simple para la AR leve, pero no parecen alterar el curso a largo plazo de la enfermedad. Se pueden utilizar para el tratamiento salicilatos como la aspirina.

20 Generalmente se indican compuestos de oro además de los salicilatos u otros AINE si los últimos no alivian suficientemente el dolor o suprimen la inflamación articular activa. En algunos pacientes, el oro puede producir la remisión clínica y disminuir la formación de nuevas erosiones óseas. Las preparaciones parenterales contienen tiomalato sódico de oro o tioglucosa de oro. El oro se debe discontinuar cuando aparece cualquiera de las manifestaciones anteriores. Manifestaciones tóxicas menores (p. ej., prurito leve, erupción menor) se pueden eliminar temporalmente suspendiendo la terapia de oro, y luego reanudándola cuidadosamente aproximadamente 2 semanas después de que los síntomas hayan cedido. Sin embargo, si los síntomas tóxicos progresan, se debe discontinuar el oro y administrar un corticosteroide al paciente. Para la dermatitis leve por oro se indica un corticosteroide tópico o prednisona oral 15 a 20 mg/día en dosis fraccionadas; pueden ser necesarias dosis más grandes para las complicaciones hematológicas. Se puede administrar un fármaco quelante del oro, dimercaprol 2.5 mg/kg IM, cuatro a seis veces por día durante los primeros 2 días y 2 veces al día de 5 a 7 días después de una reacción considerable al oro.

30 La hidroxiclороquina también puede controlar los síntomas de AR leve o moderadamente activa. Los efectos tóxicos generalmente son leves y son dermatitis, miopatía y opacidad corneal generalmente reversible. Sin embargo, se ha informado de degeneración retiniana irreversible. También se puede utilizar sulfasalazina para el tratamiento de la AR.

35 La penicilamina oral puede tener un beneficio similar al oro y se puede utilizar en algunos casos si el oro fracasa o produce toxicidad en pacientes con AR activa. Los efectos secundarios que requieren que se discontinúe son más comunes que con el oro e incluyen supresión de la médula ósea, proteinuria, nefrosis, otros efectos tóxicos graves (p. ej., miastenia grave, pénfigo, síndrome de Goodpasture, polimiositis, un síndrome similar al lupus), erupción cutánea y sabor desagradable en la boca.

40 Los esteroides son los antiinflamatorios más eficaces a corto plazo. Sin embargo, su beneficio clínico para la AR a menudo disminuye con el tiempo. Los esteroides como era de esperarse no previenen el avance de la destrucción articular. Además, a la supresión de los corticosteroides le sigue un rebote importante en la enfermedad activa. Las contraindicaciones al uso de esteroides incluyen úlcera péptica, hipertensión, infecciones no tratadas, diabetes mellitus y glaucoma.

Los fármacos inmunosupresores se utilizan cada vez más en el manejo de la AR activa grave. Sin embargo, pueden producirse efectos secundarios graves, como hepatopatía, neumonitis, supresión de la médula ósea, y después del uso prolongado de azatioprina, tumor.

45 La férula articular reduce la inflamación local y puede aliviar los síntomas locales graves. Es importante el ejercicio activo para recuperar la masa muscular y conservar el intervalo normal de movimiento de las articulaciones a medida que la inflamación cede pero no debe ser agotador. Se puede realizar cirugía mientras la enfermedad está activa.

2.1.6 Espondiloartropatías

50 Las espondiloartropatías son una familia de enfermedades que incluyen espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter y artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal.

2.1.6.1 Espondilitis anquilosante,

55 La espondilitis anquilosante (EA) es una forma de artritis que es crónica y muy a menudo afecta la columna. Causa fatiga, dolor y rigidez, con hinchazón y limitación del movimiento en la parte baja y media de la espalda, el cuello y las caderas. Aunque no existe cura, el tratamiento puede controlar generalmente los síntomas y evitar que la

afección empeore. Las complicaciones de la espondilitis anquilosante incluyen iritis, dificultad para respirar debido a la curvatura de la parte superior del cuerpo y rigidez de la pared torácica.

5 Con el tiempo, la inflamación continua de los ligamentos y articulaciones de la columna hace que la columna se fusione (anquilosis), lleva a la pérdida de movimiento en el cuello y la parte baja de la espalda. A medida que la columna vertebral se fusiona o se endurece, puede producirse una deformación fija de arqueado hacia delante (cifosis), que da lugar a una importante discapacidad. La inflamación de la espondilitis anquilosante puede afectar otras partes del cuerpo, más comúnmente otras articulaciones y los ojos, pero a veces los pulmones y las válvulas cardíacas.

10 La espondilitis anquilosante afecta a 1 de cada 100 personas. Es más común en hombres que en mujeres, y la afección comienza generalmente en la adolescencia tardía o la edad adulta temprana. El tratamiento incluye ejercicio y terapia física para ayudar a reducir la rigidez y mantener una buena postura y movilidad, y medicamentos para el dolor y la inflamación, como esteroides.

2.1.6.2 Artritis psoriásica

15 La artritis psoriásica (APs) se caracteriza por una inflamación de las articulaciones que se presenta en algunos pacientes con psoriasis. La artritis psoriásica tiene los síntomas de otros tipos de artritis como articulaciones rígidas, dolorosas e inflamadas. La artritis psoriásica sin tratar puede causar pérdida de masa ósea y deformación de las articulaciones. El dolor y la inflamación de la artritis psoriásica son causados por un sistema inmunitario hiperactivo, que inflama los tejidos alrededor de la articulación. Los síntomas se reagudizan y ceden periódicamente. La artritis simétrica es el tipo más común de artritis psoriásica, que constituye alrededor del 50% de todos los casos. Los síntomas se producen en ambos lados del cuerpo. Los síntomas son similares a los de la artritis reumatoide, y la artritis simétrica puede causar daño permanente en las articulaciones. La artritis asimétrica, el segundo tipo más común de artritis psoriásica, es más leve y sólo causa síntomas en un lado del cuerpo.

25 La artritis distal interfalángica predominante (DIP), una forma menos común de artritis psoriásica, afecta las articulaciones próximas a las uñas de las manos y los pies. Las uñas también son a menudo afectadas por la afección. La espondilitis puede hacer que el movimiento sea doloroso, especialmente en el cuello y espalda. También puede causar inflamación de la columna vertebral. La artritis mutilante es una forma con frecuencia debilitante y destructiva de la artritis psoriásica. A menudo afecta las manos y los pies, así como la espalda y el cuello, y puede dar lugar a una deformidad permanente.

30 Los síntomas de artritis psoriásica son similares a los de otros tipos de artritis. Incluyen rigidez en las articulaciones, dolor o hinchazón en las articulaciones, irritación y enrojecimiento del ojo. Los síntomas habituales de la psoriasis incluyen parches rojos y escamosos de la piel.

35 Los tratamientos comunes incluyen antiinflamatorios no esteroides (AINE). Éstos incluyen una serie de analgésicos sin receta, como aspirina e ibuprofeno. Sin embargo, el uso crónico de estos medicamentos puede ser peligroso y causar problemas gastrointestinales. Los inhibidores de COX-2 son una clase de AINE que a menudo se utilizan para tratar la artritis psoriásica. Los efectos secundarios incluyen náuseas y cefalea.

40 Los inmunosupresores son fármacos más potentes que se utilizan para casos de artritis psoriásica que no responden a medicamentos más suaves. Los fármacos de esta clase se utilizan para el tratamiento sistémico de la psoriasis, como metotrexato, que actúa por supresión del sistema inmunitario. También pueden causar efectos secundarios graves y aumentar el riesgo de infección. A menudo también se prescribe azulfidina. Ciertos fármacos utilizados para prevenir el paludismo pueden ayudar con los síntomas, y a veces también se prescriben para la artritis psoriásica.

45 Los esteroides orales se indican a menudo para ayudar a quitar el dolor agudo en las articulaciones, aunque los esteroides no se pueden usar con seguridad por períodos prolongados de tiempo. Sin embargo, interrumpir repentinamente el tratamiento con esteroides también puede provocar una reagudización de los síntomas. También se usan productos biológicos para tratar la psoriasis. Actúan dirigiéndose a la respuesta del sistema inmunitario que causa los síntomas de la psoriasis, impidiendo que las articulaciones se inflamen. Los medicamentos biológicos también pueden volver al sistema inmune más propenso a las infecciones.

2.1.6.3 Síndrome de Reiter

50 El síndrome de Reiter, también llamado artritis reactiva, es una forma de artritis que, además de las articulaciones, también afecta los ojos, la uretra y la piel.

El síndrome de Reiter se caracteriza por una serie de síntomas en distintos órganos del cuerpo que pueden o no aparecer al mismo tiempo. La enfermedad puede ser aguda o crónica, con remisiones o recidivas repentinas. El síndrome de Reiter afecta principalmente a varones entre los 20 y 40 años de edad. Los que tienen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) corren un riesgo particularmente alto.

Se desconoce la causa del síndrome de Reiter, pero la investigación sugiere que la enfermedad es causada por una combinación de predisposición genética y otros factores. El síndrome de Reiter sigue a menudo a una infección con *Chlamydia trachomatis* o *Ureaplasma urealyticum*.

5 Los primeros síntomas del síndrome de Reiter son inflamación de la uretra o de los intestinos, seguida de artritis. La artritis afecta generalmente las articulaciones de los dedos, los dedos de los pies, los tobillos, las caderas y la rodilla. Otros síntomas incluyen inflamación de la uretra, con dolor al orinar y secreción, úlceras en la boca, inflamación del ojo y queratodermia blenorragica (parches de piel escamosa en las palmas, las plantas, el tronco o el cuero cabelludo).

10 No existe ningún tratamiento específico para el síndrome de Reiter. La inflamación articular se trata generalmente con antiinflamatorios no esteroides (AINE). Las erupciones cutáneas y la inflamación ocular se pueden tratar con esteroides. El pronóstico para el síndrome de Reiter varía. Algunos pacientes sufren complicaciones que incluyen inflamación del músculo cardíaco, inflamación con rigidez de la columna vertebral, glaucoma, ceguera progresiva, anomalías de los pies o acumulación de líquido en los pulmones.

15 Otras espondiloartropatías incluyen, pero no exclusivamente, espondilitis de enfermedad inflamatoria intestinal (SpA EI), espondiloartropatía indiferenciada (SpAi), espondiloartropatía juvenil (SpAj).

Véase THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION (1997), Merck Research Laboratories, West Point, PA, 243.

3. Administración

20 En sentido general, el método de la invención no implica ningún modo particular de administración, porque el modo de administración depende de la forma del principio activo y la formulación desarrollada para administrar dicho principio activo. Los modos de administración incluyen las vías de administración oral, parenteral (por ej., subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o intralesional), tópica, localizada (por ej., aplicación quirúrgica o supositorio quirúrgico), rectal y pulmonar y (por ej., aerosoles, inhalación o polvo). Preferentemente, la vía de administración es parenteral. La vía de administración se basa en la composición que se va a administrar (por ejemplo, la inmunoglobulina se administra por vía intravenosa mientras que los compuestos pequeños se administran por vía oral), el tejido que es el objetivo (por ej., la administración intratecal se dirige al sitio de una lesión de la médula ósea), etc., como bien saben los técnicos con experiencia.

30 Además, la inmunoglobulina anti- α_4 de la presente invención se puede combinar con otros compuestos o composiciones utilizados para tratar, mejorar o paliar síntomas asociados a una enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad de injerto contra huésped (EICH), enfermedad de huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías. Además, el compuesto dado a conocer en este documento se puede administrar sólo o en combinación con otros agentes, como inmunosupresores, donde el inmunosupresor no es un esteroide, 5-ASA o anti-TNF. Cuando se administra en combinación, la inmunoglobulina anti- α_4 de la presente invención se puede administrar en la misma formulación que estos otros compuestos o composiciones, o en una formulación independiente y se puede administrar antes, a continuación, o simultáneamente con otros compuestos y composiciones utilizados para tratar, mejorar o paliar los síntomas.

40 El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) es una clase de antiinflamatorios utilizados para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Un 5-ASA común es la mesalamina, por ejemplo Pentasa® y Rowasa®. Otro 5-ASA, como osalazina (Dipentum®) se convierten en mesalamina en el organismo. La sulfasalazina (Azulfidine®) también se administra comúnmente. Los efectos secundarios de los 5-ASA son melenas, dolor de cabeza, vómitos y erupción cutánea.

45 Los inmunosupresores debilitan o suprimen el sistema inmunitario, lo que a su vez disminuye la inflamación. Los ejemplos incluyen azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato y micofenolato. Estos medicamentos se utilizan más a menudo para evitar que el organismo rechace un órgano recién trasplantado, o para afecciones inflamatorias que no han respondido a otros tratamientos. A menudo toma meses para que estos fármacos mejoren los síntomas y la enfermedad a menudo regresa cuando se suspende la medicación. Los efectos secundarios de los inmunosupresores incluyen náuseas, vómitos, diarrea, úlceras de estómago, erupción, malestar, inflamación hepática, supresión de la médula ósea, fiebre, pancreatitis y mayor riesgo de ciertos tipos de cáncer.

50 También están indicados los anti-TNF para el tratamiento de afecciones inflamatorias. El factor de necrosis tumoral (TNF) es una proteína producida por el sistema inmunitario que puede estar relacionada a la inflamación. Los anti-TNF eliminan el TNF de la circulación sanguínea antes de que llegue a los intestinos, evitando así la inflamación. Infliximab (Remicade®) es un anti-TNF indicado para el tratamiento de la enfermedad de Crohn de moderada a grave que no responde a las terapias estándar (es decir, sustancias de mesalamina, corticosteroides e inmunosupresores) y para el tratamiento de fístulas abiertas, que drenan.

4. Indicaciones para el tratamiento

Las enfermedades inflamatorias que se incluyen para el tratamiento con las composiciones, el compuesto y los métodos dados a conocer incluyen enfermedades inflamatorias intestinales, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y distintas espondiloartropatías. Además las enfermedades o afecciones contempladas para el tratamiento incluyen las que tradicionalmente se tratan con esteroides.

5. Inmunoglobulinas

El agente de la invención es la inmunoglobulina anti- $\alpha 4$ natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste que cuando se administra a un paciente se puede utilizar en el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías, de modo que un paciente que estaba tomando esteroides previamente pueda disminuir gradualmente los esteroides o discontinuarlos.

"Anticuerpos" incluye en general las inmunoglobulinas completas como IgG1 (o cualquier subclase de IgG) o IgM, o inhibidores derivados de anticuerpos, como natalizumab.

"Anticuerpo homólogo" incluye en general anticuerpos intactos que constan de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina unidas mediante enlaces disulfuro. La expresión "anticuerpo homólogo" abarca en general una proteína que contiene uno o más polipéptidos elegidos entre las cadenas ligeras de inmunoglobulina, las cadenas pesadas de inmunoglobulina y los fragmentos de unión al antígeno que son capaces de unirse a uno o más antígenos (es decir, integrinas o ligandos de integrinas). Los polipéptidos componentes de un anticuerpo homólogo compuesto por más de un polipéptido pueden estar unidos por enlace disulfuro o de lo contrario reticulados covalentemente. Concordantemente, por lo tanto, "anticuerpos homólogos" incluyen en general inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como los subtipos de éstas, por ejemplo, IgG1), donde las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda. "Anticuerpos homólogos" también incluye generalmente porciones de anticuerpos intactos que mantienen la especificidad de unión al antígeno, por ejemplo fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos scFv, monómeros o dímeros de cadena pesada y liviana o sus mezclas.

El agente de la invención es el anticuerpo monoclonal natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste. En contraste con preparaciones del anticuerpo policlonal, que habitualmente contienen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo epítipo del antígeno. Una segunda ventaja de los anticuerpos monoclonales es que son sintetizados por medios que no están contaminados por otras inmunoglobulinas, por ejemplo, presentación en fago o aislamiento de un hibridoma.

"Los anticuerpos y las inmunoglobulinas nativos" son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada (Clothia et al., 1985, J. Mol. Biol., 186: 651-63; Novotny et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82: 4592-6).

Además, otros anticuerpos se pueden identificar mediante técnicas disponibles en el área. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir empleando la tecnología de presentación en fago. Después se aíslan fragmentos de anticuerpo que se unen selectivamente a una integrina $\alpha 4$ o a un dímero que contiene una integrina $\alpha 4$. Los ejemplos preferidos de métodos para producir anticuerpos mediante presentación en fago se dan a conocer en las patentes de Estados Unidos N° 6,225,447; 6,180,336; 6,172,197; 6,140,471; 5,969,108; 5,885,793; 5,872,215; 5,871,907; 5,858,657; 5,837,242; 5,733,743 y 5,565,332.

Un anticuerpo "variante" se refiere generalmente a una molécula de inmunoglobulina que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo "precursor" en virtud de la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más residuos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo precursor. El anticuerpo precursor o inmunoglobulina puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o cualquier fragmento de anticuerpo. Una variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Por ejemplo, una variante puede contener al menos uno, por ejemplo entre uno y aproximadamente diez, o entre aproximadamente dos y aproximadamente cinco sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Corrientemente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos con al menos 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias del dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo precursor, por ejemplo al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%

o al menos 95%. Identidad u homología con respecto a esta secuencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidato que son idénticos a los residuos del anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguna extensión N-terminal, C-terminal ni interna, eliminaciones ni inserciones en la secuencia del anticuerpo afecta a la identidad o la homología de la secuencia. Una variante retiene la capacidad de unirse al receptor y preferentemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, una variante puede tener una mayor afinidad de unión, una mayor capacidad para activar el receptor, etc. Para analizar estas propiedades, se debe comparar una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo precursor o una forma de longitud total de la variante con una forma de longitud total del anticuerpo precursor. Un anticuerpo variante muestra un aumento de al menos aproximadamente 10 veces, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces y muy preferentemente al menos aproximadamente 50 veces de la actividad biológica cuando se lo compara con el anticuerpo precursor. Un anticuerpo "precursor" es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos utilizada para la preparación de la variante. Por ejemplo, un anticuerpo precursor posee una región marco humana y regiones constantes de anticuerpo humanas. Generalmente, un anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humanizado o humano. Un anticuerpo "aislado" es generalmente uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Por ejemplo, un anticuerpo se purificará (1) a más de 95% en peso del anticuerpo según se determina por el método de Lowry y muy preferentemente más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de tasa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras con azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes dado que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Corrientemente, sin embargo, los anticuerpos aislados se prepararán mediante al menos un paso de purificación.

5.1. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir usando los métodos convencionales de hibridoma o mediante ingeniería genética. Estos métodos se han aplicado ampliamente para producir líneas celulares híbridas que secretan altos niveles de anticuerpos monoclonales contra muchos antígenos específicos y también se pueden usar para producir anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, se pueden inmunizar ratones (por ej., ratones Balb/c) con un epítipo antigénico α_4 por inyección intraperitoneal. Transcurrido el tiempo suficiente para permitir una respuesta inmunitaria, los ratones se sacrifican y se obtienen las células del bazo y se fusionan con células de mieloma, utilizando técnicas conocidas en el área. Las células fusionadas resultantes, hibridomas, se cultivan en un medio selectivo y las células supervivientes se cultivan en dicho medio usando condiciones de dilución limitantes. Después de clonar y volver a clonar, se pueden aislar hibridomas que secretan anticuerpos (por ejemplo, de la clase IgG o IgM o la subclase IgG1) que se unen selectivamente al objetivo, α_4 o un dímero compuesto por una integrina α_4 . Para producir agentes específicos para uso humano, el anticuerpo monoclonal aislado se puede usar entonces para producir anticuerpos quiméricos y humanizados. También se pueden preparar anticuerpos que sean anticuerpos anti-péptidos. Dichos anticuerpos anti-péptidos se prepararían contra péptidos de integrina α_4 .

El término "quimérico" significa generalmente que un agente está compuesto por una unión (reticulación química o covalente u otro tipo) de dos o más proteínas con estructuras dispares y/o que tengan diferentes fuentes de origen. Por lo tanto, un antagonista de la integrina α_4 quimérico puede incluir una fracción que sea un antagonista de la integrina α_4 o fragmento y otra fracción que no sea un antagonista de la integrina $\alpha_4\beta_1$.

Una especie de proteína "quimérica" es una "fusión" o "proteína de fusión" se refiere en general a la unión covalente colineal, de dos o más proteínas o fragmentos de éstas a través de sus esqueletos peptídicos individuales, por ejemplo a través de la expresión genética de una molécula de polinucleótido que codifica esas proteínas. Por lo tanto, las proteínas de fusión son, por ejemplo, proteínas quiméricas que incluyen un anticuerpo o fragmento de éste unido covalentemente a una segunda fracción que no es original para el anticuerpo (es decir, que deriva de otra inmunoglobulina o polipéptido). Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden incluir porciones de anticuerpos intactos que conservan la especificidad de unión al antígeno, por ejemplo fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos scFv, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que constan de una cadena pesada y una ligera, y similares.

Por ejemplo, las proteínas de fusión son quiméricas y contienen una fracción fusionada o unida de otro modo a toda o parte de las regiones bisagra y constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina, la cadena pesada, o ambas; por ejemplo, una molécula que incluye: (1) una primera fracción, (2) un segundo péptido, por ejemplo, uno que aumente la solubilidad o tiempo de vida *in vivo* de la fracción, por ejemplo, un miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas o sus fragmentos o porciones, por ejemplo, una porción o un fragmento de IgG, por ejemplo, la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana, por ejemplo, CH₂, CH₃ y regiones bisagra. En concreto, una "fusión de economizador de esteroides/Ig" es una proteína que contiene una fracción economizadora de esteroides biológicamente activa. Una especie de agente es generalmente una "fusión integrina/Fc", que es una proteína que contiene una inmunoglobulina economizadora de esteroides unida al menos a una parte del dominio

constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, una fusión de Fc comprende una inmunoglobulina economizadora de esteroides unida a un fragmento de un anticuerpo que contiene un dominio C-terminal de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

5 Generalmente, la expresión "proteína de fusión" también significa una fracción economizadora de esteroides que está unida químicamente a través de una molécula mono o heterofuncional a una segunda fracción que no es una fracción economizadora de esteroides (que resulta en una molécula "quimérica") y se prepara *de novo* a partir de la proteína purificada como se describe a continuación. Por lo tanto, un ejemplo de una molécula quimérica que es una proteína de fusión unida químicamente, en contraposición a unida por vía recombinante, puede comprender: (1) una fracción dirigida a la subunidad α_4 de la integrina, por ejemplo, una fracción VCAM-1 capaz de unirse a VLA-4) en la superficie de las células portadoras de VLA-4; (2) una segunda molécula que aumente la solubilidad o el tiempo de vida *in vivo* de la fracción para administración dirigida, por ejemplo, un polímero de polialquilenglicol como polietilenglicol (PEG). Generalmente, la fracción dirigida a α_4 puede ser cualquier ligando de α_4 natural o fragmento de éste, por ejemplo, un péptido VCAM-1 o una secuencia de aminoácidos similar sustituida conservadoramente.

15 Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden producir a partir de anticuerpos no humanos y pueden tener la misma afinidad de unión o similar que el anticuerpo a partir del cual se producen. Se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos (Morrison et al., 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851; Neuberger et al., 1984 Nature 312: 604; Takeda et al., 1985 Nature 314: 452) mediante empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con especificidad por el antígeno adecuada, junto con genes de, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica adecuada. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una región variable (V) de un anticuerpo monoclonal de ratón se puede unir a un ácido nucleico que codifica una región constante (C) humana, por ejemplo, IgG1 o IgG4. Por lo tanto el anticuerpo resultante es una especie híbrida, generalmente con el dominio de unión al antígeno del anticuerpo no humano y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

25 Los anticuerpos humanizados son anticuerpos con regiones variables que son principalmente de un anticuerpo humano (el anticuerpo del aceptor), pero que tienen regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de un anticuerpo no humano (el anticuerpo del donante). Véase, por ej. Queen et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-33; WO 90/07861; y las patentes de Estados Unidos N° 6,054,297; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101 y 5,224,539. La región o regiones constantes de estos anticuerpos son generalmente también de un anticuerpo humano. Los dominios variables humanos se eligen típicamente de anticuerpos humanos que tienen secuencias que muestran una alta homología con los dominios de unión de la región variable no humanos deseados. Los residuos variables de la cadena pesada y ligera se pueden derivar del mismo anticuerpo o de un anticuerpo humano diferente. Además, las secuencias se pueden elegir como un consenso de varios anticuerpos humanos como se describe en WO 92/22653.

35 Los aminoácidos específicos dentro de la región variable humana se eligen para la sustitución basándose en la conformación prevista y las propiedades de unión al antígeno. Esto se puede determinar mediante técnicas como el modelado por computadora, la predicción del comportamiento y las propiedades de unión de los aminoácidos en ciertas ubicaciones dentro de la región variable y la observación de los efectos de la sustitución. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre una región variable no humana y una región variable humana, la región variable humana puede ser alterada para reflejar la composición de aminoácidos de la región variable no humana. En este documento se describieron varios ejemplos de anticuerpos anti- α_4 humanizantes.

40 Mediante "anticuerpo homólogo humanizado" se quiere dar a entender generalmente un anticuerpo homólogo, producido por tecnología de recombinación del ADN, en la que todos o algunos de los aminoácidos de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina humana que no son necesarios para la unión al antígeno han sido sustituidos por los aminoácidos correspondientes de una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina de un mamífero no humano. Un "anticuerpo homólogo humano" es un anticuerpo homólogo en el que todos los aminoácidos de una cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina (sin importar si son o no necesarios para la unión al antígeno) derivan de una fuente humana.

Se dan a conocer anticuerpos humanizados en la patente de Estados Unidos N° 5,840,299.

50 Los ratones transgénicos que contienen genes de anticuerpos humanos pueden ser inmunizados con una estructura antigénica α_4 y se puede usar tecnología de hibridoma para generar anticuerpos humanos que se unan selectivamente a α_4 .

55 Los anticuerpos quiméricos, humanos y/o humanizados se pueden obtener mediante expresión recombinante, por ej. expresión en hibridomas humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)), en células de mieloma o células de ovario de hámster chino (CHO). Alternativamente, se pueden incorporar secuencias de codificación de anticuerpos en vectores adecuados para introducir en el genoma del animal produciendo así un animal transgénico. Un ejemplo sería producir dichos anticuerpos en la leche de un animal transgénico como un bovino. Véanse, por ej., las patentes de Estados Unidos N° 5,849,992 y 5,304,489. Los transgenes adecuados incluyen transgenes que tienen un promotor y/o potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, por ejemplo, caseína o β -lactoglobulina.

5.2 Anticuerpos humanizados

La presente invención proporciona natalizumab, una inmunoglobulina humanizada (o anticuerpo específico para la subunidad α_4 de VLA-4, que cuando se administra en una cantidad eficaz para economizar esteroides se puede utilizar en el tratamiento y el diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías de modo que los esteroides no sean necesarios. Más específicamente, esta invención se refiere al uso de natalizumab o a un fragmento inmunológicamente activo de éste para la preparación de un medicamento destinado a la administración a un sujeto en una cantidad eficaz para economizar esteroides a fin de reducir y/o eliminar la necesidad del tratamiento con esteroides en el sujeto que sufre una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones, donde el sujeto está en tratamiento con esteroides. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos de origen animal (generalmente de mamífero) que han sido modificados mediante técnicas de ingeniería genética. Las técnicas se utilizan para reemplazar las secuencias del marco de la región constante y/o la región variable con secuencias humanas, mientras mantienen la especificidad del antígeno original del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados se derivan comúnmente de anticuerpos de roedor (e.g., ratón y hámster) con especificidad por antígenos humanos (por ejemplo, VCAM-1 humano o VLA-4 humano). Reformando el anticuerpo del donante (anticuerpo del animal al cual se administró el antígeno) para tener secuencias del animal al cual se le administrará el anticuerpo con fines terapéuticos, habrá una menor respuesta del huésped en el animal luego de la administración del anticuerpo. Sólo las regiones Fc o todo menos las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se pueden reemplazar con dominios del aceptor, donde el aceptor es el animal al cual se le va a administrar el anticuerpo reformado (por ejemplo, mamíferos como los seres humanos, animales domésticos, animales de establecimientos agrícolas y similares).

Natalizumabno, un anticuerpo que se une a la subunidad α_4 de VLA-4 que cuando se administra a un paciente en una cantidad eficaz para economizar esteroides trata una enfermedad inflamatoria intestinal, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías es el objetivo de la presente invención.

Habitualmente, las CDR de un anticuerpo murino se trasplantan en las regiones correspondientes de un anticuerpo humano, ya que son las CDR (es decir, tres en las cadenas pesadas del anticuerpo, tres en las cadenas ligeras) que son las regiones del anticuerpo de ratón (o cualquier otro anticuerpo de animal), las que se unen a un antígeno específico. El trasplante de las CDR se obtiene por ingeniería genética, por medio de lo cual se determinan las secuencias de ADN de la CDR por clonación de segmentos del gen de la región variable (V) de las cadenas pesada y ligera murinas, y

después se transfieren a las regiones V humanas correspondientes mediante mutagénesis sitio dirigida. En la etapa final del proceso, se agregan los segmentos del gen de la región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de las cadenas pesada y ligera humanizados se coexpresan en células de mamífero para producir el anticuerpo humanizado soluble.

La transferencia de estas CDR a un anticuerpo humano confiere a este anticuerpo las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo murino original. La seis CDR del anticuerpo murino están montadas estructuralmente en una región "marco" de la región V. La razón de que el injerto de CDR sea exitoso es que las regiones marco entre anticuerpos de ratón y humano pueden tener estructuras 3-D muy similares con puntos de unión similares para las CDR, de modo que las CDR se pueden intercambiar. Dichos anticuerpos homólogos humanizados se pueden preparar como se ejemplifica por ejemplo en Jones et al., 1986, Nature 321: 522-5; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-7; Queen et al., 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 10029; y Orlandi et al., 1989, Pro. Nat. Acad. Sci. USA 86: 3833.

Sin embargo, se cree que ciertos aminoácidos dentro de las regiones marco interaccionan con las CDR e influyen en la afinidad global de unión al antígeno. La transferencia directa de las CDR de un anticuerpo murino para producir un anticuerpo recombinante humanizado sin ninguna modificación de los marcos de la región V humanas resulta a menudo en una pérdida parcial o total de la afinidad de unión. En varios casos, parece ser fundamental alterar residuos en las regiones marco del anticuerpo del aceptor (por ejemplo, el anticuerpo humano) para obtener actividad de unión.

Queen et al., 1989 (*supra*) y WO 90/07861 (Protein Design Labs) describieron la preparación de un anticuerpo humanizado que contiene residuos modificados en las regiones marco del anticuerpo del aceptor por combinación de las CDR de un MAb (anti-Tac) murino con las regiones marco y constante de una inmunoglobulina humana. Una solución para resolver el problema de la pérdida de afinidad de unión sin ninguna modificación de los residuos marco de la región V humana implica dos pasos clave. En primer lugar, analistas informáticos eligen las regiones marco de V humanas para la óptima homología de secuencia de la proteína con el marco de la región V del anticuerpo murino original. En el segundo paso, la estructura terciaria de la región V murina es modelada por computadora para poder visualizar los residuos de aminoácidos del marco que es probable que interaccionen con las CDR murinas. Estos residuos de aminoácidos murinos se superponen después sobre el marco homólogo humano. Por detalles

adicionales, véanse las patentes de Estados Unidos N° 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; y 5,530,101 (Protein Design Labs).

Ciertos antagonistas de la integrina que contiene la subunidad α_4 incluyen generalmente anticuerpos homólogos quiméricos y recombinantes humanizados (es decir, inmunoglobulinas intactas y sus porciones) con especificidad por el epítipo B que han sido preparados y se describen en la patente de Estados Unidos N° 5,932,214 (MAB HP1/2). El material de partida para la preparación de anticuerpos homólogos anti-integrina quiméricos (ratón Variable-humana Constante) y humanizados puede ser un anticuerpo anti-integrina monoclonal múrido como se describió previamente, un anticuerpo anti-integrina monoclonal comercial (por ej., HP2/1, Amiae International, Inc., Westbrook, Me). Otros anticuerpos homólogos anti-VLA-4 humanizados fueron descritos por Athena Neurosciences, Inc. en PCT/US95/01219 (27 de julio de 1995), las patentes de Estados Unidos N° 5,840,299 y 6,033,665. También se hace referencia a las patentes 5,932,214, 5,840,299 y 6,033,665.

Los anticuerpos anti-VLA-4 humanizados contienen generalmente una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Una cadena ligera humanizada puede contener tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) con secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes de una cadena ligera de la inmunoglobulina 21.6 de ratón, y un marco de la región variable de una secuencia del marco de la región variable de la cadena ligera kappa humana, excepto en al menos una posición la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 21.6 de ratón. Una cadena pesada humanizada puede contener tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) con secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes de una cadena pesada de la inmunoglobulina 21.6 de ratón, y un marco de la región variable de una secuencia del marco de la región variable de la cadena pesada humana, excepto en al menos una posición la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 21.6 de ratón. Véanse, las patentes de Estados Unidos N° 5,840,299 y 6,033,665.

Los fragmentos de un antagonista de la integrina α_4 aislado (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos homólogos) también se pueden producir eficazmente por métodos de recombinación, por digestión proteolítica o por síntesis química empleando métodos conocidos por los expertos en el área. En los métodos de recombinación, se pueden generar fragmentos internos o terminales de un polipéptido eliminando uno o más nucleótidos de uno de los extremos (para un fragmento terminal) o de ambos extremos (para un fragmento interno) de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido hedgehog aislado. La expresión del ADN mutagenizado produce fragmentos de polipéptidos. La digestión con ciertas endonucleasas también puede generar varios ADN, los cuales codifican una serie de fragmentos. Los ADN que codifican fragmentos de una proteína también pueden ser generados por corte al azar, digestión de restricción o una combinación de éstos. Los fragmentos de proteínas se pueden generar directamente a partir de proteínas intactas. Los péptidos pueden ser escindidos específicamente por enzimas proteolíticas, incluidas, pero no exclusivamente, plasmina, trombina, tripsina, quimotripsina o pepsina. Cada una de estas enzimas es específica para el 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, generalmente arginina o lisina. La pepsina y la quimotripsina catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de aminoácidos aromáticos como triptófano, tirosina y fenilalanina. Se generan conjuntos alternativos de fragmentos de proteínas escindidas previniendo la escisión en un sitio que sea sensible a una enzima proteolítica. Por ejemplo, la reacción del grupo ácido ϵ -amino de lisina con trifluoroacetato de etilo en solución ligeramente básica produce residuos de aminoácidos bloqueados cuyo enlace peptídico adyacente ya no es sensible a la hidrólisis por la tripsina. Las proteínas se pueden modificar para crear enlaces peptídicos que sean sensibles a las enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la alquilación de residuos de cisteína con β -haloetilaminas produce uniones peptídicas que son hidrolizadas por tripsina (Lindley, 1956, Nature 178: 647). Además, se pueden usar reactivos químicos que escindan las cadenas peptídicas en residuos específicos. Por ejemplo, el bromuro de cianógeno escinde péptidos en los residuos de metionina (Gross et al., 1961, J. Am. Chem. Soc. 83: 1510). Así, mediante tratamiento de proteínas con diversas combinaciones de modificadores, enzimas proteolíticas y/o reactivos químicos, las proteínas se pueden dividir en fragmentos de una longitud deseada sin superposición de los fragmentos, o dividir en fragmentos que se superponen de una longitud deseada.

5.3 Natalizumab y anticuerpos humanizados relacionados

La invención proporciona una inmunoglobulina humanizada que se une específicamente a un ligando de VLA-4 sola o en combinación, para utilizar en el diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías.

Más específicamente, esta invención se refiere al uso de natalizumab o a un fragmento inmunológicamente activo de éste para la preparación de un medicamento destinado a la administración a un sujeto en una cantidad eficaz para economizar esteroides a fin de reducir y/o eliminar la necesidad del tratamiento con esteroides en el sujeto que sufre una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones, donde el sujeto está en tratamiento con esteroides

En general, los anticuerpos humanizados contienen una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. En un aspecto, la cadena ligera humanizada puede contener tres regiones determinantes de complementariedad (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) con secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes de una cadena ligera de la inmunoglobulina 21-6 de ratón, y un marco de la región variable de una secuencia del marco de la región variable de la cadena ligera kappa humana, excepto en al menos una posición elegida de un primer grupo que consiste en las posiciones L45, L49, L58 y L69, donde la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 21.6 de ratón.

Además, la cadena pesada humanizada puede contener tres regiones determinantes de complementariedad (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) con secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes de una cadena pesada de la inmunoglobulina 21-6 de ratón, y un marco de la región variable de una secuencia del marco de la región variable de la cadena pesada humana, excepto en al menos una posición elegida de un grupo que consiste en las posiciones h27, H28, H29, H30, H44, H71, donde la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 21-6 de ratón. Dichas inmunoglobulinas se unen específicamente a VLA-4 con una afinidad que tiene un límite inferior de aproximadamente 10^7 M^{-1} y un límite superior de aproximadamente 5 veces la afinidad de la inmunoglobulina 21-6 de ratón.

Usualmente, los marcos de la región variable de las cadenas ligera y pesada humanizadas provienen de las secuencias del marco de la región variable de RE1 y 21/28'CL, respectivamente. Cuando el marco de la región variable de la cadena ligera humanizada es de RE1, al menos dos aminoácidos del marco son reemplazados. Un aminoácido es del primer grupo de posiciones descrito *supra*. Los otros aminoácidos son de un tercer grupo que consiste en las posiciones L104 L105 y L107. Esta posición es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de una cadena ligera kappa de una inmunoglobulina humana distinta de RE1.

Algunas inmunoglobulinas humanizadas tienen una secuencia de la región variable de una cadena ligera madura designada La o Lb, o una secuencia de la región variable de una cadena pesada madura designada Ha, Hb o Hc. Las inmunoglobulinas humanizadas preferidas incluyen las que tienen una cadena ligera La y una cadena pesada Ha, Hb o Hc.

Generalmente, las inmunoglobulinas humanizadas tienen regiones marco sustancialmente de las regiones variables de una inmunoglobulina humana (denominada una inmunoglobulina del aceptor) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón denominada mu MAb 21.6 (a las que se hace referencia como inmunoglobulina del donante). Las regiones constantes, cuando están presentes, también son sustancialmente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados tienen una afinidad de unión específica por VLA-4 de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M^{-1} . Generalmente el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados por VLA-4 es un factor de tres o cinco del de mu MAb 21.6 (aproximadamente 10^9 M^{-1}). A menudo el límite inferior de la afinidad de unión también es un factor de tres o cinco del de mu MAb 21.6.

Generalmente, los anticuerpos humanizados se pueden producir como se ejemplificó, por ejemplo, con el anticuerpo monoclonal de ratón MAb 21.6. El material de partida para la producción de anticuerpos humanizados es mu MAb 21.6. El aislamiento y las propiedades de este anticuerpo se describen en la patente de Estados Unidos N° 6,033,655 (asignada a Elan Pharmaceuticals, Inc.) En resumen, mu MAb 21.6 es específico para la subunidad α_4 de VLA-4 y se ha demostrado que inhibe la unión de linfocitos humanos a cultivos tisulares de células de cerebro de rata estimulados con factor de necrosis tumoral. Del extremo N-terminal al C-terminal, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1 CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con la convención de numeración de Kabat.

El paso siguiente consiste en seleccionar los anticuerpos humanos para suministrar los residuos del marco. La sustitución de las CDR de ratón en un marco de dominio variable humano es muy probable que resulte en la retención de su correcta orientación espacial si el marco del dominio variable humano adopta la misma conformación o similar que el marco variable de ratón del cual se originó la CDR. Esto se puede lograr obteniendo los dominios variables humanos de anticuerpos humanos cuyas secuencias del marco tengan un alto grado de identidad de secuencia con los dominios del marco variable murino del cual se derivaron las CDR. Las regiones del marco variable de las cadenas ligera y pesada se pueden derivar de la misma secuencia de anticuerpo humano o de una diferente. Las secuencias del anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Véanse Kettleborough et al., Protein Engineering 4: 773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6: 971 (1993).

Generalmente, las secuencias adecuadas de anticuerpos humanos son identificadas por comparación con computadora de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se puede realizar por separado para las cadenas pesada y ligera pero los principios son similares para ambas. Esta comparación revela que la cadena ligera de mu 21.6 muestra la mayor identidad de secuencia con las cadenas ligeras humanas del subtipo kappa 1; la cadena pesada de mu 21.6 muestra la mayor identidad de secuencia con las cadenas pesadas humanas del subtipo uno, como se define en Kabat, *supra*. Por lo tanto, las regiones marco ligera y pesada humanas se derivan generalmente de anticuerpos

humanos de estos subtipos, o de secuencias consenso de estos subtipos. Generalmente, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada humanas que muestran mayor identidad de secuencia con las regiones correspondientes de mu MAb 21.6 son de anticuerpos RE1 y 21/28'CL, respectivamente.

5 Habitualmente, se puede usar un modelado por computadora para mejorar aún más la capacidad del anticuerpo humanizado para unirse a su antígeno cognado. La yuxtaposición no natural de regiones de CDR húmedas con el marco de la región variable humana puede resultar en restricciones conformacionales antinaturales, que, salvo que se corrijan por sustitución de determinados residuos de aminoácidos, conducen a pérdida de la afinidad de unión. La selección de residuos de aminoácidos para sustituir se determina, en parte, por modelado por computadora. Se dispone de numeroso hardware y software para producir imágenes tridimensionales de las moléculas de inmunoglobulina. En general, los modelos moleculares se producen a partir de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o sus dominios. Se compara la similitud en la secuencia de aminoácidos de las cadenas a modelar con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o los dominios que muestran la mayor similitud de secuencia se eligen como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Por ejemplo, para la cadena ligera de mu MAb 21.6, el punto de partida para el modelado de las regiones marco, las regiones CDR1 y CDR2, fue la cadena ligera humana RB1. Para la región CDR3, el punto de partida fue la región CDR3 de la cadena ligera de un anticuerpo humano diferentes HyHEL-5. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales de las cadenas de inmunoglobulina o los dominios que se están modelando, y los de la estructura de partida. Después las estructuras modificadas se ensamblan en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina mediante minimización de energía y verificación de que todos los átomos están a la distancia apropiada uno de otro y que las longitudes de los enlaces y los ángulos están dentro de límites químicamente aceptables.

Como se indicó *supra*, los anticuerpos humanizados pueden contener marcos de regiones variables sustancialmente de una inmunoglobulina humana y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón denominada mu MAb 21.6. Habiendo identificado las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de mu MAb 21.6 y las inmunoglobulinas del aceptor humanas apropiadas, el paso siguiente es determinar cuál, si algún, residuo de estos componentes debe ser sustituido para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, la sustitución de residuos de aminoácidos humanos con húmedos debe minimizarse, porque la introducción de residuos húmedos aumenta el riesgo de que el anticuerpo provoque una respuesta HAMA en los seres humanos. Los aminoácidos para sustitución se eligen basándose en su posible influencia sobre la conformación de la CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de esas posibles influencias es por modelado, examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, u observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos particulares.

35 Cuando un aminoácido diferencia entre el marco de la región variable de mu 21.6 MAb y el marco de una región variable humana equivalente, el aminoácido del marco humano debe ser sustituido generalmente por el aminoácido de ratón equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) no se una covalentemente al antígeno directamente (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones L49, L69 de mu MAb 21.6),
- (2) sea adyacente a una región CDR, sea parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia et al., *supra*, o de lo contrario interaccione con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de unos 3 Å de una región CDR) (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones L45, L58, H27, H28, H29, H30 y H71 de mu MAb 21.6), o
- (3) participe en la interfaz de V_L - V_H (por ejemplo, los aminoácidos en la posición H44 de mu MAb 21.6).

45 Generalmente, otros candidatos para la sustitución son aminoácidos del marco del aceptor humano que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición (por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones L104 L105 y L107 de mu MAb 21.6). Estos aminoácidos se pueden sustituir con aminoácidos de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Alternativamente, los aminoácidos de posiciones equivalentes en MAb 21.6 de ratón se pueden introducir en las regiones marco humanas cuando dichos aminoácidos son típicos de la inmunoglobulina humana en posiciones equivalentes.

50 En general, es deseable la sustitución de todos o la mayoría de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores. Ocasionalmente, sin embargo, hay cierta ambigüedad sobre si un determinado aminoácido cumple los criterios anteriores y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, la otra que no. Los anticuerpos humanizados contendrán habitualmente una sustitución de un residuo del marco de una cadena ligera humana con un residuo correspondiente de mu MAb 21.6 en al menos 1, 2 o 3, y más generalmente 4, de las posiciones siguientes: L45, L49, L58 y L69. Los anticuerpos humanizados también suelen contener una sustitución de un residuo del marco de una cadena pesada humana en al menos 1, 2, 3, 4 o 5, y a veces 6, de las posiciones siguientes: H27, H28, H29, H30, H44 y H71. Opcionalmente, H36 también se puede sustituir. En general, cuando la inmunoglobulina de cadena ligera humana del aceptor es RE1, la cadena ligera también contiene sustituciones en al menos 1 o 2 y más generalmente 3, de las posiciones siguientes: L104 L105 y

L107. Estas posiciones están sustituidas con el aminoácido de la posición equivalente de una inmunoglobulina humana que tiene residuos de aminoácidos más típicos.

5 Generalmente las regiones CDR de los anticuerpos humanizados son substancialmente idénticas; y más generalmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes en el anticuerpo mu MAb 21.6. En ocasiones, sin embargo, uno de los residuos de una región CDR se puede cambiar. Existe similitud de aminoácidos entre CDR3 de mu MAb 21.6 y el ligando de VCAM-1. Esta observación sugiere que la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados se podría mejorar rediseñando la región CDR3 de la cadena pesada para que se asemejara aún más estrechamente a VCAM-1. Por consiguiente, generalmente se pueden sustituir uno o más aminoácidos del dominio CDR3 con aminoácidos del dominio de unión de VCAM-1. Aunque no es generalmente deseable, a veces es posible hacer una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras de los residuos de CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante.

10 Las regiones marco de las inmunoglobulinas humanizadas pueden ser sustancialmente idénticas, o, idénticas a las regiones marco de los anticuerpos humanos de los cuales fueron derivadas. Por supuesto, muchos de los aminoácidos de la región marco contribuyen poco o no contribuyen directamente a la especificidad o la afinidad de un anticuerpo. Por lo tanto, muchas sustituciones conservadoras individuales de residuos del marco pueden generalmente ser toleradas sin un cambio apreciable de la especificidad o la afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. Sin embargo, en general, esas sustituciones son indeseables.

5.3.1 Producción de regiones variables

20 Habiendo elegido conceptualmente las CDR y los componentes del marco de las inmunoglobulinas humanizadas, se dispone de una variedad de métodos para producir inmunoglobulinas humanizadas. Debido a la degeneración del código, diversas secuencias de ácidos nucleicos codificarán cada secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser producidas por síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o por mutagénesis por PCR de una variante preparada antes del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótido es un método preferido para preparar variantes de sustitución, eliminación e inserción del ADN del polipéptido que es el objetivo. Véase Adelman et al., DNA 2: 183 (1983). En resumen, el ADN del polipéptido que es el objetivo es alterado mediante hibridación de un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con una plantilla de ADN monocatenario. Después de la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria entera de la plantilla que incorpora el cebador del oligonucleótido y codifica la alteración seleccionada en el ADN del polipéptido que es el objetivo.

5.3.2 Elección de la región constante

30 Los segmentos variables de anticuerpos humanizados están habitualmente unidos a al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), generalmente de una inmunoglobulina humana. Las secuencias de ADN de la región constante humana se pueden aislar siguiendo procedimientos bien conocidos de una diversidad de células humanas, pero preferentemente linfocitos B inmortalizados (véanse Kabat et al., *supra* y WO 87/02671) (cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad para todos los efectos). Corrientemente, el anticuerpo contendrá tanto las regiones constantes de la cadena pesada como de la cadena ligera. La región constante de la cadena pesada incluye generalmente las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4.

35 Generalmente, los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluidos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo humanizado tenga actividad citotóxica, el dominio constante es generalmente un dominio constante de fijación del complemento y la clase es habitualmente IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase de IgG₂. Habitualmente, el anticuerpo humanizado contiene secuencias de más de una clase o isotopo.

5.3.3 Otros anticuerpos anti-VLA-4

45 Otros anticuerpos anti-VLA-4 conocidos son HP1/2, HP-2/1, HP2/4, L25 y P4C2.

50 Con frecuencia, los anticuerpos monoclonales creados en ratones son humanizados posteriormente para evitar la respuesta inmunitaria humana anti anticuerpo de ratón (HAMA) en un sujeto humano que recibió una inyección de un anticuerpo de ratón. Esto ocurre por injerto de CDR o reformado. Por lo tanto, en general primero los anticuerpos son anticuerpos monoclonales de ratón que a través de injerto de CDR o reformado se humanizan, como se trató antes para el anticuerpo 21.6. Generalmente, los anticuerpos humanizados que tienen especificidad por VLA-4 derivan de fuentes (por ejemplo, habitualmente ratón) que al menos una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables derivan de un anticuerpo anti-VLA-4 no humano de un donante, y en las que puede haber, o no, alteración mínima del marco de la región variable pesada y/o ligera del anticuerpo del aceptor para conservar la especificidad de unión del anticuerpo del donante. Generalmente, las regiones de unión al antígeno del dominio variable de la cadena pesada con injerto de CDR comprenden las CDR correspondientes a las posiciones 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3). La cadena pesada puede incluir además residuos no humanos en las posiciones del marco 27-30 (numeración de Kabat). La cadena pesada puede incluir además residuos no humanos en la posición del marco 75 (numeración de Kabat). La cadena pesada puede

5 incluir además residuos no humanos en las posiciones del marco 77-79 o 66-67 y 69-71 o 84-85 o 38 y 40 o 24 (numeración de Kabat). Por ejemplo, las regiones de unión al antígeno del dominio variable de la cadena ligera con injerto de CDR contienen las CDR correspondientes a las posiciones 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3). En concreto, la cadena ligera puede incluir además residuos no humanos en las posiciones del marco 60 y 67 (numeración de Kabat). Estas designaciones de los residuos se numeran según la numeración de Kabat (Kabat et al., 5ª ed. vol 4. SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U.S. Department of Health Human Services, NIH, EE.UU. (1991)).

10 Síntesis y humanización del anticuerpo de ratón HP1/2. HP1/2 es otro anticuerpo dirigido contra VLA-4. Se describe un método de preparar una versión humanizada de un anticuerpo en la patente de E.E.U.U. N° 6,602,503 asignada a Biogen, Inc. Las secuencias de los anticuerpos humanizados se proporcionan de la manera siguiente. La secuencia de ADN de V_H de HP1/2 y su secuencia de aminoácidos traducida son:

```

5'-gtc aaa ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca      48
N-Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
  1           5           10           15

gtc aag ttg ttc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat      96
Val Lys Leu Phe Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
      20           25           30

atg cac tgg gtg aag cag agg cct caa cag ggc ctg gag tgg att gga      144
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gln Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
      35           40           45

agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac ccg aag ttc cag      192
Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
      50           55           60

gtc aag gcc act att aca gcg gac acg tcc tcc aac aca gcc tgg ctg      240
Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Trp Leu
      65           70           75

cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tac tac tgt gca      288
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85           90           95

gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac ttc tgg ggc caa      336
Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln
      100          105          110

ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca-3'      360
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser-C
      115           120
    
```

15 Una comparación entre las dos secuencias V_H de HP 1/2 y una secuencia de consenso de la familia IIC reveló que los únicos residuos inusuales están en las posiciones de los aminoácidos 80 y 121 (es decir, 79, 94 y 121 en la numeración de Kabat). Aunque Tyr-80 es invariable en el subgrupo IIC otras regiones V_H múridas secuenciadas tienen otros aminoácidos aromáticos en esta posición, aunque ninguno tiene Trp. La mayoría de las V_H humanas y múridas tienen un residuo de arginina en la posición 94 de Kabat. La presencia de Asp-94 en V_H de HIP1/2 es extremadamente rara; hay solamente un ejemplo divulgado de un residuo cargado negativamente en esta posición.

20 Prolina en la posición 113 de Kabat también es inusual pero es poco probable que sea importante en la conformación de las CDR debido a su distancia de ellas. Los aminoácidos que componen la CDR1 se encontraron en otras tres regiones V_H múridas secuenciadas. Sin embargo, CDR2 y CDR3 son únicas para HP1/2 y no se encuentran en ninguna otra V_H múrida divulgada.

La secuencia de ADN de V_K de HP1/2 y su secuencia de aminoácidos traducida son los siguientes:

ES 2 554 754 T3

```

5' -agt att gtg atg acc cag act ccc aaa ttc ctg ctt gtt tca gca gga      48
N-Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1      5      10      15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg act aat gat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
20      25      30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg ata      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35      40      45

tat tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc      192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50      55      60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ttc acc atc agc act gtg cag gct      240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65      70      75      80

gaa gac ctg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ccg tac      288
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
85      90      95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag atc-3'      318
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile-C
100      105

```

V_K de Hop1/2 es miembro de la familia V de Kabat (Kabat et al., 5ª ed., vol. 4, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U.S. Department of Health Human Services (1991)) y no tiene residuos inusuales. Los aminoácidos de CDR1 y CDR3 son únicos. Los aminoácidos que componen CDR2 fueron informados en otro V_K múrida.

Diseño de un anticuerpo Anti-VLA-4 con injerto de CDR. Para diseñar un anticuerpo anti-VLA-4 con injerto de CDR, generalmente es necesario determinar cuáles residuos de HP1/2 múrido contienen las CDR de las cadenas ligera y pesada. Tres regiones de hipervariabilidad en medio de las secuencias del marco menos variables se encuentran en ambas cadenas ligera y pesada (Wu y Kabat, J. Exp. Med. 132: 211-250 (1970); Kabat et al., (1991)). En la mayoría de los casos estas regiones hipervariables corresponden a la CDR, pero pueden extenderse más allá de ella. Las CDR de HP1/2 múrido se pueden dilucidar según Kabat et al., (1991) por alineación con otras secuencias V_H y V_K . Las CDR de V_H de HP1/2 múrido corresponden generalmente a los residuos identificados en las secuencias V_H humanizadas de la manera siguiente:

CDR1	AA ₃₁ -AA ₃₅
CDR2	AA ₅₀ -AA ₆₆
CDR3	AA ₉₉ -AA ₁₁₀

Éstos corresponden a AA₃₁-AA₃₅, AA₅₀-AA₆₅ y AA₉₅-AA₁₀₂, respectivamente, en la numeración de Kabat. Se identificaron las CDR de V_K de HP1/2 múrido y corresponden a los residuos identificados en las secuencias V_K humanizadas de la manera siguiente:

CDR1	AA ₂₄ -AA ₃₄
CDR2	AA ₅₀ -AA ₅₆
CDR3	AA ₈₉ -AA ₉₇

Éstos corresponden a los mismos aminoácidos numerados en la numeración de Kabat. Por lo tanto, sólo los límites de las CDR de V_K , pero no de V_H , corresponden a los residuos de CDR de Kabat. Los marcos humanos elegidos para aceptar las CDR de HP1/2 (donante) fueron NEWM y RE1 para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Las secuencias de NEWM y de RE1 se publicaron en Kabat *et al.*, (1991).

El ADN y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la región variable de la cadena pesada humanizada del anticuerpo HP1/2 humanizado es habitualmente:

ES 2 554 754 T3

```

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt      48
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1          5          10          15

gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag tcc ggt gct gaa gtt gtt aaa      96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
20          25          30

ccg ggt tcc tcc gtt aaa ctg tcc tgc aaa gct tcc ggt ttc aac atc      144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35          40          45

aaa gac acc tac atg cac tgg gtt aaa cag cgt ccg ggt cag ggt ctg      192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50          55          60

gaa tgg atc ggt cgt atc gac ccg gct tcc ggt gac acc aaa tac gac      240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
65          70          75          80

ccg aaa ttc cag gtt aaa gct acc atc acc gct gac gaa tcc acc tcc      288
Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85          90          95

acc gct tac ctg gaa ctg tcc tcc ctg cgt tcc gaa gac acc gct gtt      336
Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100         105         110

tac tac tgc gct gac ggt atg tgg gtt tcc acc ggt tac gct ctg gac      384
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
115         120         125

ttc tgg ggt cag ggt acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'      429
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
130         135         140

```

El ADN y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la región variable de la cadena ligera humanizada del anticuerpo HP1/2 humanizado:

```

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt      48
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

ggt cac tcc atc gtt atg acc cag tcc ccg gac tcc ctg gct gtt tcc      96
Val His Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser
20          25          30

ctg ggt gaa cgt gtt acc atc aac tgc aaa gct tcc cag tcc gtt acc      144
Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr
35          40          45

aac gac gtt gct tgg tac cag cag aaa ccg ggt cag tcc ccg aaa ctg      192
Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
50          55          60

ctg atc tac tac gct tcc aac cgt tac acc ggt gtt ccg gac cgt ttc      240
Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
65          70          75          80

tcc ggt tcc ggt tac ggt acc gac ttc acc ttc acc atc tcc tcc gtt      288
Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val
85          90          95

cag gct gaa gac gtt gct gtt tac tac tgc cag cag gac tac tcc tcc      336
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser
100         105         110

ccg tac acc ttc ggt ggt ggt acc aaa ctg gag atc taa ggatcctc-3'      383
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile-C
115         120

```

- 5 Habitualmente, además de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo HP1/2 humanizado anterior, se pueden utilizar otras regiones de las cadenas pesada y ligera del aceptor para la inserción de las regiones de HP1/2 del donante. Todos los constructos siguientes contienen Ser-75 (numeración de Kabat). El constructo STAW contiene además Gln a Thr en la posición 77, Phe a Ala en la posición 78, y Ser a Trp en la posición 79 (numeración de Kabat). La secuencia de ADN de V_H y su secuencia de aminoácidos traducida son las que se indican a continuación:

ES 2 554 754 T3

```

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt      48
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
  1           5           10           15

gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga      96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
          20           25           30

cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att      144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
          35           40           45

aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt      192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
          50           55           60

gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac      240

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 65           70           75           80

ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac      288
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
          85           90           95

aca gcc tgg ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc      336
Thr Ala Trp Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
          100           105           110

tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac      384
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
          115           120           125

ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'      429
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
          130           135           140

```

El constructo KAITAS contiene los cambios adicionales de Arg a Lys (posición 66), Val a Ala (posición 67), Met a Ile (posición 69), Leu a Thr (posición 70) y Val a Ala (posición 71) (numeración de Kabat). La secuencia de ADN de V_H de KAITAS y su secuencia de aminoácidos traducida son las que se indican a continuación:

5

```

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt      48
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
  1           5           10           15

gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga      96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
          20           25           30

cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att      144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
          35           40           45

aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt      192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
          50           55           60

gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
 65           70           75           80

ccg aag ttc cag gtc aaa gcg aca att acg gca gac acc agc agc aac      288
Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
          85           90           95

cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc      336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
          100           105           110

tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac      384
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
          115           120           125

ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'      429
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
          130           135           140

```

El constructo SSE contiene los cambios adicionales de Ala a Ser (posición 84) y Ala a Glu (posición 85) (numeración de Kabat). La secuencia de ADN de V_H de SSE y su secuencia de aminoácidos traducida son las que se indican a continuación:

ES 2 554 754 T3

5'-cag	gtc	caa	ctg	cag	gag	agc	ggt	cca	ggt	ctt	gtg	aga	cct	agc	cag	48
N-Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	
1			5				10						15			
acc	ctg	agc	ctg	acc	tgc	acc	gtg	tct	ggc	ttc	aac	att	aaa	gac	acc	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	
			20				25						30			
tat	atg	cac	tgg	gtg	aga	cag	cca	cct	gga	cga	ggt	ctt	gag	tgg	att	144
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
gga	agg	att	gat	cct	gcg	agt	ggc	gat	act	aaa	tat	gac	ccg	aag	ttc	192
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	
		50				55					60					
cag	gtc	aga	gtg	aca	atg	ctg	gta	gac	acc	agc	agc	aac	cag	ttc	agc	240
Gln	Val	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Phe	Ser	
					70					75					80	
ctg	aga	ctc	agc	agc	gtg	aca	tct	gag	gac	acc	gcg	gtc	tat	tat	tgt	288
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	<u>Ser</u>	<u>Glu</u>	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85				90					95		
gca	gac	gga	atg	tgg	gta	tca	acg	gga	tat	gct	ctg	gac	ttc	tgg	ggc	336
Ala	Asp	Gly	Met	Trp	Val	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	
			100					105					110			
caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggt	gag	tcc-3'					372
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Glu	Ser-C					
			115				120									

El constructo KRS contiene los cambios adicionales de Arg a Lys (posición 38) y Pro a Arg (posición 40) (numeración de Kabat). La secuencia de ADN de V_H de KRS y su secuencia de aminoácidos traducida son las que se indican a continuación:

5'-atg	gac	tgg	acc	tgg	agg	gtc	ttc	tgc	ttg	ctg	gct	gta	gca	cca	ggt	48
N-Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Val	Phe	Cys	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	
1				5					10					15		
gcc	cac	tcc	cag	gtc	caa	ctg	cag	gag	agc	ggt	cca	ggt	ctt	gtg	aga	96
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	
			20					25					30			
cct	agc	cag	acc	ctg	agc	ctg	acc	tgc	acc	gtg	tct	ggc	ttc	aac	att	144
Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	
			35					40				45				
aaa	gac	acc	tat	atg	cac	tgg	gtg	aaa	cag	cga	cct	gga	cga	ggt	ctt	192
Lys	Asp	Thr	Tyr	Met	His	Trp	Val	<u>Lys</u>	Gln	<u>Arg</u>	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	
		50				55				60						
gag	tgg	att	gga	agg	att	gat	cct	gcg	agt	ggc	gat	act	aaa	tat	gac	240
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Asp	
			65			70				75					80	
ccg	aag	ttc	cag	gtc	aga	gtg	aca	atg	ctg	gta	gac	acc	agc	agc	aac	288
Pro	Lys	Phe	Gln	Val	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	
				85					90					95		
cag	ttc	agc	ctg	aga	ctc	agc	agc	gtg	aca	gcc	gcc	gac	acc	gcg	gtc	336
Gln	Phe	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			
tat	tat	tgt	gca	gac	gga	atg	tgg	gta	tca	acg	gga	tat	gct	ctg	gac	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Asp	Gly	Met	Trp	Val	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	
		115				120						125				
ttc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggt	gag	tcc-3'		429
Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Glu	Ser-C		
			130			135						140				

El constructo AS contiene el cambio de Val a Ala en la posición 24 (numeración de Kabat). La secuencia de ADN de V_H de AS y su secuencia de aminoácidos traducida son:

ES 2 554 754 T3

```

5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt      48
N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
  1          5          10          15

gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga      96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
          20          25          30

cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gcg tct ggc ttc aac att      144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
          35          40          45

aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt      192
Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
          50          55          60

gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
  65          70          75          80

ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac      288
Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
          85          90          95

cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc      336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
          100          105          110

tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac      384
Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
          115          120          125

ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'      429
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
          130          135          140

```

5

La cadena ligera humanizada requiere generalmente pocas modificaciones, cuando las requiere. Sin embargo, en la preparación de anticuerpos anti-VLA-4 humanizados, varios cambios empíricos mejoran la actividad inmunológica del anticuerpo frente a su ligando. Por ejemplo, la cadena pesada humanizada con la mutación Ser, con la cadena ligera múrida es aproximadamente 2.5 veces menos potente que HP1/2 múrido. La misma cadena pesada humanizada con una cadena ligera humanizada tiene aproximadamente 4 veces menos potencia.

En general un constructo V_K humanizado (VK1) comprende una sustitución de Ser a Asp en la posición 60, y una Ser por una Tyr en la posición 67. La secuencia de ADN y su secuencia de aminoácidos traducida son las que se indican a continuación:

```

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt      48
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1          5          10          15

ggt cac tcc gac atc cag ctg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc      96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
          20          25          30

agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg      144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
          35          40          45

act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag      192
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
          50          55          60

ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca agc aga      240
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
  65          70          75          80

ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc      288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
          85          90          95

ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc      336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
          100          105          110

tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-3'
386
Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
          115          120          125

```

10

Otro constructo de V_K (es decir, VK2) tiene las secuencias DQMDY del marco de RE1 original restaurado. El ADN y la secuencia de aminoácidos correspondiente se proporcionan a continuación:

ES 2 554 754 T3

```

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt      48
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15

gtc cac tcc agc atc gtg atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc      96
Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
          20           25           30

agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg      144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
          35           40           45

act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag      192
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
          50           55           60

ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca gat aga      240
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
  65           70           75           80

ttc agc ggt agc ggt tat ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc      288
Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
          85           90           95

ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc      336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
          100          105          110

tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-3'
386 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
          115          120          125

```

Un tercer constructo de V_K es VK3 tiene SVM versus DQM en el extremo amino terminal y otros dos cambios de residuos. El ADN y la secuencia de aminoácidos correspondiente son:

```

5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt      48
N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15

gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc      96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
          20           25           30

agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg      144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
          35           40           45

act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag      192
Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
          50           55           60

ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca gat aga      240
Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
  65           70           75           80

ttc agc ggt agc ggt tat ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc      288
Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
          85           90           95

ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc      336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
          100          105          110

tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-3'
386 Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
          115          120          125

```

Los detalles respecto a la preparación de cada una de estas secuencias de las cadenas ligera y pesada se proporcionan en la patente de Estados Unidos N° 6,602,503. En general, se pueden preparar diversas combinaciones de las cadenas ligera y pesada anteriores basándose en el modelado por computadora, como se sabe en el área.

- 10 Otros anticuerpos que reconocen y se unen a la integrina α_4 son conocidos en el área. Por ejemplo, GG5/3 (Keszthelyi et al., *Neurology* 47(4): 1053-1059 (1996)), FW3-218-1 (ATCC N°: HB-261; un anticuerpo IgG2b contra la integrina α_4 de oveja), y R1-2 (ATCC N°: HB-227; IgG2b anticuerpo desarrollado en *Rattus norvegicus*). Ya sea que los anticuerpos se desarrollen en ratón u otros animales, cada una de las secuencias puede ser modificada por ingeniería genética de modo que sean humanizadas basándose en lo que se sabe en el área y con ayuda del
- 15 modelado por computadora. Los anticuerpos humanizados anti-integrina α_4 pueden después ser evaluados respecto su habilidad para diagnosticar y/o tratar afecciones inflamatorias intestinales en los ensayos *in vitro* e *in vivo* dados a conocer en este documento.

5.4 Fragmentos de anticuerpos

También se contemplan para usar en el diagnóstico y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias intestinales fragmentos de anticuerpos de los anticuerpos que se unen a anti- $\alpha 4$ o VCAM-1 de modo que inhiben la interacción de VLA-4 y VCAM-1. Más específicamente, esta invención se refiere al uso de natalizumab o a un fragmento inmunológicamente activo de éste para la preparación de un medicamento destinado a la administración a un sujeto en una cantidad eficaz para economizar esteroides a fin de reducir y/o eliminar la necesidad del tratamiento con esteroides en el sujeto que sufre una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones, donde el sujeto está en tratamiento con esteroides. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, scFv y Fv que se pueden usar en las composiciones dadas a conocer en este documento.

La expresión "fragmento Fab" según se usa en este documento se refiere a una molécula parcial de anticuerpo que contiene una sola región de unión al antígeno, que consta de una porción tanto de la cadena pesada como ligera de la molécula.

La expresión "fragmento F(ab')₂" según se usa en este documento se refiere a una molécula parcial de anticuerpo que contiene ambas regiones de unión al antígeno y que consta de las cadenas ligeras y una porción de las cadenas pesadas de la molécula.

La expresión "fragmento Fv" según se usa en este documento se refiere a la porción de la molécula del anticuerpo implicada en el reconocimiento y la unión al antígeno.

El término "scFv" según se usa en este documento se refiere a fragmentos Fv monocatenarios (scFv). Estos fragmentos scFv son derivados de anticuerpos recombinantes que constan sólo de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo unidas por un conector flexible. Los fragmentos de anticuerpo scFv contienen los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde dichos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Por una revisión de scFv véase Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, 269-315 (Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York 1994).

También están incluidos en los fragmentos de anticuerpos los diacuerpos. El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, donde los fragmentos contienen un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Utilizando un conector que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8.

Los fragmentos de anticuerpos también incluyen anticuerpos lineales. La expresión "anticuerpos lineales" cuando se usa en toda esta solicitud se refiere a los anticuerpos descritos por ejemplo en Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10): 1057-62. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1), que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación para el antígeno y todavía es capaz del entrecruzamiento del antígeno.

Se han descrito previamente varios anticuerpos monoclonales anti-VLA-4 de ratón. Véanse, por ejemplo las patentes de Estados Unidos N° 6,602,503; 6,033,665; y 5,840,299; Sanchez-Madrid et al., 1986, Eur. J. Immunol. 16: 1343-9; Hemler et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 11478-85; Pulido et al., 1991, J. Biol. Chem., 266: 10241-45; Issekutz et al., 1991, J. Immunol., 147: 109 (TA-2 MAb)). Por ejemplo, los anticuerpos anti-VLA-4 que reconocen los epítomos de la cadena α_4 de VLA-4 implicados en la unión a los ligandos VCAM-1 y fibronectina (es decir, anticuerpo que se pueden unir a VLA-4 en un sitio implicado en el reconocimiento del ligando y bloquean la unión de VCAM-1 y fibronectina). Dichos anticuerpos han sido definidos como anticuerpos específicos para el epítopo B (B1 o B2) (Pulido *et al.*, 1991, *supra*).

Además, hay anticuerpos homólogos monoclonales totalmente humanos contra VLA-4 que pueden bloquear o recubrir los ligandos de VLA-4. En su forma intacta éstos se pueden preparar usando esplenocitos humanos cebados *in vitro* como describen Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147: 86-95. Alternativamente, se pueden preparar mediante clonación del repertorio como describen Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 2432-36 o Huang et al., 1991, J. Immunol. Meth., 141: 227-236. La patente de Estados Unidos N° 5,798,230 (25 de agosto 1998, "Process for the preparation of human monoclonal antibodies and their use") describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de linfocitos B humanos. Según este proceso, los linfocitos B

productores de anticuerpos humanos son immortalizados por infección con un virus de Epstein-Barr, o un derivado de éste, que exprese el antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr (EBNA2). La función de EBNA2, que es necesaria para la immortalización, se desactiva a continuación, lo que resulta en un aumento de la producción del anticuerpo. Otros métodos son bien conocidos en el área.

- 5 Aún por otro método para producir anticuerpos totalmente humanos, véase, por ej. la patente de Estados Unidos N° 5,789,650, que describe animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos y animales transgénicos no humanos que tienen genes de inmunoglobulina endógenos inactivados. Los genes de inmunoglobulina endógenos son suprimidos por polinucleótidos antisentido y/o por antisueros dirigidos contra
- 10 inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos heterólogos son codificados por genes de inmunoglobulina que normalmente no se encuentran en el genoma de esa especie de animal no humano. Uno o más transgenes que contienen secuencias de cadenas pesadas de inmunoglobulina humana heteróloga sin rearreglar, se introducen en un animal no humano formando así un animal transgénico capaz de rearreglar las secuencias de la inmunoglobulina transgénica y producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana. Dichos anticuerpos humanos heterólogos se producen en linfocitos B, que luego son immortalizados, por
- 15 ej., por fusión con una línea celular de immortalización como un mieloma o por manipulación de los linfocitos B mediante otras técnicas para perpetuar una línea celular capaz de producir un anticuerpo homólogo monoclonal, heterólogo, completamente humano. En general, se pueden usar grandes bibliotecas de expresión en fago humanas no inmunizadas para aislar anticuerpos de gran afinidad que se pueden desarrollar como productos terapéuticos humanos empleando la tecnología de fago estándar.
- 20 Luego de los métodos anteriores para la preparación de "anticuerpos quiméricos" verdaderos (es decir, donde toda la región variable y toda la región constante derivan de fuentes diferentes), se describió un nuevo método en EP 0239400 (Winter et al.) donde los anticuerpos son alterados por sustitución (en una determinada región variable) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para un especie con las de otra. Habitualmente, se puede usar este proceso, por ejemplo, para sustituir las CDR de los dominios de la región variable de la cadena pesada y
- 25 ligera de la Ig humana con las CDR de los dominios de la región variable murina. Estas regiones variables de Ig alteradas se pueden combinar a continuación con regiones constantes de Ig humana para anticuerpos creados, que son completamente humanos en la composición excepto por las CDR murinas sustituidas. Se puede prever que será menos probable que dichos anticuerpos con CDR sustituidas provoquen una respuesta inmunitaria en humanos en comparación con los anticuerpos quiméricos verdaderos, porque los anticuerpos con CDR sustituidas contienen considerablemente menos componentes no humanos. El proceso para humanizar anticuerpos monoclonales a través de "injerto" de CDR ha sido denominado "reformado" (Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-7; y Verhoeven et al., 1988, Science 239: 1534-6).

5.5 Purificación de anticuerpos

- 35 Cuando se usan técnicas de recombinación, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, se eliminan los restos de partículas, de las células huésped o los fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10: 163-7 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos, que son secretados en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fenilmetilsulfoniifluoruro (PMSF) en aproximadamente 30 min.
- 40 Los residuos celulares se pueden eliminar por centrifugación. En los casos en que el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero generalmente empleando un filtro de concentración de proteína comercial, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.
- 45 La composición del anticuerpo preparado a partir de las células está sujeta preferentemente a al menos a un paso de purificación previo a la LPHIC. Los ejemplos de pasos de purificación adecuados incluyen cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad, siendo la cromatografía por afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede
- 50 usar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62: 1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., 1986 EMBO J. 5: 1567-75). La matriz a la cual está unido el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero se dispone de otras matrices. Matrices mecánicamente estables como de vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápida y tiempos de procesamiento más breves que
- 55 los que se logran con agarosa. Cuando el anticuerpo contiene un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase reversa, la cromatografía en sílice, la cromatografía en heparina SEPHAROSE™, la cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), el cromatofoco, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.
- 60

Luego del paso o los pasos de purificación preliminares, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes se somete a LPHIC. A menudo, la composición del anticuerpo que se va a purificar estará presente en un tampón del paso de purificación previo. Sin embargo, puede ser necesario agregar un tampón a la composición del anticuerpo antes del paso de LPHIC. Muchos tampones están disponibles y pueden ser elegidos con la experimentación de rutina. El pH de la mezcla que contiene el anticuerpo que se va a purificar y al menos un contaminante en un tampón de carga se ajusta a un pH de aproximadamente 2.5-4.5 usando ácido o base dependiendo del pH de partida. Preferentemente, el tampón de carga tiene una concentración de sal baja (es decir, menos de aproximadamente 0.25 M en sal).

La mezcla se carga en la columna de HIC. Las columnas de HIC contienen generalmente una matriz básica (por ej., agarosa reticulada o material copolimérico sintético) a la cual se acoplan los ligandos hidrófobos (por ej., grupos alquilo o arilo). Una columna de HIC preferida contiene una resina de agarosa sustituida con grupos fenilo (por ej., una columna de fenil SEPHAROSE™). Se dispone de muchas columnas de HIC comerciales. Los ejemplos incluyen, entre otros, columna Fenil SEPHAROSE 6 FAST FLOW™ con alta o baja sustitución (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna Fenil SEPHAROSE™ de alto rendimiento (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna Octil SEPHAROSE™ de alto rendimiento (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columnas FRACTOGEL™ EMD Propilo o FRACTOGEL™ EMD Fenilo (E. Merck, Alemania); soportes MACRO-PREP™ Metilo o MACRO-PREP™ t-Butilo (Bio-Rad, California); columna WP HI-Propilo (C₃)™ (J. T. Baker, New Jersey 6); y columnas Éter, Fenil o Butil TOYOPEARL™ (TosoHaas, PA).

El anticuerpo se eluye de la columna usando un tampón de elución que normalmente es el mismo tampón de carga. El tampón de elución puede ser elegido con la experimentación de rutina. El pH del tampón de elución es entre aproximadamente 2.5-4.5 y tiene una baja concentración de sal (es decir, menos de aproximadamente 0.25 M en sal). Se descubrió que no es necesario usar un gradiente de sal para eluir el anticuerpo de interés; el producto deseado se recupera en el flujo a través de la fracción que no se une significativamente a la columna.

El paso de LPHIC proporciona una manera de separar un anticuerpo correctamente plegado y unido por disulfuro de los contaminantes indeseados (por ej., fragmentos ligeros y pesados incorrectamente asociados). En particular, el método proporciona un medio para eliminar sustancialmente una impureza caracterizada como un fragmento de anticuerpo correctamente plegado cuyas cadenas ligera y pesada no se pudieron asociar a través de un enlace disulfuro.

Las formulaciones de diagnóstico o terapéuticas de la proteína purificada se pueden preparar proporcionando la composición de anticuerpo en forma de un portador fisiológicamente aceptable, cuyos ejemplos se proporcionan más adelante.

Para eliminar contaminantes (por ej., anticuerpo sin plegar y fragmentos ligeros y pesados incorrectamente asociados) de la columna de HIC de modo que se pueda reutilizar, se puede hacer fluir a través de la columna una composición que contenga urea (por ejemplo urea 6.0 M, tampón de MES al 1% de pH 6.0, sulfato de amonio 4 mM). Otros métodos son bien conocidos en el área.

5.6 Formulaciones de inmunoglobulina

El anticuerpo y la inmunoglobulina que tienen el efecto terapéutico deseado se pueden administrar a un sujeto en un portador fisiológicamente aceptable. El anticuerpo se puede administrar de diversas maneras por ejemplo, pero no exclusivamente, por administración parenteral que incluye las vías de administración subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial o intralesional, localizada (por ej., aplicación quirúrgica o supositorio quirúrgico) y pulmonar (por ej., aerosoles, inhalación o polvo) y como se describe además más adelante.

Dependiendo del modo de introducción, la inmunoglobulina se puede formular de diversas maneras. La concentración de la inmunoglobulina terapéuticamente activa en la formulación (es decir, una formulación suficiente para diagnosticar y/o tratar afecciones inflamatorias intestinales) puede variar entre 1 mg/ml y 1 g/ml. Preferentemente, la composición de inmunoglobulina cuando se administra a un sujeto que la necesita, alcanza una concentración sanguínea de inmunoglobulina en el sujeto de 10 ng/ml o más.

Preferentemente, la inmunoglobulina se formula para administración parenteral en un portador inerte adecuado, como una solución salina fisiológica estéril. Por ejemplo, la concentración de inmunoglobulina en la solución de portador es habitualmente de 1-100 mg/ml. La dosis administrada será determinada por la vía de administración. Las vías preferidas de administración incluyen la administración parenteral o intravenosa.

Para la administración parenteral, el anticuerpo de la invención se puede administrar como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril como agua y aceites con o sin la adición de un surfactante y otras preparaciones farmacéuticamente aceptables son las de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles como el propilenglicol o polietilenglicol son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. El anticuerpo de esta invención se puede administrar en forma de una inyección en depot o preparación para implante, que se puede formular de

manera de permitir una liberación sostenida del principio activo. Una composición preferida contiene el anticuerpo monoclonal en una concentración de 5 mg/mL, formulada en un tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6.0 con HCl.

5 De acuerdo con una característica importante de la invención, la inmunoglobulina que reconoce y se une a VLA-4 se puede administrar sola, o en combinación con otro agente que se use habitualmente para tratar una enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías. La administración de estos agentes puede tener lugar antes, simultáneamente o después de la administración de la inmunoglobulina, donde el otro agente no es un esteroide.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o inmunoglobulina, es decir, natalizumab, se puede estimar por comparación con dosis eficaces establecidas para anticuerpos conocidos, junto con los datos obtenidos para natalizumab tanto en los modelos *in vivo* como *in vitro*. Preferentemente los datos son de los estudios del tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y espondiloartropatías, según corresponda. Como se sabe en el área, puede ser necesario el ajuste de la dosis debido a la degeneración o el metabolismo de la inmunoglobulina, la administración sistémica versus localizada, así como la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el género, la dieta, el tiempo de administración, las interacciones con otros fármacos y la gravedad de la afección del sujeto al cual se administra la inmunoglobulina. Un técnico con experiencia basándose en la experimentación de rutina puede llevar a cabo esos ajustes y determinar las dosis adecuadas.

25 Las formulaciones terapéuticas de la inmunoglobulina se preparan para el almacenamiento mezclando la inmunoglobulina que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., A. Osol, Ed., 1980 y ediciones más recientes), en forma de la torta liofilizada o soluciones acuosas. Los portadores excipientes o estabilizantes de la inmunoglobulina aceptables son atóxicos, no son terapéuticos ni inmunógenos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluidas glucosa, manosa o dextrinas; quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal como sodio; y/o surfactantes no iónicos como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG). Los ejemplos específicos de moléculas portadoras incluyen, pero no exclusivamente, glucosaminoglucanos (por ej., sulfato de heparina), ácido hialurónico, sulfato de queratán, condroitin 4-sulfato, condroitin 6-sulfato, sulfato de heparina, sulfato de dermatina, perlecán y pentopolisulfato.

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen la inmunoglobulina también pueden contener si se desea, portadores o diluyentes atóxicos, farmacéuticamente aceptables, que son vehículos utilizados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. El diluyente se elige de modo que no afecte la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos incluyen, pero no exclusivamente, agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank.

El agente de la invención se puede formular en preparaciones para inyección disolviéndolo, suspendiéndolo o emulsionándolo en un solvente acuoso o no acuoso, como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol. La formulación también puede contener aditivos, como solubilizantes, agentes isotónicos, suspendientes, emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

45 La inmunoglobulina también se puede utilizar en una formulación en aerosol para ser administrada por inhalación o por administración pulmonar. El agente de la presente invención se puede formular en propelentes presurizados aceptables como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

50 La inmunoglobulina se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ej., microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de polimetilmetacrilato), en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*.

55 La inmunoglobulina que se va a utilizar para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se lleva a cabo fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución. La inmunoglobulina se almacenará corrientemente en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones de inmunoglobulina terapéuticas se colocan en general en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón perforable con una aguja para inyección hipodérmica o un instrumento afilado similar.

- Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, donde dichas matrices están en forma de artículos modelados, por ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ej., poli(2-hidroxietilmetacrilato) como describen Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente de Estados Unidos N° 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556, 1983), etilenoacetato de vinilo no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT™ (es decir, microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico (EP 133,988).
- Si bien los polímeros como etilenoacetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más breves. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo por un período prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que resulta en una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenia. Se pueden concebir estrategias razonables para la estabilización de la inmunoglobulina dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede obtener modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos adecuados, desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas, y similares.
- Las composiciones de inmunoglobulina de liberación sostenida también incluyen inmunoglobulina atrapada en liposomas. Los liposomas que contienen la inmunoglobulina se preparan por métodos conocidos *per se*. Véase, por ej., Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-92 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4 (1980); patentes de Estados Unidos N° 4,485,045; 4,544,545; 6,139,869; y 6,027,726. Corrientemente, los liposomas son de tipo pequeño (200 a 800 Angstrom), unilamelares, en los cuales el contenido de lípido es mayor de aproximadamente 30 mol por ciento (mol. %) de colesterol; ajustándose la proporción elegida para la terapia con inmunoglobulina óptima.
- La inmunoglobulina de esta invención se puede administrar en una forma de liberación sostenida, por ejemplo en forma de una inyección en depot, una preparación para implante o una bomba osmótica, que se pueden formular de manera de permitir una liberación sostenida del principio activo. Los implantes para formulaciones de liberación sostenida son bien conocidos en el área. Los implantes se formulan como microesferas, placas, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el huésped. El implante se coloca próximo al sitio de depósitos de proteínas (por ej., el sitio de formación de depósitos amiloides asociados a trastornos neurodegenerativos), de modo que la concentración local del principio activo sea mayor en ese sitio con respecto al resto del organismo.
- Además, la inmunoglobulina de la invención se puede proporcionar por administración de un polinucleótido que codifica un anticuerpo parcial o completo (por ej., un Fv monocatenario) a un sujeto. El polinucleótido se administra a un sujeto en un vehículo adecuado para permitir la expresión de la inmunoglobulina en el sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- Una dosis diaria típica puede variar para la inmunoglobulina de aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados en este documento. Generalmente, el clínico administrará la inmunoglobulina hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia se sigue fácilmente mediante ensayos convencionales.
- Una formulación de anticuerpo o fragmento de anticuerpo "estable" es aquella en que la proteína contenida en ella conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. En el área se dispone de diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de una proteína y se analizan por ejemplo en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, (Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. 1991) y A. Jones, Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) o a 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2 a 8 °C durante al menos 1 un año, durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferentemente estable luego del congelamiento (por ejemplo a -70 °C) y descongelamiento de la formulación.
- Una proteína "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no presenta signos de agregación, precipitación ni desnaturalización al examen visual del color y/o la transparencia, o cuando se mide por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño.
- Una proteína "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un determinado momento es tal que se considera que la proteína todavía conserva su actividad biológica según se define más adelante. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar modificación del tamaño (por ej., recorte (clipping)) que se puede evaluar utilizando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o

espectrometría de masas de tiempo de vuelo desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI/TOF MS). Otros tipos de alteración química incluyen alteración de la carga (por ej. que se produce como resultado de desamidación) que se puede evaluar por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico.

- 5 Una inmunoglobulina "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica de la inmunoglobulina en un determinado momento está dentro de aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica que mostraba en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica según se determina por ejemplo en un ensayo de unión al antígeno.

5.7 Vías de administración de las composiciones de inmunoglobulina

- 10 Las composiciones farmacéuticas tratadas *supra* se pueden administrar para diagnóstico, tratamientos profiláctico y/o terapéutico de enfermedades inflamatorias intestinales, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que se sospecha que tiene o que ya sufre una enfermedad, en una cantidad suficiente para proporcionar tratamiento. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz.

- 15 Las composiciones farmacéuticas se administrarán mediante administración parenteral, tópica, intravenosa, oral o subcutánea, intramuscular local, tal como mediante aerosol o transdérmicamente, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Aunque las sustancias proteicas de esta invención pueden sobrevivir al pasaje a través del intestino luego de la administración oral (p.o.), subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), se prefieren la administración intraperitoneal mediante inyección en depot; o mediante preparación para implante.

- 20 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en diversas formas farmacéuticas dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen polvo, comprimidos, pastillas, cápsulas y tabletas.

- 25 Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas variará dependiendo de muchos factores diferentes, como el modo de administración, el sitio que es el objetivo, el estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, se deberán titular las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia. Estas composiciones se pueden administrar a mamíferos para uso veterinario y a seres humanos para uso clínico de manera similar a otros agentes terapéuticos, es decir, en un portador fisiológicamente aceptable. En general, las dosis de administración variarán entre 0.0001 y 100 mg/kg, y más generalmente entre 0.01 y 0.5 mg/kg, del peso corporal del huésped.

- 30 En un régimen de tratamiento preferido, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o inyección subcutánea en una dosis entre 1 y 5 mg de anticuerpo por kilo de peso corporal del paciente. La dosis se repite a intervalos de 2 a 8 semanas. Dentro de este rango, el régimen de tratamiento preferido es 3 mg de anticuerpo por kilo de peso corporal repetido a intervalos de 4 semanas.

6.0 Combinaciones de fármacos

- 35 Corrientemente se usan otros fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías. Estos y otros fármacos también están contemplados para usar en combinación con el compuesto y las composiciones de la presente invención. La elección de uno o más agentes para utilizar en un cóctel y/o una combinación con los compuestos y las composiciones dados a conocer en este documento dependerán del manejo de la enfermedad. Por ejemplo, el compuesto y las composiciones dados a conocer se pueden administrar con inmunosupresores para tratar aún más la enfermedad de Crohn y para suprimir los síntomas, donde los inmunosupresores no son esteroides. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones. Las formas farmacéuticas de los agentes que se van a usar en combinación con los compuestos y las composiciones dados a conocer variarán dependiendo del sujeto y de la combinación de fármacos que se va a utilizar.

7.0 Regímenes de dosificación para administración crónica

- 55 El régimen de tratamiento crónico de la presente invención proporciona natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste a un nivel que mantendrá una saturación suficiente del receptor para suprimir la inflamación patológica en un paciente que lo necesita. Los métodos de la invención implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes a una vez cada dos meses, con dosificaciones repetidas teniendo lugar durante un período

de al menos 6 meses y más preferentemente durante un año o más. Los métodos de la invención implican obtener y mantener un nivel de saturación del receptor en un paciente humano de un dímero que comprende integrina α_4 (por ej., VLA-4) en un rango entre 65% y 100%, más preferentemente entre 75% y 100%, y aún más preferentemente entre 80% y 100%. Estos niveles de saturación del receptor se mantienen en esos niveles crónicamente (por ejemplo durante un período de 6 meses o algo así) para permitir la supresión continua de la inflamación patológica.

En una realización específica, la dosificación del agente de la invención es mensual. Se pueden controlar los niveles de saturación del receptor para determinar la eficacia de un régimen de dosificación y se pueden medir marcadores fisiológicos para confirmar el éxito del régimen de dosificación. Como confirmación, se pueden seguir los niveles séricos del anticuerpo para identificar la depuración del anticuerpo y para determinar el efecto potencial de la semivida sobre la eficacia del tratamiento.

Para el tratamiento con el agente de la invención, los rangos de dosis varían entre 0.0001 y 100 mg/kg, y más generalmente entre 0.01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal. Las dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del agente en el paciente. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Para la administración de inmunoglobulina, cada inyección de dosificación tiene generalmente una dosis entre 2.0 y 8.0 mg/kg. Para la administración del compuesto, cada inyección de dosificación tiene generalmente una dosis entre 1.0 y 50.0 mg/kg. De conformidad con las enseñanzas provistas en este documento, las dosis eficaces se pueden controlar obteniendo una muestra de líquido de un paciente. Para esto, generalmente se extrae una muestra de suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo y se determina la saturación del receptor de integrina empleando métodos bien conocidos en el área. Idealmente, se toma una muestra antes de la dosis inicial; se toman y se miden muestras posteriores antes y después de cada tratamiento.

Como alternativa a la administración crónica compuesta de dosificaciones individuales repetidas, el agente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, asma, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), enfermedad injerto contra huésped (EICH), enfermedad huésped contra injerto y diversas espondiloartropatías se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, siempre que la dosis sea tal que los niveles de saturación del receptor sigan siendo suficientes para suprimir la inflamación. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de liberación controlada para administrar crónicamente el agente dentro del alcance de la invención. Se pueden encontrar revisiones sobre formas farmacéuticas de liberación controlada apropiadas en Lesczek Krowczynski, EXTENDED-RELEASE DOSAGE FORMS, 1987 (CRC Press, Inc.).

Las diversas tecnologías de liberación controlada cubren un amplio espectro de formas farmacéuticas. Las tecnologías de liberación controlada incluyen, pero no exclusivamente, sistemas físicos y sistemas químicos. Los sistemas físicos incluyen, entre otros, sistemas de depósito con membranas que controlan la velocidad, como microencapsulación, macroencapsulación y sistemas de membrana; sistemas de depósito sin membranas que controlen la velocidad, como fibras huecas, triacetato de celulosa ultra microporosa y sustratos poliméricos porosos y espumas; sistemas monolíticos, incluidos los sistemas disueltos físicamente en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ej., no erosionables, erosionables, de penetración de agentes ambientales y degradables), y materiales dispersados físicamente en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ej., no erosionables, erosionables, de penetración de agentes ambientales y degradables); estructuras laminadas, incluidas capas de depósito químicamente similares o no similares a capas de control externas; y otros métodos físicos, como bombas osmóticas, o adsorción en resinas de intercambio iónico.

Los sistemas químicos incluyen, entre otros, erosión química de matrices poliméricas (por ej., erosión heterogénea o homogénea), o erosión biológica de una matriz polimérica (por ej., erosión heterogénea o homogénea). Otras discusiones sobre categorías de sistemas de liberación controlada se pueden encontrar en Agis F. Kydonieus, CONTROLLED RELEASE TECHNOLOGIES: METHODS, THEORY AND APPLICATIONS, 1980 (CRC Press, Inc.).

Los métodos de la invención se pueden usar para tratar a un paciente afectado por un trastorno que involucra o surge de una inflamación patológica de la presente invención o para tratar profilácticamente a un paciente que corre riesgo de sufrir un trastorno en particular. Los regímenes de dosificación necesarios para el tratamiento profiláctico versus terapéutico pueden variar, y necesitarán ser diseñados para el uso específico y el trastorno a tratar.

En algunos métodos, dos o más agentes (por ej., el anticuerpo monoclonal y un compuesto como los descritos antes) se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada agente administrado estará dentro de los rangos indicados. También puede haber terapias de combinación en las que los agentes se administren consecutivamente al paciente con un intervalo de tiempo deseado entre los períodos de administración. Los intervalos también pueden ser irregulares según indique la medición de los niveles de saturación del receptor o siguiendo otros indicios del proceso de la enfermedad.

Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosificación pueden variar como una función del agente específico, la gravedad de los síntomas y la propensión del sujeto a los efectos secundarios. Algunos de los agentes específicos son más potentes que otros. Las dosis preferidas para un agente dado son determinadas fácilmente por los expertos en el área de diversas maneras. Un modo preferido es medir la potencia fisiológica de un determinado agente.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran crónicamente a un paciente propenso a, o de lo contrario que corre riesgo de, sufrir una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retrasar el inicio de la enfermedad. Dicha cantidad se define como una dosis profilácticamente eficaz. En los pacientes con esclerosis múltiple en remisión, el riesgo se puede evaluar por
5 imagenología de NMR o, en algunos casos, mediante indicaciones pre sintomáticas observadas por el paciente.

Los regímenes de dosificación eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas variará dependiendo de muchos factores diferentes, como el modo de administración, el sitio que es el objetivo, el estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, se deberán titular las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia. En general, cada administración del régimen de dosificación variará entre 0.0001 y 100 mg/kg, habitualmente entre 0.01 y 50, y más habitualmente entre 0.1 y 30
10 mg/kg del peso corporal del huésped.

8.0 Reactivos de prueba

En general, los reactivos se pueden probar *in vitro* e *in vivo*. Existen muchos modelos *in vitro* para probar si un reactivo se une a la subunidad α_4 , como es bien sabido en el área. Probar si un reactivo tiene actividad *in vivo* para el diagnóstico y/o el tratamiento de afecciones inflamatorias intestinales, así como de otras afecciones inflamatorias, se puede llevar a cabo usando el modelo animal de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). La EAE es una afección inflamatoria del sistema nervioso central con similitudes con la esclerosis múltiple (Paterson, IN
15 TEXTBOOK OF IMMUNOPATHOLOGY, eds. Miescher and Mueller-Eberhard, 179-213, Grune and Stratton, N.Y. 1976).

Se puede evaluar la capacidad de cortes cerebrales con EAE para soportar la unión de leucocitos empleando, por ejemplo, un ensayo de unión *in vitro* descrito en Stamper y Woodruff, J. Exp. Med. 144: 828-833 (1976). Se puede examinar la actividad inhibitoria de reactivos contra receptores de adhesión de leucocitos en el ensayo de cortes *in vitro*. La unión de células U937 (una línea celular de monocitos humanos) es casi completamente bloqueada por anticuerpos contra la integrina VLA-4 humana. El anticuerpo de la presente invención produjo un efecto bloqueante
20 significativamente mayor en comparación con los anticuerpos contra otras moléculas de adhesión.

En general, los anticuerpos que inhiben selectivamente la actividad de unión a la fibronectina de la integrina α_4 (P4G9 y HP1/7) aumentaron la unión de U937 a los vasos con EAE. Estos resultados sugieren que la actividad de unión a la fibronectina de la integrina α_4 no participa directamente en la adhesión de U937 a los vasos con EAE *in vitro*. Dados los resultados *in vitro* del uso de los reactivos de $\alpha_4\beta_1$ descritos antes, el efecto de estos anticuerpos sobre el avance de la EAE también se puede probar *in vivo* midiendo el retraso en la aparición de parálisis o la
25 disminución en la gravedad de la parálisis.

En general, se pueden identificar otros reactivos mediante el uso de ensayos de adhesión. Empleando HP2/1 o éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaproliil]-O-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina como control por ejemplo, se pueden cribar otros anticuerpos o reactivos respecto a su capacidad para inhibir la unión de
35 linfocitos a un ligando conocido de la integrina $\alpha_4\beta_1$.

Los anticuerpos monoclonales son por ejemplo HP2/1, TY21.6, TY21.12 y L25 como se trató en la patente de Estados Unidos N° 6,033,665. Estos anticuerpos reaccionan con la cadena α de VLA-4 y bloquean la unión a VCAM-1, fibronectina y células endoteliales cerebrales inflamadas, pero no afectan la actividad de otros miembros de la familia de la integrina β_1 .

Estos son otros reactivos que reaccionan selectivamente contra VLA-4/VCAM-1. Además estos reactivos no afectan las interacciones matriciales (mediadas por todos los miembros de las integrinas β_1) ni afectan la inmunidad intestinal normal (mediada por $\alpha_4\beta_7$). La producción de este reactivo y otros de ese tipo forma parte de las habilidades de los expertos en el área.

En general, los ensayos para determinar si los agentes tienen actividad de $\alpha_4\beta_1$ y/o de $\alpha_4\beta_7$ son conocidos por los expertos.

Por ejemplo, en un ensayo, los compuestos se pueden unir a un soporte sólido y la muestra de integrina $\alpha_4\beta_7$ agregarse a eso. La cantidad de integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$ en la muestra se puede determinar por métodos convencionales como el uso de un ensayo de ELISA sándwich. Además, ciertos compuestos inhiben, *in vivo*, la adhesión de leucocitos a células endoteliales y células epiteliales en órganos mucosos mediada por integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$ y, concordantemente, se pueden usar en el tratamiento de enfermedades mediadas por integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$.
50

La actividad biológica de los compuestos se puede analizar habitualmente en diversos sistemas. Por ejemplo, se puede inmovilizar un compuesto en una superficie sólida y se puede medir la adhesión de células que expresan la integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$. Empleando dichos formatos, se pueden cribar grandes cantidades de compuestos. Las células adecuadas para este ensayo incluyen todos los leucocitos que se sabe que expresan la integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$ como los linfocitos T de memoria y los eosinófilos. También se puede usar una serie de líneas celulares de leucocitos, los ejemplos incluyen la línea celular RPMI-8866.
55

También se puede analizar la capacidad de los compuestos para inhibir competitivamente la unión entre la integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$ y MAdCAM-1, o entre la integrina $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$ y un compuesto marcado que se sabe que se une a la integrina $\alpha_4\beta_1$ como el compuesto de esta invención o los anticuerpos contra la integrina $\alpha_4\beta_7$. En estos ensayos se puede inmovilizar MAdCAM-1 sobre una superficie sólida. MAdCAM-1 también se puede expresar como una proteína de fusión recombinante que tiene una cola Ig (por ej., IgG Fc) de modo que la unión a la integrina $\alpha_4\beta_7$ se puede detectar en un inmunoensayo. Alternativamente, se pueden usar células que expresan MAdCAM-1, como células endoteliales activadas o fibroblastos transfectados con MAdCAM-1.

Tanto $\alpha_4\beta_7$ como $\alpha_4\beta_1$ pueden actuar de mediadores en la adhesión a VCAM-1 y a fibronectina. Por ensayos que miden la capacidad para bloquear la adhesión a VCAM-1 y a fibronectina, estos son ensayos descritos en la publicación de solicitud de patente internacional N° WO US98/15324.

Muchos formatos de ensayo emplean componentes del ensayo marcados. El sistema de marcado puede ser de varias formas. El marcador se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos bien conocidos. Se pueden usar una amplia variedad de marcadores. El componente se puede marcar por cualquiera de varios métodos. El método más común de detección es el uso de autorradiografía con compuestos marcados con ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P o similares. Los marcadores no radiactivos incluyen ligandos que se unen a anticuerpos marcados, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos que pueden servir como miembros del par de unión específica para un ligando marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requisitos de estabilidad y los instrumentos disponibles.

Los modelos *in vivo* apropiados para demostrar la eficacia en el tratamiento de respuestas inflamatorias incluyen EAE (encefalomielitis autoinmunitaria experimental) en ratones, ratas, cobayos o primates, así como otros modelos inflamatorios dependientes de las integrinas α_4 .

El compuesto de la invención se puede modificar según sea necesario para proporcionar las propiedades deseadas como mejores propiedades farmacológicas (por ejemplo estabilidad *in vivo*, biodisponibilidad), o la capacidad de ser detectado en aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, la inclusión de uno o más D-aminoácidos en las sulfonamidas de esta invención aumenta típicamente la estabilidad *in vivo*. La estabilidad se puede determinar de diversas maneras por ejemplo midiendo la semivida de las proteínas durante la incubación con peptidasas o plasma o suero humano. Se han descrito varios de dichos ensayos de estabilidad de proteínas (véase, por ejemplo, Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1990, 15(2):83-93).

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se plantean para proporcionar a los expertos en el área una divulgación y descripción completas de cómo preparar y usar la presente invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud en lo que se refiere a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

Ejemplo 1

Ensayo FACS de MadCAM-1 soluble

Este ensayo mide la interacción de MadCAM-1 recombinante soluble con células RPMI-8866 en suspensión. MadCAM-1 recombinante soluble ("rsMadCAM-1") se expresa como una proteína de fusión con una cola Fc de IgG humana (Tidswell et al., J. Immunol. (1997) 159(3):1497-1505). Se mezcla MadCAM-1 soluble con células RPMI-8866 en presencia y ausencia de inhibidores de molécula pequeña. Se incluye MnCl_2 1 mM en el tampón del ensayo para aumentar la actividad de la integrina $\alpha_4\beta_7$ y para promover su interacción con el constructo de MadCAM-1. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las células se lavan con tampón que contiene MnCl_2 1 mM y se exponen a anticuerpo marcado con fluorescencia contra la cola Fc de la proteína de fusión MadCAM-1 en presencia de MnCl_2 1 mM durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavan, se resuspenden en tampón que contiene MnCl_2 y se examinan por análisis FACS. Se puede realizar un ensayo idéntico para medir la interacción de VCAM-1 recombinante soluble con células que expresan $\alpha_4\beta_1$, como la línea celular Jurkat T.

Ejemplo 2

Ensayo de ELISA sin células

Este ensayo mide la interacción de integrina $\alpha_4\beta_7$ solubilizada con MadCAM-1 que ha sido inmovilizada sobre plástico. Se lisan células RPMI-8866 con un detergente para solubilizar la integrina $\alpha_4\beta_7$. Se agrega al lisado anticuerpo anti-integrina β_7 , 2G3 (Tidswell et al. 1997 J. Immunol. 159(3): 1497-1505). Este anticuerpo sirve para 2 propósitos, en primer lugar, es una etiqueta mediante la cual la integrina $\alpha_4\beta_7$ puede ser detectada en el ensayo, y en segundo lugar, 2G3 es un anticuerpo que estabiliza una conformación ocupada por ligando de la integrina β_7 y promueve las interacciones dependientes de la integrina β_7 . Se agregan el lisado de células, 2G3 y el reactivo de prueba a pocillos de microtitulación que han sido recubiertos con MadCAM-1. La mezcla se deja en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lava, se bloquea con BSA al 1%, y se expone a anti-Ig de

ratón en cabra conjugada a HRP, que reconoce a 2G3 asociado a la integrina $\alpha_4\beta_7$ que se ha unido a MadCAM-1 en el pocillo del ensayo. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se lavan y se exponen a un sustrato para HRP para cuantificar la cantidad de integrina $\alpha_4\beta_7$ que se ha unido a MadCAM-1.

Ejemplo 3

5 Ensayo FACS para ocupación del receptor

Este ensayo mide la interacción del anticuerpo 2G3 con células RPMI-8866 o con linfocitos. El anticuerpo reconoce un epítipo ocupado por ligando de integrina β_7 de rata o humana. Mayores concentraciones de ligando de molécula pequeña inducen al epítipo de 2G3 en la integrina β_7 y permitirán mayores niveles de unión del anticuerpo a la superficie de las células. La concentración de ligando requerida para la ocupación del receptor está relacionada directamente con la afinidad de ligando por la integrina $\alpha_4\beta_7$. Se ha descrito un ensayo similar para examinar la interacción de los ligandos con la integrina $\alpha_4\beta_1$, que utiliza un anticuerpo análogo contra un epítipo ocupado por ligando de la integrina β_1 (anticuerpo 15/7; Yednock et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 28740-50). El ensayo de la integrina β_1 se basa en células que expresan la integrina $\alpha_4\beta_1$ en vez de la integrina $\alpha_4\beta_7$ (como las células Jurkat). En ambos ensayos, las células adecuadas se mezclan con 2G3 o 15/7 en presencia de un ligando de molécula pequeña. Las células se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavan para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se exponen a un anticuerpo contra IgG de ratón marcado fluorescentemente, que detecta a 2G3 o 15/7 asociados a células y las células se examinan por análisis FACS.

Ejemplo 4

Ensayo de adhesión celular *ex vivo*

20 Este ensayo se puede utilizar para medir la adhesión de los linfocitos o las células RPMI-8866 a vénulas endoteliales altas expuestas en cortes de tejido de placas de Peyer (tejido linfoide asociado al intestino). Estos vasos expresan altos niveles de MadCAM-1. Este ensayo es descrito por Yednock et al., JCB (1987) 104: 725-731.

Ejemplo 5

Ensayo de migración *in vivo*

25 Migración de linfocitos marcados con ^{111}In o marcados fluorescentemente a placas de Peyer *in vivo*. En este ensayo, se aíslan linfocitos de un grupo de animales y se marcan con un trazador radioactivo o fluorescente. Las células se inyectan por vía intravenosa a un segundo grupo de animales. Luego de 1 a 24 horas, se puede controlar la localización de las células marcadas para diferentes tejidos determinando el número de cuentas radiactivas asociadas a diferentes tejidos en un contador gamma, o aislando linfocitos del tejido y determinando la cantidad de células que portan una etiqueta fluorescente (determinado por análisis FACS). Este tipo de ensayo es descrito por Rosen et al., 1989 J. Immunol. 142: 1895-1902.

Ejemplo 6

Ensayo para determinar *in vitro* la unión de reactivos candidatos a VLA-4

35 Se utilizó un ensayo *in vitro* para evaluar la unión de reactivos candidatos a la integrina $\alpha_4\beta_1$. Los reactivos que se unen en este ensayo se pueden utilizar para evaluar los niveles de VCAM-1 en muestras biológicas por ensayos convencionales (por ej., ensayos de unión competitiva). Este ensayo es sensible a valores de CI_{50} tan bajos como aproximadamente 1 nM.

40 Se midió la actividad de la integrina $\alpha_4\beta_1$ mediante la interacción de VCAM-1 soluble con células Jurkat (por ej., American Type Culture Collection N° TIB 152, TIB 153 y CRL 8163), una línea de linfocitos T humanos que expresa altos niveles de integrina $\alpha_4\beta_1$. VCAM-1 interacciona con la superficie celular de manera dependiente de la integrina $\alpha_4\beta_1$ (Yednock et al., J. Bio. Chem., 1995, 270:28740).

45 Se expresó VCAM-1 recombinante soluble como una proteína de fusión quimérica que contenía los siete dominios extracelulares de VCAM-1 en el extremo N-terminal y la región constante de la cadena pesada de IgG₁ humana en el extremo C-terminal. La proteína de fusión de VCAM-1 se preparó y purificó de la manera descrita por Yednock, *supra*.

Se cultivaron células Jurkat en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina, estreptomycinina y glutamina como describe Yednock, *supra*.

50 Las células Jurkat se incubaron con MnCl_2 1.5 mM y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo 15/7 durante 30 minutos en hielo. Mn^{+2} activa al receptor para aumentar la unión al ligando, y 15/7 es un anticuerpo monoclonal que reconoce una conformación activada u ocupada por ligando de la integrina $\alpha_4\beta_1$ y traba a la molécula en su conformación estabilizando así la interacción VCAM-1/integrina $\alpha_4\beta_1$. Yednock *et al.*, *supra*. Otros investigadores han preparado anticuerpos similares al anticuerpo 15/7 (Luque *et al.*, 1996, J. Bio. Chem., 271:11067) y pueden ser utilizados en este ensayo.

Después las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los reactivos candidatos, en diversas concentraciones que variaron de 66 µg/mL a 0.01 µg/mL utilizando una dilución seriada de 5 puntos estándar. Después se agregaron 15 µL de proteína de fusión VCAM-1 recombinante soluble a las células Jurkat y se incubaron durante 30 minutos en hielo. (Yednock *et al.*, *supra*).

- 5 Luego las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en F(ab')₂ de cabra anti Fc de IgG de ratón conjugado a PE (Immunotech, Westbrook, ME) a 1:200 y se incubaron en hielo, en la oscuridad, durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces y se analizaron con un análisis clasificador de células activadas por fluorescencia ("FACS") como el descrito en Yednock *et al.*, *supra*.

Los reactivos con una CI₅₀ menor de aproximadamente 15 µM poseen afinidad de unión a α₄β₁.

10 Ejemplo 7

Ensayo de saturación *in vitro* para determinar la unión de reactivos candidatos a α₄β₁

Lo siguiente describe un ensayo *in vitro* para determinar los niveles plasmáticos necesarios para que un reactivo sea activo en el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental ("EAE"), descrito en el ejemplo siguiente, o en otros modelos *in vivo*.

- 15 Células Jurkat en crecimiento logarítmico se lavan y se resuspenden en plasma animal normal que contiene 20 µg/ml del anticuerpo 15/7 (descrito en el ejemplo anterior).

Las células Jurkat se diluyen dos veces en muestras de plasma normal que contienen cantidades de los reactivos candidatos en concentraciones que varían de 66 µg/mL a 0.01 µg/mL, usando una dilución seriada de 12 puntos estándar para una curva estándar, o en muestras de plasma obtenidas de sangre periférica de animales tratados con los reactivos candidatos.

- 20 Después las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato ("PBS") que contiene 2% de suero fetal bovino y cloruro de calcio y cloruro de magnesio cada uno 1 mM (medio de ensayo) para eliminar el anticuerpo 15/7 no unido.

- 25 Después las células se exponen a F(ab')₂ de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado a ficoeritrina (Immunotech, Westbrook, ME), que había sido adsorbido por cualquier reactividad cruzada no específica mediante coincubación con suero al 5% de la especie animal que se está estudiando, a 1:200 y se incuban en la oscuridad a 4 °C durante 30 minutos.

- 30 Las células se lavan dos veces con medio de ensayo y se resuspenden en el mismo. Luego se analizan con un análisis clasificador de células activadas por fluorescencia estándar como el descrito en Yednock *et al.*, 1995, *J. Bio. Chem.*, 270: 28740.

Los datos se grafican como fluorescencia versus dosis, por ejemplo, de manera dosis-respuesta normal. Los niveles de dosis que resultan en la meseta superior de la curva representan los niveles necesarios para obtener eficacia en un modelo *in vivo*.

- 35 Este ensayo también se puede utilizar para determinar los niveles plasmáticos necesarios para saturar los sitios de unión de otras integrinas, como la integrina α₉β₁, que es la integrina más estrechamente relacionada a α₄β₁ (Palmer *et al.*, 1993, *J. Cell Bio.*, 123: 1289).

- 40 Concordantemente, el ensayo descrito antes se puede realizar con una línea celular de carcinoma de colon humano, SW 480 (ATTC N° CCL228) transfectada con ADNc que codifica la integrina α₉ (Yokosaki *et al.*, 1994, *J. Bio. Chem.*, 269:26691), en lugar de las células Jurkat, para medir la unión de la integrina α₉β₁. Como control, se pueden usar células SW 480 que expresan otras subunidades α y β₁.

Utilizando este ensayo, se han establecido los niveles plasmáticos necesarios para obtener eficacia en modelos *in vivo* para α₄β₁ y α₉β₁ para reactivos de la presente invención probados en este ensayo.

Ejemplo 8

Construcción del anticuerpo 21.6 humanizado

- 45 Se construyeron las cadenas ligera y pesada quiméricas uniendo los ADNc clonados por PCR de las regiones V_L y V_H de 21.6 de ratón a regiones constantes humanas. Los extremos 5' y 3' de las secuencias de ADNc de ratón se modificaron usando cebadores de PCR diseñados especialmente. Los cebadores de PCR del extremo 5' (Tabla 1), que se hibridan a las secuencias de ADN que codifican los comienzos de las secuencias líder, se diseñaron para crear las secuencias de ADN esenciales para una traducción eficaz (Kozak, 1987, *Mol. Biol.* 196: 947-950), y para
- 50 crear un sitio de restricción *Hind*III para clonación en un vector de expresión. Los cebadores del extremo 3' que se hibridan a las secuencias de ADN que codifican los extremos de las regiones J, se diseñaron para crear las secuencias de ADN esenciales para el empalme a las regiones constantes, y para crear un sitio *Bam*HI para

clonación en un vector de expresión. Los productos de la amplificación por PCR se digirieron con *HindIII* y *BamHI*, se clonaron en un vector pUC19, y se secuenciaron para confirmar que no se habían producido errores durante la amplificación por PCR. Las regiones variables de 21.6 de ratón adaptadas se subclonaron después en vectores de expresión de células de mamífero que contenían las regiones constantes kappa o gamma-1 humanas.

5

TABLA 1

Cebadores de PCR para la construcción del anticuerpo 21.6 quimérico
A. <u>Región variable de la cadena ligera</u>
1. Cebador para la reconstrucción del extremo 5' (37-mer)
5' C AGA <u>AAG CTT</u> GCC GCC ACC ATG AGA CCG TCT ATT CAG 3' <i>HindIII</i> Secuencia de consenso de Kosak M R P S I Q
2. Cebador para la reconstrucción del extremo 3' (35-mer)
5' CC GAG <u>GAT CCA</u> CTC ACG TTT GAT TTC CAG CTT GGT 3' <i>BamHI</i> Sitio de empalme del donante
B. <u>Región variable de la cadena pesada</u>
1. Cebador para la reconstrucción del extremo 5' (37-mer)
5' C AGA <u>AAG CTT</u> GCC GCC ACC ATG AAA TGC AGC TGG GTC 3' <i>HindIII</i> Secuencia de consenso de Kosak M K C S W V
2. Cebador para la reconstrucción del extremo 3' (33-mer)
5' CC GAG <u>GAT CCA</u> CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC T 3' <i>BamHI</i> Sitio de empalme del donante

Modelado de la estructura de las regiones variables de 21.6 de ratón. Se construyó un modelo molecular de las regiones V_L y V_H del anticuerpo 21.6 de ratón. El modelo se construyó en una estación de trabajo Silicon Graphics IRIS 4D corriendo bajo el sistema operativo UNIX y usando el paquete de modelado molecular QUANTA (Polygen Corp., EE.UU.). La estructura de las FR de la región V_L de 21.6 de ratón se basó en la estructura resuelta de la inmunoglobulina RE1 humana de Bence-Jones (Epp et al., 1975 Biochemistry 14: 4943-4952). La estructura de las FR de la región V_H de 21.6 se basó en la estructura resuelta del anticuerpo de ratón Gloop2. Los residuos idénticos en las FR se conservaron; los residuos no idénticos se sustituyeron usando las facilidades de QUANTA. Se identificaron CDR1 y CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón como pertenecientes a los grupos de estructura canónica 2 y 1, respectivamente (Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917). Dado que CDR1 y CDR2 de RE1 pertenecen a los mismos grupos canónicos, CDR1 y CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón se modelaron sobre las estructuras de CDR1 y CDR2 de RE1. CDR3 de la región V_L de 21.6 de ratón no pareció corresponder a ninguno de los grupos de estructura canónica para las CDR3 de las regiones V_L . Una búsqueda en una base de datos reveló, sin embargo, que CDR3 en la región V_L de 21.6 de ratón fue similar a CDR3 en la región V_L de HyHEL-5 de ratón (Sheriff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8075-8079). Por lo tanto, la CDR3 de la región V_L de 21.6 de ratón se modeló sobre la estructura de CDR3 en la región V_L de HyHEL-5 de ratón. CDR1 y CDR2 de la región V_H de 21.6 de ratón se identificaron como pertenecientes a los grupos 1 y 2 de estructura canónica, respectivamente. CDR1 de la región V_H de 21.6 de ratón se modeló sobre CDR1 de la región V_H de Gloop2, que se parece mucho a los miembros del grupo 1 canónico para las CDR1 de las regiones V_H . CDR2 de la región V_H de 21.6 de ratón se modeló sobre CDR2 de HyHEL-5 de ratón (Sheriff et al., supra), que también es un miembro del grupo 2 canónico para CDR2 para las regiones V_H . Para CDR3 de las regiones V_H , no hay estructuras canónicas. Sin embargo, CDR3 en la región V_H de 21.6 de ratón fue similar a CDR3 en la región V_H de R19.9 de ratón (Lascombe et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA

10

15

20

25

86:607-611), y se modeló sobre esta CDR3, eliminando un residuo extra de serina presente en el apéndice del bucle de CDR3 de la región V_H de R19.9 de ratón, e hibridando y refinando el hueco. El modelo se sometió finalmente a descensos graduales y minimización de energía de los gradientes de conjugado usando el potencial CHARMM (Brooks et al., J. Comp. Chem. 4:187-217), según se implementa en QUANTA, a fin de aliviar los contactos atómicos desfavorables, y optimizar la interacciones de van der Waals y electroestáticas.

Diseño de las regiones variables de 21.6 humano reformado -Selección de anticuerpos homólogos humanos para la secuencia del marco. Las regiones variables humanas, cuyas FR mostraron un elevado porcentaje de identidad con las de 21.6 de ratón, se identificaron mediante comparación de secuencias de aminoácidos. Las tablas 3 y 4 comparan las regiones variables de 21.6 de ratón con todas las regiones variables de ratón conocidas y después con todas las regiones variables humanas conocidas. La región V_L de 21.6 de ratón se identificó como perteneciente al subgrupo 5 de la región V_L kappa de ratón, según definió Kabat. Se identificaron las regiones V_L kappa de ratón individuales que tuvieron una identidad tan alta como 93.4% con la región V_L kappa de 21.6 de ratón (38C13V'CL y PC613'CL). La región V_L de 21.6 de ratón fue muy similar a las regiones V_L kappa humanas del subgrupo 1, según definió Kabat. Se identificaron las regiones V_L kappa humanas individuales que tuvieron una identidad tan alta como 72.4% con la región V_L kappa de 21.6 de ratón. Las regiones marco (FR) de una de las regiones variables humanas más similares, RE1, se usaron en el diseño de la región V_L de 21.6 humano reformado. La región V_H de 21.6 de ratón se identificó como perteneciente al subgrupo 2c de la región V_H de ratón según definió Kabat. Se identificaron las regiones variables de cadena pesada de ratón individuales, que tiene tanto como 93.3% de identidad con la región V_H de 21.6 de ratón (17.2.25'CL y 87.92.6'CL). La región V_H de 21.6 de ratón fue muy similar a las regiones V_H humanas del subgrupo 1, según definieron Kabat *et al.*, *supra*. Se identificaron las regiones V_H humanas individuales que tuvieron una identidad tan alta como 64.7% con la región V_H de 21.6 de ratón. Las regiones marco (FR) de una de las regiones variables humanas más similares, 21/28'CL, se usaron en el diseño de la región V_H de 21.6 humano reformado.

Sustitución de aminoácidos en las regiones marco

(A) Cadena ligera. El siguiente paso en el proceso de diseño de la región V_L de 21.6 humano reformado fue unir las CDR de la región V_L de 21.6 de ratón a las FR de RE1 humano (Palm et al., 1975, Physiol. Chem. 356: 167-191). En la primera versión de la región V_L de 21.6 humano reformado (La), se realizaron 7 cambios en las FR humanas. En las posiciones 104, 105 y 107 en FR4, los aminoácidos de RE1 se sustituyeron con aminoácidos de la región J humana más típica de otra cadena ligera kappa humana (Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327).

En la posición 45 de FR2, la lisina normalmente presente en RE1 se cambió a una arginina según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. Se pensó que el residuo de aminoácido en esa posición era importante para soportar el bucle de CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón.

En la posición 49 de FR2, la tirosina normalmente presente en RE1 se cambió a una histidina según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. Se observó en el modelo que la histidina en esta posición de la región V_L de 21.6 de ratón estaba ubicada en el medio del sitio de unión y podría probablemente tener contacto directo con el antígeno durante la unión antígeno-anticuerpo.

En la posición 58 de FR3, la valina normalmente presente en RE1 se cambió a una isoleucina según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. Se pensó que el residuo de aminoácido en esa posición era importante para soportar el bucle de CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón.

En la posición 69 de FR3, la treonina normalmente presente en RE1 se cambió a una arginina según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. Se observó en el modelo que la arginina en esta posición de la región V_L de 21.6 de ratón estaba ubicada adyacente al bucle de CDR1 de la región V_L de 21.6 de ratón y podría probablemente tener contacto directo con el antígeno durante la unión antígeno-anticuerpo.

Se diseñó una segunda versión de la región V_L de 21.6 humano reformado (denominada Lb) que contenía las mismas sustituciones que antes, excepto que no se realizó ningún cambio en la posición 49 de FR2 de RE1.

(B) Cadena pesada. El siguiente paso en el proceso de diseño de la región V_H de 21.6 humano reformado fue unir las CDR de la región V_H de 21.6 de ratón a las FR de 21/28'CL (Dersimonian et al., 1987, J. Immunol. 139: 2496-2501). En la primera versión de la región V_H de 21.6 humano reformado (Ha), se hicieron cinco cambios en las regiones marco humanas. Los cinco cambios en las FR humanas fueron en las posiciones 27, 28, 29, 30 y 71.

En las posiciones 27, 28, 29 y 30 de FR1, los aminoácidos presentes en 21/28'CL humana se cambiaron a los aminoácidos encontrados en esas posiciones en la región V_H de 21.6 de ratón. Aunque estas posiciones se diseñan para estar dentro de FR1 (Kabat *et al.*, *supra*), las posiciones 26 a 30 son parte de un bucle estructural que forma el bucle de CDR1 de la región V_H . Es probable, por lo tanto, que los aminoácidos en esas posiciones estén directamente implicados en la unión al antígeno. De hecho, las posiciones 27 a 30 son parte de la estructura canónica para CDR1 de la región V_H según definieron Chothia *et al.*, *supra*.

En la posición 71 de FR3, la arginina presente en 21/28'CL humano se cambió a una alanina según se encontró en esa posición en la región V_H de 21.6 de ratón. La posición 71 es parte de la estructura canónica para CDR2 de la

región V_H según definieron Chothia *et al.*, *supra*. A partir del modelo de las regiones variables de 21.6 de ratón, parece que la alanina en la posición 71 es importante para soportar el bucle de CDR2 de la región V_H . Una sustitución de una arginina por una alanina en esta posición interrumpiría muy probablemente la colocación del bucle de CDR2.

- 5 Una segunda versión (Hb) de la región V_H de 21.6 humano reformado contiene los cinco cambios que se describió antes que se hicieron para la versión Ha más un cambio adicional en FR2.

En la posición 44 de FR2, la arginina presente en 21/28'CL humano se cambió a una glicina según se encontró en esa posición en la región V_H de 21.6 de ratón. Basándose en la información publicada sobre el empaquetamiento de las regiones V_L - V_H y en el modelo de las regiones variables de 21.6 de ratón, se pensó que el residuo de aminoácido en la posición 44 podría ser importante en el empaquetamiento de las regiones V_L - V_H .

La versión Hc de la región V de 21.6 humano reformado se diseñó para hacer que el bucle de CDR3 pareciera más similar a VCAM-1 humano. Tanto el anticuerpo 21.6 de ratón como VCAM-1 humano se unen a la integrina $\alpha_4\beta_1$. El bucle de CDR3 de la región V_H de los anticuerpos es el más diverso de los seis bucles de CDR y es generalmente el componente individual más importante de los anticuerpos en las interacciones anticuerpo-antígeno (Chothia *et al.*, *supra*; Hoogenboom & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 227: 381-388); Barbas *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4457-4461). Se identificó alguna similitud de secuencias entre la CDR3 de la región V_H de 21.6 de ratón y los aminoácidos 86 a 94 de VCAM-1 humano, particularmente entre la secuencia de YGN (tirosina-glicina-asparragina) en el bucle de CDR3 y la secuencia de FGN (es decir, fenilalanina-glicina-asparragina) en VCAM-1. Se piensa que estas secuencias están relacionadas con las secuencias de RGD (es decir, arginina-glicina-ácido aspártico) importantes en diversos sucesos de adhesión celular (Main *et al.*, 1992, Cell 71: 671-678). Por consiguiente, en la posición 98 de CDR3, la tirosina presente en la región V_H de 21.6 de ratón se cambió a una fenilalanina según se encontró en la secuencia de VCAM-1 humano.

También se consideró la sustitución en la posición 36 de FR2. La cadena V_H de 21.6 de ratón contiene un residuo de cisteína inusual en la posición 36 de FR2. Esta posición de FR2 es habitualmente un triptófano en secuencias de ratón y humana relacionadas. Aunque los residuos de cisteína son importantes a menudo para la conformación de un anticuerpo el modelo de las regiones variables de 21.6 de ratón no indicó que este residuo de cisteína estuviera implicado directamente o indirectamente en la unión al antígeno por lo que el triptófano presente en FR2 de la región V_H de 21/28'CL humana se dejó sin sustituir en las tres versiones del anticuerpo 21.6 humanizado.

Construcción de anticuerpos 21.6 humanos reformados. La primera versión de la región V_L de 21.6 humano reformado (resh21.6VL_a) se construyó a partir de fragmentos de PCR que se superponen esencialmente como describen Daugherty *et al.*, 1991, Nucleic Acids Res. 19: 2471-2476. La región V_L de 21.6 de ratón, adaptada como se describió *supra* e insertada en pUC19, se usó como plantilla. Se sintetizaron cuatro pares de cebadores, APCR1-vla1, vla2-vla3, vla4-vla5 y vla6-vla7. Los pares adyacentes se superponían en al menos 21 bases. El cebador de APCR1 es complementario del vector pUC19. Se combinaron los pares de cebadores apropiados (0.2 μ mol) con 10 ng de ADN de plantilla, y 1 unidad de ADN polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) en 50 μ L de tampón de PCR que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, dNTPs 200 μ M y $MgCl_2$ 1.5 mM. Cada reacción se llevó a cabo durante 25 ciclos. Después de una fusión inicial a 94 °C durante 5 min, las reacciones se ciclaron a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, y finalmente se incubaron a 72 °C durante otros 10 min. El tiempo de rampa entre la primera hibridación y los pasos de extensión fue de 2.5 min. Los productos de las cuatro reacciones (A, B, C y D) de la primera ronda de reacciones de PCR se extrajeron con fenol y se precipitaron con etanol.

TABLA 2

Cebadores de PCR para la construcción de regiones variables de 21.6 humano reformado
A. Región variable de la cadena ligera
1. <u>Cebadores para la síntesis de la versión "a"</u>
21.6VL _a 1 (39-mer):
5' GAT GGT GAC TCT ATC TCC TAC AGA TGC AGA CAG TGA GGA 3'
21.6VL _a 2 (32-mer):

ES 2 554 754 T3

Cebadores de PCR para la construcción de regiones variables de 21.6 humano reformado
5' CTG TAG GAG ATA GAG TCA CCA TCA CTT GCA AG 3'
21.6VL3 (39-mer):
5' AGG AGC TTT TCC AGG TGT CTG TTG GTA CCA AGC CAT ATA 3'
21.6VL4 (41-mer):
5' ACC AAC AGA CAC CTG GAA AAG CTC CTA GGC TGC TCA TAC AT 3'
21.6VL5 (40-mer):
5' GCA GGC TGC TGA TGG TGA AAG TAT AAT CTC TCC CAG ACC C 3'
21.6VL6 (42-mer):
5' ACT TTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT 3'
21.6VL7 (59-mer):
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTG GTG CCT TGA CCG AAC GTC CAC AGA TT 3'
2. <u>Cebadores para la síntesis de la versión "b"</u>
21.6VLb1 (33-mer): cambios H-49 a Y-49
5' GGA AAA GCT CCT AGG CTG CTC ATA TAT TAC ACA 3'
21.6VLb2 (38-mer): cambios ACC-101 a ACA-101 para destruir un sitio Styl
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTT GTG CC 3'

ES 2 554 754 T3

Cebadores de PCR para la construcción de regiones variables de 21.6 humano reformado
B. Región variable de la cadena pesada
1. <u>Cebadores para la síntesis de la versión "a"</u>
21.6VHa1 (51-mer):
5' AAC CCA GTG TAT ATA GGT GTC TTT AAT GTT GAA ACC GCT AGC TTT ACA GCT 3'
21.6VHa2 (67-mer):
5' AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT G 3'
21.6VHa3 (26-mer):
5' GAC CCG GCC CTG GAA CTT CGG GTC AT 3'
21.6VHa4 (66-mer):
5' GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC ACC TCT GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAA 3'
21.6VHa5 (64-mer):
5' CCA TAG CAT AGA CCC CGT AGT TAC CAT AAT ATC CCT CTC TGG CGC AGT AGT AGA CTG CAG TGT C 3'
21.6VHa6 (63-mer):
5' GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA 3'
2. <u>Cebador para la síntesis de la versión "b"</u>
21.6VHb (37-mer): cambios R-44 a G-44
5'CCA GGG CCG GGTCAC CAT CAC CAG AGA CAC CTC TGC C 3'
3. <u>Cebador para la síntesis de la versión "c"</u>
21.6VHc (27-mer): cambios Y-98 a F-98

Cebadores de PCR para la construcción de regiones variables de 21.6 humano reformado
5'CAG GCC CCT GGC CAA GGG CTG GAG TGG 3'
C. Ambas regiones variables de las cadenas ligera y pesada
Cebadores que se hibridan al ADN del vector pUC19 flanqueante
APCR1 (17-mer, cebador sentido)
5'TAC GCA AAC CGC CTC TC 3'
APCR4 (18-mer, cebador antisentido)
5' GAG TGC ACC ATA TGC GGT 3'

Los productos de PCR A y B, y C y D se unieron en una segunda ronda de reacciones de PCR. Los productos de PCR A y B, y C y D, (50 ng de cada uno) se agregaron a 50 µL de reacciones de PCR (como se describió *supra*) y se amplificaron a través de 20 ciclos como se describió antes, excepto que la temperatura de hibridación se elevó a 60 °C. Los productos de estas reacciones se denominaron E y F. Los pares de cebadores de PCR utilizados fueron APCR1-vla3 y vla4-vla7, respectivamente. Los productos E y F de la PCR se extrajeron con fenol, y se precipitaron con etanol, y después se ensamblaron en una tercera ronda de reacciones de PCR mediante su propia complementariedad, en una reacción de PCR de dos pasos similar a la descrita antes, usando APCR1 y vla7 como los cebadores terminales. El fragmento completamente ensamblado que representa toda la región V_L de 21.6 humano reformado que incluía una secuencia líder, se dirigió con *HindIII* y *BamHI*, y se clonó en pUC19 para la secuenciación. Un clon con la secuencia correcta se denominó resh21.6VLa.

Se construyó la segunda versión de una región V_L de 21.6 humano reformado (Lb) usando cebadores de PCR para hacer modificaciones menores en la primera versión de la región V_L de 21.6 humano reformado (La), por el método de Kamman *et al.*, 1989, Nucl. Acids Res. 17:5404). Se sintetizaron dos conjuntos de cebadores. Cada reacción de PCR se llevó a cabo esencialmente en las mismas condiciones descritas antes. En una primera reacción de PCR, se usó el cebador mutagénico 21.6VLb2 para destruir un sitio *StyI* (Thr-ACC-97 hasta Thr-ACA-97), para producir resh21.6VLa2. Después, en una segunda reacción de PCR, se usó el cebador mutagénico 21.6VLb1 (His-49 hasta Tyr-49), con pUC-resh21.6VLa2 como ADN de plantilla. El producto de PCR se cortó con *StyI* y *BamHI*, y se subclonó en pUC-resh21.6VLa2, se escindió con las mismas enzimas de restricción. Un clon con la secuencia correcta se denominó pUC-resh21.6VLb.

Se construyó la versión "a" de una región V_H de 21.6 humano reformado, usando los mismos métodos de PCR descritos para la construcción de la versión "a" de una región V_L de 21.6 humano reformado. Los fragmentos de ADN *HindIII-BamHI*, que codifican la versión "g" de la región V_H de 425 humano reformado (Kettleborough *et al.*, *supra*), y la versión "b" de la región V_H de AUK12-20 humano reconformado, se subclonaron en vectores pUC19, produciendo pUC-resh425g y pUC-reshAUK12-20b, respectivamente. (La versión "b" de AUK12-20 se obtuvo mediante mutagénesis con PCR de un fragmento V_H a425 descrito por Kettleborough *et al.*, *supra*, y codifica la secuencia de aminoácidos:

QVQLVQSGAEVKCKPGASVKVCSKASGYSFT SYVH WVRQAPGQGLEWVG YIDPFNGGTSYNQKFKG
KVTMTVDSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGN-RFAY WGQGTLLVTVSS

(los espacios separan las regiones FR y CDR).

El plásmido pUC-resh425g y pUC-reshAUK12-20b, así como el vector pUC que contiene la región V_H de 21.6 de ratón, según se modificó para utilizar en la construcción de la cadena pesada de 21.6 quimérico (pUC-chim21.6VH), se usaron como los ADN de plantilla en las reacciones de PCR subsiguientes. Los cebadores de PCR se diseñaron y se sintetizaron para la construcción de la versión "a" de la región V_H de 21.6 humano reformado. El producto A de PCR se obtuvo usando pUC-reshAUK12-20b como ADN de plantilla, y APCR1-vha1 como el par de cebadores de PCR. Los productos B y D de PCR se obtuvieron usando pUC-chim21.6VH como ADN de plantilla, y vha2-vha3 y

vha6-APCR4 como pares de cebadores de PCR, respectivamente. Finalmente, el producto C de PCR se obtuvo usando pUC-resh425g como ADN de plantilla, y vla4-vla5 como el par de cebadores de PCR. El producto final de la PCR se subclonó en pUC19 como un fragmento *HindIII-BamHI* para la secuenciación de ADN. Un clon con la secuencia de ADN correcta se denominó pUC-resh21.6VHa.

5 Las versiones restantes de la región V_H de 21.6 humano reformado se construyeron esencialmente como se describió antes para la construcción de la versión "b" de la región V_L de 21.6 humano reformado. Se sintetizaron dos conjuntos de cebadores. Para la segunda (Hb) y tercera (Hc) versiones se usaron cebadores mutagénicos 21.6VHb (Arg-44 hasta Gly-44) y 21.6VHc (Tyr-98 hasta Phe-98), respectivamente, en las reacciones de PCR con pUC-resh21.6VHa como el ADN de plantilla. Los productos de PCR VHb y VHc se cortaron con enzimas de restricción y se subclonaron en el vector pUC pUC-resh21.6VHa como fragmentos *MscI-BamHI* y *PstI-BamHI*, respectivamente, para producir pUC-resh21.6VHb y pUC-resh21.6VHc.

15 La primera versión de una región V_H de 21.6 humano reformado (Ha) se construyó de manera similar a la utilizada para la construcción de la primera versión de la región V_L de 21.6 humano reformado (La). En este caso, sin embargo, se usaron cebadores de PCR con tres ADN de plantilla diferentes, la región V_H de 21.6 de ratón ya adaptada para la expresión de la cadena pesada de 21.6 quimérico, la versión "g" de la región V_H de 425 humanizado (Kettleborough *et al.*, *supra*), y la versión "b" de la región V_H de AUK12-20 humanizado. La segunda y tercera versiones de una región V_H de 21.6 humanizado (Hb y Hc) se construyeron usando cebadores de PCR para hacer modificaciones menores en la primera versión de la región V_H de 21.6 humanizado (Ha).

TABLA 3

<u>Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena ligera de 21.6 humano reformado.</u>								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	kappa 5 de ratón	kappa 1 humana	RE1 humana	V_L 21.6 HR	Comentario
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2		I	I	I	I		
3	3		Q	Q	Q	Q	Q	
4	4		M	M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	P	
9	9		S	S	S	S	S	
10	10		S	S	S	S	S	
11	11		L		L	L	L	
12	12		S	S	S	S	S	
13	13		A	A	A	A	A	
14	14		S	S	S	S	S	
15	15		L		V	V	V	

ES 2 554 754 T3

<u>Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena ligera de 21.6 humano reformado.</u>								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	kappa 5 de ratón	kappa 1 humana	RE1 humana	V _L 21.6 HR	Comentario
16	16		G	G	G	G	G	
17	17		G	D	D	D	D	
18	18		K	R	R	R	R	
19	19		V	V	V	V	V	
20	20		T	T	T	T	T	
21	21		I	I	I	I	I	
22	22		T	T	T	T	T	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	R	R	Q	K	
25	25		T	A	A	A	T*	
26	26		S	S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	Q*	
27A			-	D	S	-	-	
27B			-	-	L	-	-	
27C			-	-	V	-	-	
27D			-	-	X	-		
27E			-	-	X	-	-	
27F			-	-	-	-	-	
28	28		D	D	S	D	D*	
29	29		I	I	I	I	I*	
30	30		N	S	S	I	N*	
31	31		K	N	N	K	K*	
32	32		Y	Y	Y	Y	Y*	
33	33		M	L	L	L	M*	

ES 2 554 754 T3

<u>Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena ligera de 21.6 humano reformado.</u>								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	kappa 5 de ratón	kappa 1 humana	RE1 humana	V _L 21.6 HR	Comentario
34	34	CDR1	A	N	A	N	A	
35	35	FR2	W	W	W	W	W	
36	36		Y	Y	Y	Y	Y	
37	37		Q	Q	Q	Q	Q	
38	38		H	Q	Q	Q	Q	
39	39		K	K	K	T	T	K en CAMPATH-1H
40	40		P	P	P	P	P	
41	41		G	G	G	G	G	
42	42		K	G	K	K	K	
43	43		R	S	A	A	A	considerar R en otras versiones
44	44		P	P	P	P	P	
45	45		R	K	K	K	R	soporta el bucle de L2, considerar K en otras versiones
46	46		L	L	L	L	L	
47	47		L	L	L	L	L	
48	48		I	I	I	I	I*	
49	49		H	Y	Y	Y	H	en medio del sitio de unión, potencial para interactuar con el antígeno, considerar Y en otras versiones
50	50	CDR2	Y	Y	A	E	Y*	
51	51		T	A	A	A	T*	
52	52		S	S	S	S	S*	
53	53		A	R	S	N	A	
54	54		L	L	L	L	L	

ES 2 554 754 T3

<u>Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena ligera de 21.6 humano reformado.</u>								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	kappa 5 de ratón	kappa 1 humana	RE1 humana	V _L 21.6 HR	Comentario
55	55		Q	H	E	Q	Q	
56	56	CDR2	P	S	S	A	P	
57	57	FR3	G	G	G	G	G	
58	58		I	V	V	V	I	puede estar soportando a L2, considerar V en otras versiones
59	59		P	P	P	P	P	
60	60		S	S	S	S	S	
61	61		R	R	R	R	R	
62	62		F	F	F	F	F	
63	63		S	S	S	S	S	
64	64		G	G	G	G	G*	
65	65		S	S	S	S	S	
66	66		G	G	G	G	G	
67	67		S	S	S	S	S	
68	68		G	G	G	G	G	
69	69		R	T	T	T	R	adyacente a L1, en la superficie próxima al sitio de unión
70	70		D	D	D	D	D	
71	71		Y	Y	F	Y	Y*	F en CAMPATH-1H
72	72		S	S	T	T	T	
73	73		F	L	L	P	F	
74	74		N	T	T	T	T	
75	75		I	I	I	I	I	
76	76		S	S	S	S	S	

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena ligera de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	kappa 5 de ratón	kappa 1 humana	RE1 humana	V _L 21.6 HR	Comentario
77	77		N	N	S	S	S	
78	78		L	L	L	L	L	
79	79		E	E	Q	Q	Q	
80	80		P	Q	P	P	P	
81	81		E	E	E	E	E	
82	82		D	D	D	D	D	
83	83		I	I	F	I	I	
84	84		A	A	A	A	A	
85	85		T	T	T	T	T	
86	86		Y	Y	Y	Y	Y	
87	87		Y	F	Y	Y	Y	
88	88	FR3	C	C	C	C	C	
89	89	CDR3	L	Q	Q	Q	L	
90	90		Q	Q	Q	Q	Q*	
91	91		Y	G	Y	Y	Y*	
92	92		D	N	N	Q	D*	
93	93		N	T	S	S	N*	
94	94		L	L	L	L	L*	
95	95		-	P	P	P	-	
95A			-	P	E	-	-	
95B			-	-	-	-	-	
95C			-	-	-	-	-	
95D			-	-	-	-	-	
95E			-	-	-	-	-	

ES 2 554 754 T3

<u>Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena ligera de 21.6 humano reformado.</u>								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	kappa 5 de ratón	kappa 1 humana	RE1 humana	V _L 21.6 HR	Comentario
95F			-	-	-	-	-	
96	95		W	R	W	Y	W*	
97	96	CDR3	T	T	T	T	T	
98	97	FR4	F	F	F	F	F	
99	98		G	G	G	G	G	
100	99		G	G	Q	Q	Q	
101	100		G	G	G	G	G	
102	101		T	T	T	T	T	
103	102		K	K	K	K	K	
104	103		L	L	V	L	V	como en CAMPATH-1H
105	104		E	E	E	Q	E	como en CAMPATH-1H
106	105		I	I	I	I	I	
106A			-	-	-	-	-	
107	106	FR4	K	K	K	T	K	como en CAMPATH-1H

Legenda: (Kabat) numeración según Kabat *et al., supra*; (Nº) numeración secuencial como se usó en el modelado molecular; (21.6 de ratón) secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo 21.6 de ratón; (kappa 5 de ratón) secuencia de consenso de las regiones V_L de kappa de ratón del subgrupo 5 (Kabat *et al., supra*); (kappa 1 humana) secuencia de consenso de las regiones V_L humanas del subgrupo 1 (Kabat *et al., supra*); (RE1 humana) secuencia de aminoácidos de una región V_L humana (Palm *et al., Physiol. Chem.* 356: 167-191 (1975)); (RH V_L 21.6) secuencia de aminoácidos de la versión L1 de la región V_L de 21.6 humano reformado; (*) residuos que forman parte de las estructuras canónicas para los bucles de CDR (Chothia *et al., supra*); (subrayado) residuos en las FR humanas en las que se cambió el residuo de aminoácido.

TABLA 4

<u>Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.</u>								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
1	1	FR1	E	E	Q	Q	Q	
2	2		V	V	V	V	V	

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
3	3		Q	Q	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	L	
5	5		Q	Q	V	V	V	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	G	
9	9		A	A	A	A	A	
10	10		E	E	E	E	E	
11	11		L	L	V	V	V	
12	12		V	V	K	K	K	
13	13		K	K	K	K	K	
14	14		P	P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	G	
16	16		A	A	A	A	A	
17	17		S	S	S	S	S	
18	18		V	V	V	V	V	
19	19		K	K	K	K	K	
20	20		L	L	V	V	V	
21	21		S	S	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	C	
23	23		T	T	K	K	K	
24	24		A	A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	G*	

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
27	27		F	F	Y	Y	F*	estructura canónica H1, considerar Y en otras versiones
28	28		N	N	T	T	N*	estructura canónica H1, sobre la superficie
29	29		I	I	F	F	I*	estructura canónica H1, considerar F en otras versiones
30	30	FR1	K	K	T	T	K*	estructura canónica H1, sobre la superficie
31	31	CDR1	D	D	S	S	D*	
32	32		T	T	Y	Y	T*	
33	33		Y	Y	A	A	Y	
34	34		I	M	I	M	I*	
35	35		H	H	S	H	H	
35A			-	-	-	-	-	
35B		CDR1	-	-	-	-	-	
36	36	FR2	C	W	W	W	W	residuo enterrado, sin una función obvia especial para C
37	37		V	V	V	V	V	
38	38		K	K	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	Q	
40	40		R	R	A	A	A	
41	41		P	P	P	P	P	
42	42		E	E	G	G	G	
43	43		Q	Q	Q	Q	Q	
44	44		G	G	G	R	R	empaquetamiento de V _L - V _H , considerar G en otras versiones

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
45	45		L	L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	E	
47	47		W	W	W	W	W	
48	48		I	I	M	M	M	
49	49	FR2	G	G	G	G	G	
50	50	CDR2	R	R	W	W	R	
51	51		I	I	I	I	I	
52	52		D	D	N	N	D	
52A	53		P	P	P	A	P*	
52B			-	-	-	-	-	
52C			-	-	-	-	-	
53	54		A	A	G	G	A*	
54	55		N	N	N	N	N*	
55	56		G	G	G	G	G*	
56	57		Y	N	D	N	Y	
57	58		T	T	T	T	T	
58	59		K	K	N	K	K	
59	60		Y	Y	Y	Y	Y	
60	61		D	D	A	S	D	
61	62		P	P	Q	Q	P	
62	63		K	K	K	K	K	
63	64		F	F	F	F	F	
64	65		Q	Q	Q	Q	Q	
65	66	CDR2	G	G	G	G	G	

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
66	67	FR3	K	K	R	R	R	
67	68		A	A	V	V	V	
68	69		T	T	T	T	T	
69	70		I	I	I	I	I	
70	71		T	T	T	T	T	
71	72		A	A	A	R	A*	estructura canónica H2, soporta a H2
72	73		D	D	D	D	D	
73	74		T	T	T	T	T	
74	75		S	S	S	S	S	
75	76		S	S	T	A	A	
76	77		N	N	S	S	S	
77	78		T	T	T	T	T	
78	79		A	A	A	A	A	
79	80		Y	Y	Y	Y	Y	
80	81		L	L	M	M	M	
81	82		Q	Q	E	E	E	
82	83		L	L	L	L	L	
82A	84		S	S	S	S	S	
82B	85		S	S	S	S	S	
82C	86		L	L	L	L	L	
83	87		T	T	R	R	R	
84	88		S	S	S	S	S	
85	89		E	E	E	E	E	

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
86	90		D	D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	T	
88	92		A	A	A	A	A	
89	93		V	V	V	V	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	Y	
91	95		F	Y	Y	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	C	
93	97		A	A	A	A	A	
94	98	FR3	R	R	R	R		
95	99	CDR3	E	G	A	G	E	
96	100		G	Y	P	G	G	
97	101		Y	Y	G	Y	Y	
98	102		Y	Y	Y	Y	Y	
99	103		G	Y	G	G	G	
100	104		N	D	S	S	N	
100A	105		Y	S	G	G	Y	
100B	106		G	X	G	S	G	
100C	107		V	V	O	-	V	
100D	108		Y	G	C	-	Y	
100E	109		A	Y	Y	-	A	
100F	110		M	Y	R	M	-	
100G			-	A	O	-	-	
100H			-	M	D	-	-	
100I			-	-	Y	-	-	

ES 2 554 754 T3

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones variables de la cadena pesada de 21.6 humano reformado.

Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón	1 humana	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
100J			-	-	-	-	-	
100K			-	-	F	-	-	
101	111		D	D	D	N	-	
102	112	CDR3	Y	Y	Y	Y	-	
103	113	FR4	W	W	W	W	-	
104	114		G	G	G	G	G	
105	115		Q	Q	Q	Q	Q	
106	116		G	G	G	G	G	
107	117		T	T	T	T	T	
108	118		S	X	L	L	L	
109	119		V	V	V	V	V	
110	120		T	T	T	T	T	
111	121		V	V	V	V	V	
112	122		S	S	S	S	S	
113	123	FR4	S	S	S	S	S	

Legenda: (Kabat) numeración según Kabat *et al., supra*; (Nº) numeración secuencial como se usó en el modelado molecular; (21.6 de ratón) secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo 21.6 de ratón; (2c de ratón) secuencia de consenso de las regiones V_H de de ratón del subgrupo 2c (Kabat *et al., supra*); (1 humana) secuencia de consenso de las regiones V_H humanas del subgrupo 1 (Kabat *et al., supra*); (21/28'CL humana) secuencia de aminoácidos de una región V_H humana (Dersimonian *et al., J. Immunol., 139: 2496-2501 (1987)*); (V_H de 21.6 HR) secuencia de aminoácidos de la versión H1 de la región V_H de 21.6 humano reformado; (*) residuos que forman parte de las estructuras canónicas para los bucles de CDR (Chothia *et al., supra*); (subrayado) residuos en las FR humanas en las que se cambió el residuo de aminoácido.

Ejemplo 9

Natalizumab

- 5 Natalizumab es un anticuerpo recombinante humanizado (rhAb) dirigido contra la molécula de integrina $\alpha 4$ e inhibe la unión celular mediada por $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) y las integrinas $\alpha 4\beta 7$. Natalizumab se une al subcomponente $\alpha 4$, que es expresado en leucocitos, predominantemente linfocitos. La unión del anticuerpo monoclonal múnido a la integrina $\alpha 4$ bloquea la interacción de $\alpha 4\beta 1$ en esos leucocitos con su contrarreceptor en las células endoteliales, VCAM-1. Se cree que el bloqueo de estas interacciones de la molécula de adhesión celular evita el tráfico de estos leucocitos a través del endotelio vascular y, posteriormente al tejido parenquimatoso.

Las integrinas α_4 se unen a ligandos adicionales en los tejidos, incluidos osteopontina y epítomos de fibronectina. Otro mecanismo del natalizumab incluye la supresión de las reacciones inflamatorias en proceso en tejidos enfermos por inhibición de leucocitos positivos a α_4 con estos ligandos. Por lo tanto, natalizumab suprime la actividad inflamatoria existente presente en el sitio de la enfermedad, junto con la inhibición del reclutamiento de otras células inmunitarias en el tejido inflamado mediante la interacción con VCAM-1 y MadCAM-1.

El trabajo sobre enfermedad inflamatoria intestinal (EII) ha demostrado la expresión de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión celular adresina de la mucosa (MadCAM-1) en sitios activos de inflamación tanto en intestino inflamado como no inflamado en sujetos con EII, lo que sugiere que el reclutamiento de leucocitos a la mucosa contribuye a la respuesta inflamatoria característica de la EII. Por consiguiente, un agente que interrumpa las interacciones VCAM-1/ $\alpha_4\beta_1$ y MadCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ podría provocar la reducción de la migración de linfocitos y atenuar la liberación de citocinas y otras sustancias que causan lesión tisular. Los estudios de anticuerpos anti-integrina α_4 en el tití cabeza blanca (TCB), una especie primate que sufre una forma de EII crónica que tiene un patrón similar de expresión de moléculas de adhesión claves en el tejido intestinal inflamado, demostraron una mejora altamente significativa en la colitis aguda en comparación con el placebo.

Se han llevado a cabo estudios de toxicidad monodosis y multidosis en ratones, cobayos y monos. Todos los estudios toxicológicos se realizaron utilizando natalizumab e incluyeron un estudio agudo en cobayos, estudios sub agudos en ratón y monos cangrejeros, y estudios de mutagenicidad y de reactividad cruzada tisular. Estos estudios no mostraron una evidencia clínica o postmortem de una toxicidad significativa.

En los ratones, hay evidencia de que la integrina α_4 y VCAM-1 tienen un papel en el desarrollo de la placenta y cardíaco, y también tienen una función más amplia en el desarrollo fetal. Por consiguiente, hay un riesgo abortivo o teratogénico si la integrina α_4 es bloqueada por natalizumab. Un estudio preliminar de toxicidad reproductiva expuso grupos de cinco monas cangrejas preñadas a dosis intravenosas repetidas de 0.06, 0.3 o 30 mg/kg de natalizumab. Una de las cinco hembras preñadas del grupo de 30 mg/kg abortó el día 31 de la gestación después de recibir cinco dosis de natalizumab. Debido a que la tasa global de aborto está comprendida en la tasa de aborto espontáneo en esta especie, no se consideró que este suceso estuviera relacionado con el natalizumab. Un estudio de seguimiento de toxicidad reproductiva en proceso expuso grupos de 10 a 15 monas cangrejas preñadas a dosis intravenosas repetidas de 3, 10 o 30 mg/kg. Las muertes embrionarias se produjeron en tasas similares en todos los grupos de tratamiento: dos en el grupo de control, una en el grupo de 3 mg/kg, dos en el grupo de 10 mg/kg y dos en el grupo de 30 mg/kg, respectivamente. Como precaución, las mujeres en edad reproductiva deben utilizar un método anticonceptivo eficaz durante todo el estudio y durante al menos 3 meses después de la última infusión del fármaco del estudio, y deben tener una prueba de embarazo negativa en el momento de cada administración de natalizumab.

En el estudio de toxicidad multidosis de seis meses en primates, se observó una inflamación linfoplasmocítica de mínima a suave de la mucosa del ciego, el colon y/o el recto en aproximadamente la mitad de los animales tratados con natalizumab de todos los grupos de dosis y no se encontró en el grupo tratado con vehículo. La inflamación se caracterizó por mayor número de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia con ocasionales abscesos de cripta. Hubo un ligero aumento en la incidencia y la magnitud del cambio en el colon y el recto de los animales de los grupos que recibieron dosis de natalizumab de 30.0 y 60.0 mg/kg/por semana, lo que indica una relación dosis-respuesta. Sin embargo, aunque hubo una posible relación dosis-respuesta la incidencia de la inflamación no se relacionó con los niveles séricos de natalizumab. Si bien estos cambios pueden reflejar algo de infección subyacente en el tracto intestinal en los animales afectados, el ligero aumento de la incidencia y la magnitud de la inflamación en los animales de los grupos de las dos dosis más alta de natalizumab, combinada con la falta de su presencia en el grupo de control, indica que natalizumab puede probablemente tener un papel en este proceso.

Estudios previos sobre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se resumen a continuación. Un estudio fue un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, sobre la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de una sola infusión de natalizumab intravenoso 3 mg/kg en sujetos hombres y mujeres con diagnóstico de enfermedad de Crohn crónica activa. Se inscribieron treinta sujetos; 18 fueron tratados con natalizumab (3 mg/kg) y 12 con placebo. Dos semanas después del tratamiento, 7 sujetos tratados con natalizumab (39%) y 1 sujeto tratado con placebo (8%) estaban en remisión clínica (índice de actividad de la enfermedad de Crohn (IAEC) <150) ($p = 0.1$). Además, en la semana 2 post tratamiento, menos sujetos tratados con natalizumab (11%) necesitaron tratamiento de rescate en comparación con los sujetos tratados con placebo (33%). Las puntuaciones medias de IAEV disminuyeron significativamente tanto a las 2 como las 4 semanas post tratamiento sólo en el grupo de natalizumab, en comparación con las puntuaciones medias iniciales de IAEV. Estos efectos no se mantuvieron más allá de las 4 semanas post tratamiento y se correlacionan con las bajas concentraciones séricas de natalizumab observadas en el tiempo de toma de datos semana 4.

El tratamiento con natalizumab con una única dosis intravenosa de 3 mg/kg fue seguro y bien tolerado por sujetos con EC. Ningún sujeto fue retirado del estudio debido a la aparición de un evento adverso. Seis sujetos informaron de un evento adverso grave; todos los sujetos estaban en el grupo tratado con natalizumab. Ninguno de esos eventos fue mortal. Cinco de los seis eventos fueron admisiones por recaídas o empeoramiento de la enfermedad de Crohn en el sujeto, el otro evento adverso grave fue admisión por anemia. No hubo una diferencia significativa entre

los grupos tratados con natalizumab y placebo en la incidencia de los eventos adversos informados con más frecuencia (cefalea, enfermedad de Crohn y dolor abdominal).

Un segundo estudio previo fue un estudio abierto sobre la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de una única infusión intravenosa de 3 mg/kg de natalizumab en sujetos hombres y mujeres con colitis ulcerosa activa. Se eligieron diez sujetos y se trataron con natalizumab (3 mg/kg). A las 2 y 4 semanas post tratamiento, 5 sujetos (50%) tuvieron una buena respuesta clínica, definida como una puntuación del índice de actividad de Powell-Tuck (IAPT) ≤ 5 y las puntuaciones medias de IAPT disminuyeron de 9.7 en la semana 0 a 6.9, 5.7, y 4.9, 1, 2 y 4 semanas post tratamiento, respectivamente. Las puntuaciones medias de IAPT se mantuvieron suprimidas durante el período de 12 semanas del estudio. Setenta por ciento de los sujetos no recibió tratamiento de rescate entre las semanas 0 y 4.

Los eventos adversos informados con mayor frecuencia en este estudio fueron agravamiento de la colitis ulcerosa, cefalea, vómitos, letargo y dolor de garganta. De los 30 eventos adversos informados en este estudio, sólo 3 se consideraron relacionados con el fármaco del estudio. Estos fueron una incidencia de cada uno de cefalea, agravamiento de la colitis ulcerosa y letargo. Hubo dos eventos caracterizados como importantes; ambos eventos fueron informes de colitis ulcerosa agravada que no se consideraron relacionados con el tratamiento. Tres sujetos informaron un evento adverso grave. Ninguno de esos eventos fue mortal. Estos eventos fueron una incidencia de *Campylobacter enteritis*; una recidiva de colitis ulcerosa, que resultó en la retirada del sujeto del estudio; y un episodio de escalofríos, fiebre, cefalea y vómitos.

Otro estudio previo fue un estudio multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, con grupo paralelo, sobre la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de una o dos infusiones intravenosas de placebo, o de 3 o 6 mg/kg de natalizumab en sujetos con enfermedad de Crohn de moderada a gravemente activa. Un total de 248 sujetos fueron aleatorizados de los cuales 244 recibieron al menos una dosis del fármaco del estudio. Sesenta y ocho sujetos fueron aleatorizados para recibir una única infusión de 3 mg/kg, 66 dos infusiones de 3 mg/kg con un intervalo de 4 semanas, 51 dos infusiones de 6 mg/kg con un intervalo de 4 semanas y 63 para recibir placebo. Natalizumab fue superior al placebo para inducir la remisión (IAEC < 150) en al menos uno de los tres grupos de tratamiento activo, en las semanas 4, 6, 8 y 12. La tasa de remisión más alta de 46% se observó en la semana 6 en el grupo que recibió dos infusiones de 3 mg/kg, se observaron tasas de remisión de 41-43% en las semanas 8 y 12 en este grupo y en el grupo que recibió dos infusiones de 6 mg/kg. Natalizumab fue superior al placebo para inducir una respuesta (≥ 70 puntos o ≥ 100 puntos de caída en IAEC) en al menos uno de los tres grupos de tratamiento activo, en las semanas 2, 4, 6, 8 y 12. Las tasas de respuesta más altas de 73% (≥ 70 puntos de caída) y 56% (≥ 100 puntos de caída) se observaron en la semana 6 en el grupo que recibió dos infusiones de 3 mg/kg. También se lograron mejoras estadísticamente significativas en la calidad de vida, evaluada con el cuestionario sobre enfermedad inflamatoria intestinal, y disminuciones en la proteína C reactiva.

El tratamiento con natalizumab pareció seguro y bien tolerado por los sujetos con enfermedad de Crohn activa. Un número similar de sujetos de cada grupo de tratamiento fue retirado debido a eventos adversos: 2, 1, 2 y 3 sujetos de los grupos de placebo, de una dosis de infusión de 3.0 mg/kg, de dos dosis de infusión de 3 mg/kg y de dos dosis de infusión de 6 mg/kg, respectivamente. Un total de 32 sujetos informaron un evento adverso grave durante la fase principal del estudio (9, 8, 8 y 7 en los grupos de placebo, de una dosis infusión de 3.0 mg/kg, de dos dosis de infusión de 3 mg/kg y de dos dosis infusión de 6 mg/kg, respectivamente). Ninguno de estos eventos fue mortal ni se evaluó que estuviera relacionado con el fármaco del estudio. La mayoría de estos eventos fueran admisiones para el tratamiento de las complicaciones o los síntomas de la enfermedad de Crohn. Los eventos que no estuvieron relacionados con la enfermedad que se informaron con mayor frecuencia en al menos dos de los grupos de tratamiento con natalizumab incluyeron dolor torácico, fiebre, gripe, mareo y conjuntivitis.

Uso del natalizumab en el tratamiento de la enfermedad de Crohn

La mayoría de los sujetos con enfermedad de Crohn responderán inicialmente a los medicamentos disponibles incluidas las formulaciones 5-ASA (sulfasalazina, mesalazina, olsalazina) y esteroides orales (por ej., prednisolona, metilprednisolona, budesonida). Más recientemente, se han desarrollado agentes dirigidos contra el factor de necrosis tumoral (el anticuerpo anti-TNF α , infliximab) para el tratamiento de enfermedad de Crohn grave resistente y fistulizante resistente. Sin embargo, algunos pacientes continúan teniendo la enfermedad debilitante y existe la necesidad de un mejor tratamiento para los sujetos cuya enfermedad no es bien controlada por la terapia actual.

Existe evidencia de un aumento regulado de MadCAM-1 y VCAM-1 en pacientes con EII, con pruebas de que la interacción MadCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$ actúa de mediadora en el regreso de los linfocitos al intestino. El papel potencial de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 4$ en la EII fue respaldado inicialmente por los resultados de estudios en el tít de cabeza blanca y más recientemente por los resultados del natalizumab en ensayos clínicos.

Se planearon otros dos estudios, descritos en detalle más adelante, para confirmar los resultados anteriores y se diseñaron para inducir la respuesta y/o la remisión en una población de sujetos con enfermedad de Crohn de moderada a gravemente activa (IAEC ≥ 220 , ≤ 450). Los sujetos del primer estudio que respondieron y luego tuvieron una enfermedad levemente activa (puntuación IAEC < 220 y ≥ 70 puntos de caída) se inscribieron en un estudio posterior, que fue diseñado para determinar si la administración repetida de natalizumab puede mantener la

respuesta y/o la remisión. Dada la naturaleza crónica de la EC es claramente importante que se evalúen nuevos agentes respecto a su capacidad para reducir o eliminar la actividad de la enfermedad durante un periodo de tiempo más prolongado. Además, el enfoque de mantener una mejora una vez alcanzada también refleja los objetivos de la práctica clínica actual.

5 La principal herramienta para evaluar la eficacia es el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (IAEC). El IAEC fue desarrollado para el estudio US National Co-operative Crohn's Study (NCCDS) en 1979 y es la más conocido de las puntuaciones clínicas de la EC. Es utilizado ampliamente en los ensayos clínicos de nuevas terapias y ha ganado aceptación general como un criterio de valoración para la actividad clínica. Una puntuación de IAEC <150 se acepta generalmente como remisión, puntuaciones de ≥ 150 a 220 <se consideran enfermedad ligeramente activa mientras que puntuaciones de ≥ 220 a <450 se consideran enfermedad moderadamente a gravemente activa.

10 Por consiguiente, una pérdida de respuesta se define como una puntuación de IAEC ≥ 220 y una pérdida de la remisión como una puntuación de IAEC ≥ 150 . Estas definiciones en combinación con el uso de la intervención de rescate, fueron utilizados en el los análisis del mantenimiento de la respuesta y la remisión en este estudio.

15 Otros criterios de valoración para este estudio incluyen la evaluación a través del cuestionario sobre enfermedad inflamatoria intestinal, una herramienta de calidad de vida que ha sido desarrollada para la población con EII, y el SF-3612 que ofrece una evaluación más genérica de la calidad de vida y que es favorecido por algunas autoridades reguladoras. También se evaluaron los cambios en los marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, ya que permitirán suprimir los esteroides orales concomitantes en el subgrupo de los sujetos que los reciben.

20 La dosis inicial de natalizumab elegida para la evaluación clínica se basó en estudios no clínicos en el modelo de encefalitis alérgica experimental (EAE) en cobayos. Estos estudios demostraron que una dosis de 3 mg/kg de natalizumab produjo tanto un importante retraso en el inicio como una inversión de los signos y síntomas de la EAE; dosis más bajas de natalizumab no fueron eficaces. Una dosis única de 3 mg/kg parece proporcionar las concentraciones séricas de natalizumab asociadas a bloqueo del receptor de la integrina $\alpha 4$ durante hasta aproximadamente 3 semanas y 6 mg/kg durante aproximadamente 6 semanas.

25 Natalizumab ha sido evaluado en todos los ensayos clínicos hasta la fecha mediante administración de dosis ajustada por peso corporal. Los datos farmacocinéticos de una dosis única de ensayos clínicos completados en voluntarios sanos y en sujetos con EM y EII mostraron que una infusión de 3 mg/kg de natalizumab puede mantener concentraciones séricas de natalizumab de 2.5-3.0 $\mu\text{g/mL}$, niveles que se asocian a un grado de saturación del receptor suficiente y la inhibición de la adhesión celular durante 3-4 semanas. Una sola infusión de una dosis mayor de 6 mg/kg de natalizumab produjo niveles de saturación de integrina $\alpha 4$ que fueron ligeramente mayores y más prolongados (aproximadamente 6 semanas).

30 Se encontró que los efectos farmacodinámicos y la respuesta terapéutica observados en estos estudios de fase II están relacionados con la dosis de natalizumab y las concentraciones séricas de natalizumab. Basándose en estos resultados, junto con el conocimiento de que la depuración de natalizumab es muy independiente del peso corporal, se investigó el rango de exposiciones producido por una dosis fija de 300 mg para determinar si la administración de dosis fijas podría reemplazar la dosis ajustada por peso corporal.

35 A través del modelado farmacocinético y suponiendo que AUC es proporcional a la dosis total, se demostró que una dosis fija de 300 mg producirá exposiciones de natalizumab que se superponen a las exposiciones observadas para las dosis de 3 mg y 6 mg/kg utilizadas en los ensayos clínicos de fase II. Por lo tanto, puesto que la dosis de 3 mg/kg fue eficaz tanto en la indicación para la EC como para la EM, la dosis de 6 mg/kg no dio lugar a evidencia de toxicidades limitantes de la dosis y no hubo ningún beneficio adicional de la dosis de 6 mg/kg sobre la dosis de 3 mg/kg, una dosis fija de 300 mg es una opción adecuada para los estudios de fase III.

40 Se realizó un estudio doble ciego, controlado con placebo sobre la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de Tysabri intravenoso (natalizumab 300 mg al mes) para mantener la respuesta clínica y la remisión en los pacientes con enfermedad de Crohn (EC). Los objetivos fueron comparar la capacidad de natalizumab versus el placebo para mantener una respuesta clínica en sujetos con EC, para comparar la capacidad de natalizumab versus el placebo para mantener la remisión clínica en sujetos con EC, para comparar los efectos de natalizumab versus el placebo sobre la calidad de vida medida por el cuestionario sobre enfermedad inflamatoria intestinal (CEII) y para comparar la capacidad de natalizumab versus el placebo para permitir a los sujetos lograr la supresión de los esteroides orales.

Diseño del estudio

45 Se llevó a cabo un estudio de fase III, internacional, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, con grupo paralelo, de sujetos con enfermedad de Crohn (EC) previamente activa (definida como moderadamente a gravemente activa, IAEC ≥ 220 , <450) que respondieron al tratamiento en la semana 10 y mantuvieron esa respuesta hasta la semana 12 en un primer estudio (definida como una disminución ≥ 70 puntos respecto al IAEC inicial) y cuya enfermedad era ligeramente activa (definida como una puntuación del IAEC de <220).

En este grupo hubo una subpoblación que había logrado la remisión (definida como una puntuación del IAEC de <150) en la semana 10 del primer estudio. Los sujetos que no pudieron mantener la respuesta desde la semana 10 hasta la semana 12 no fueron elegibles para el segundo estudio y continuaron en la fase de seguimiento de seguridad del primer estudio. A los sujetos que recibieron medicamentos concomitantes para la EC se les permitió inscribirse siempre que las dosis se hubieran mantenido estables a lo largo de su participación en el primer estudio. Todos los medicamentos concomitantes para la EC se mantuvieron estables durante la totalidad de la fase de tratamiento de 12 meses (hasta el mes 15) con excepción de los esteroides orales que fueron reducidos según un algoritmo fijo). En el momento de presentación de esta solicitud, sólo se disponía de 9 meses de datos.

Se administraron 300 mg al mes de natalizumab por 12 infusiones. El placebo se administró mensualmente por 12 infusiones. Los sujetos se estratificaron según su estado de la enfermedad (remisión versus sin remisión, es decir, un IAEC <150 o \geq 150), el uso concomitante de esteroides orales y el uso concomitante de inmunosupresores.

Una vez aleatorizados, los sujetos recibieron su primera infusión. Después de eso, regresaron a la clínica mensualmente (donde 1 mes se define como un período de 4 semanas) para la evaluación y la infusión. La introducción de cualquier nuevo medicamento para la enfermedad de Crohn o un cambio de dosis de un medicamento concomitante existente para la EC (con excepción de la retirada de los esteroides orales según el algoritmo fijo) no fue permitido a menos que se considerara necesario a efectos de intervención de rescate. Una vez rescatado, ese sujeto era considerado un fracaso del tratamiento.

Los sujetos recibirán hasta 12 infusiones en este estudio y volverán para la evaluación final de la fase del tratamiento 1 mes después de la última infusión (es decir, al mes 15).

20 Tamaño de la muestra

Se esperaba que aproximadamente 380 sujetos respondieran al tratamiento y tuvieran una enfermedad ligeramente activa en la semana 10 en el primer estudio (definida como \geq 70 puntos de disminución en la puntuación del IAEC y una puntuación del IAEC de <220 y sin uso de la intervención de rescate), mantenida hasta la semana 12/mes 3. Se esperaba que 285 se inscribieran en el segundo estudio, suponiendo una tasa de deserción de 25% de los sujetos elegibles entre los dos estudios. De éstos, se esperaba que 200 sujetos hubieran logrado la remisión (definida como puntuación del IAEC <150).

A un tamaño de muestra de 285 sujetos aleatorizados y dosificados (142 por grupo de tratamiento; relación 1:1) se le adjudicó una potencia de 90% al 5% de significación para detectar una diferencia entre el grupo de tratados con natalizumab y el grupo tratado con placebo en el mantenimiento de las tasas de respuesta (definido como una puntuación del IAEC de <220 y sin uso de la intervención de rescate), suponiendo una tasa de respuesta de 65% para natalizumab y una tasa de respuesta de 44% para el placebo y permitiendo una tasa de deserción del 10%.

Concordantemente, al subgrupo de 200 sujetos en remisión, aleatorizados y dosificados se le adjudicó una potencia de 90% al 5% de significación para detectar una diferencia entre el grupo tratado con natalizumab y el grupo del placebo en el mantenimiento de la remisión (definido como una puntuación del IAEC de <150 y sin uso de la intervención de rescate), suponiendo una tasa de respuesta de 55% para natalizumab y una tasa de respuesta de 30% para el placebo y permitiendo una tasa de deserción del 10%.

Los sujetos elegibles en la semana 10 del primer estudio consintieron y se inscribieron en el segundo estudio, para permitir a los sujetos que estaban tomando esteroides orales concomitantes comenzar una disminución gradual de los esteroides. Los sujetos que continuaban cumpliendo los criterios de elegibilidad en la semana 12/mes 3, es decir, a tiempo para la siguiente infusión mensual, se volvieron a aleatorizar e ingresaron en la fase de tratamiento que tendría hasta 12 meses de duración (es decir, hasta el mes 15). Los sujetos eran hombres o mujeres de 18 años de edad o mayores.

Formulación y dosis del fármaco

Se administró natalizumab intravenoso en una dosis de 300 mg. Natalizumab se proporcionó en viales de 5 mL a una concentración de 20 mg/mL. Todas las infusiones se prepararon en bolsas de 100 mL de solución salina al 0.9%. Los viales de natalizumab contenían 20 mg/mL de natalizumab en tampón de fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y 0.02% de polisorbato 80, ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico.

Para el grupo de control, el placebo se proporcionó en viales compatibles de 5 mL que contenían tampón de fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y 0.02% de polisorbato 80, ajustado a un pH de 6.0 con ácido fosfórico.

50 Vía de administración

Natalizumab o el placebo se administraron por infusión intravenosa durante aproximadamente 60 minutos, a una velocidad de flujo de 2 mL/min. Todos los sujetos fueron observados durante las 2 horas siguientes al comienzo de cada infusión.

Procedimientos

5 Los procedimientos incluyeron examen físico, signos vitales, peso corporal, IAEC, CEII, SF-36, Evaluación Global del sujeto, muestras de sangre para hematología, bioquímica, proteína C reactiva (PCR), anticuerpos antinucleares (ANA), niveles séricos de natalizumab, anticuerpos anti-natalizumab y prueba de embarazo, muestras de orina para análisis de orina y prueba de embarazo, evaluación de eventos adversos, medicamentos concomitantes e intervención de rescate.

Criterios de valoración primarios, secundarios y terciarios

Criterio de valoración primario:

10 El criterio de valoración primario fue el tiempo hasta la pérdida de la respuesta (definida como una puntuación del IAEC de 220 o el uso de intervención de rescate) para los sujetos en respuesta a la semana 12.

Criterios de valoración secundarios:

- 15 1. Criterio de valoración primario contingente: Tiempo hasta la pérdida de la remisión (definida como una puntuación del IAEC de 150 o el uso de intervención de rescate) para los sujetos en remisión en la semana 12 (definido como una puntuación del IAEC <150).
- 15 2. Proporción (%) de los sujetos en remisión en la semana 12 (definida como una puntuación del IAEC <150) que permanecían en remisión (definida como una puntuación del IAEC <150 y sin uso de la intervención de rescate) después de 12 meses (es decir, en el mes 15).
- 20 3. Cambio medio desde el inicio en el CEII en CD301, en el mes 9.
- 20 4. Número (%) de sujetos que no están tomando esteroides, en el mes 9. Número (%) de sujetos en remisión (definida como una puntuación del IAEC <150 y sin uso de la intervención de rescate) y que no están tomando esteroides orales, en el mes 9.

Criterios de valoración terciarios:

- 25 1. Número (%) de sujetos con enfermedad ligeramente activa (definida como una puntuación del IAEC de <220 y sin uso de la intervención de rescate), en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 25 2. Número (%) de los sujetos en remisión (definida como una puntuación del IAEC <150 y sin uso de la intervención de rescate), en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 30 3. Número (%) de sujetos con una puntuación del IAEC <200 y sin uso de la intervención de rescate, en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 30 4. Puntuación media del IAEC en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 30 5. Cambio medio desde el inicio en el CEII en CD301, en los meses 3, 6, 12 y 15.
- 30 6. Cambio medio desde el inicio en SF36 en CD301, en los meses 3, 6, 9, 12 y 15.
- 30 7. Cambio medio desde el inicio en la evaluación global del sujeto en CD301, en los meses 3, 6, 9, 12 y 15.
- 35 8. Número (%) que no están tomando esteroides orales, en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 35 9. Número (%) de sujetos en remisión (definida como una puntuación del IAEC <150 y sin uso de la intervención de rescate) y que no están tomando esteroides orales, en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 35 10. Tiempo hasta el primer uso de la intervención de rescate (incluida la intervención quirúrgica).
- 40 11. Número (%) de sujetos que requieren intervención de rescate (incluida la intervención quirúrgica), en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
- 40 12. Cambio medio desde el inicio en la proteína C reactiva en CD301 (en los sujetos que tienen un valor elevado de PCR al inicio en CD301) en los meses 3, 6, 9, 12 y 15.
- 40 13. Cambio medio en la albúmina sérica desde la detección en CD301, en los meses 3, 6, 9, 12 y 15.

Consideraciones estadísticas

Los análisis de eficacia se basaron en la población con intención de tratar. El análisis del criterio de valoración primario se repitió para una población por protocolo. Los datos categorizados se presentaron como recuentos y

porcentajes. Los datos continuos se presentaron como estadísticas resumidas. Todas las comparaciones realizadas fueron bilaterales en el nivel de significación de 5%.

5 Los análisis primarios se ajustaron por los factores utilizados para la estratificación así como por la ubicación geográfica y otras covariables preespecificadas. El criterio de valoración primario contingente, tiempo hasta la pérdida de la remisión, se analizó solamente si el criterio de valoración primario de eficacia era estadísticamente significativo al nivel de 5%.

10 Se llevará a cabo un análisis administrativo cuando se disponga de años de datos de 400 pacientes del primer y segundo estudio combinados y cuando cada sujeto tenga un mínimo de 3 meses de datos (es decir, haya completado el primer estudio hasta la semana 12 como mínimo o haya completado la semana 12/mes 3 en el segundo estudio).

Fármaco del estudio

15 El fármaco del estudio se proporcionó (natalizumab o placebo) en viales transparentes, tapados, individuales de 5 mL de 20 mg/mL cada uno de natalizumab o placebo. Los viales se empacaron en cajas de 3 viales para protegerlos de la luz. Cada caja se rotuló con un número de caja único de 6 dígitos y contenía suficiente fármaco del estudio para una infusión.

Los viales de natalizumab contenían 20 mg/mL de natalizumab en tampón de fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y 0.02% de polisorbato 80, ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico. El placebo se proporcionó en viales compatibles de 5 mL y contenían tampón de fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y 0.02% de polisorbato 80, ajustado a pH 6.0 con ácido fosfórico.

Dosis del fármaco del estudio

20 Los sujetos aleatorizados para recibir natalizumab recibieron 300 mg mensuales (es decir, cada 4 semanas) mediante una infusión intravenosa por hasta 12 infusiones.

Preparación del fármaco del estudio

25 Se extrajeron quince mililitros de solución salina, un volumen equivalente al del fármaco del estudio que se va a agregar, de la bolsa de 100 mL de solución salina al 0.9% y se desecharon. Después se extrajeron un total de 15 mL del fármaco del estudio de los tres viales en una jeringa de 50 mL a través de una aguja de calibre 18 o 19 y se agregaron con cuidado en la bolsa de solución salina a través de una aguja de calibre 20-23 a través del diafragma del puerto para la medicación. La dilución se realizó empleando una técnica aséptica.

Administración del fármaco del estudio

30 La administración del fármaco del estudio se produjo cada 4 semanas por infusión intravenosa. Cada infusión tomó aproximadamente 60 minutos. La infusión se realizó a una velocidad de flujo de aproximadamente 2 mL/min. Una vez que la bolsa de 100 mL del fármaco del estudio se vació, fue reemplazada por la bolsa de 50 mL de solución salina para enjuagar la línea de infusión a la misma velocidad de flujo.

Disminución gradual de los esteroides orales

35 Todos los sujetos que recibieron esteroides orales debieron someterse a una disminución gradual inmediatamente después de ingresar en el segundo estudio utilizando el algoritmo siguiente. Los sujetos con una dosis equivalente a > 10 mg de prednisolona comenzará su reducción a razón de 5 mg cada 7 días hasta alcanzar una dosis de 10 mg. Los sujetos con dosis equivalentes a 10 mg de prednisolona la redujeron a razón de 2.5 mg cada 7 días hasta que la suprimieron completamente. Los sujetos que tomaban budesonida la redujeron a razón de 3 mg cada 3 semanas.

Examen físico

40 Se realizaron y se realizarán exámenes físicos completos en el mes 6, mes 9, mes 12 y mes 15 y como parte de la visita de interrupción prematura para los sujetos que fueron retirados antes del mes 15. Se registró el peso corporal en cada visita como parte de la evaluación de la puntuación del IAEC. Se registraron los signos vitales en cada visita. En las visitas en las que se administraron las infusiones, los signos vitales se registraron inmediatamente antes (minuto 0) y al final de la infusión.

Evaluaciones de la calidad de vida

50 Las evaluaciones de calidad de vida, consistentes en una evaluación global del sujeto, cuestionario de enfermedad inflamatoria intestinal (CEII) y una encuesta de salud fueron completadas por el sujeto durante las visitas del mes 3, mes 6, mes 9, mes 12 y mes 15 y como parte de la visita de interrupción prematura. Los sujetos deben completar las evaluaciones al comienzo de la visita (es decir, antes de cualquier otra evaluación o la infusión), completando en primer lugar la evaluación global del sujeto. La evaluación global del sujeto es una escala analógica visual en la que el sujeto evalúa su impresión global de cómo se siente con respecto a cómo se sentía inmediatamente antes de recibir la primera administración del medicamento del estudio.

Concentración de natalizumab

Se extrajeron muestras de sangre para determinar la concentración de natalizumab durante el mes 3, mes 6, mes 9, mes 12 y mes 15. En las visitas en las que se administraron infusiones, las muestras se tomaron inmediatamente antes (minuto 0) de la infusión. Además, solamente en el mes 6 y el mes 12, se extrajo una segunda muestra al menos 1 hora después de finalizada la infusión.

Métodos estadísticos

Se evaluó la capacidad de natalizumab para mantener la enfermedad ligeramente activa (definida como una puntuación del IAEC de <220 y sin uso de la intervención de rescate) y la remisión (definida como una puntuación del IAEC de <150 y sin uso de la intervención de rescate) en sujetos con enfermedad de Crohn. La comparación primaria de interés fue el tiempo hasta la pérdida de la respuesta entre los grupos de tratamiento (donde la pérdida de la respuesta se define como una puntuación del IAEC de 220 o el uso de intervención de rescate). Se realizó un análisis secuencial contingente sobre el efecto del tratamiento en el momento de la pérdida de la remisión entre grupos de tratamiento (definida como una puntuación del IAEC de 150 o el uso de intervención de rescate) en el subgrupo de sujetos en remisión (IAEC <150) en la semana 12.

Se esperaba que aproximadamente 380 sujetos respondieran al tratamiento y tuvieran una enfermedad ligeramente activa en la semana 10 en el primer estudio (definida como ≥ 70 puntos de disminución en la puntuación del IAEC y una puntuación del IAEC <220 y sin uso de la intervención de rescate), mantenida hasta la semana 12/mes 3. De los cuales se esperaba que 285 se inscribieran en el segundo estudio, suponiendo una tasa de deserción de 25% de los sujetos elegibles entre los dos estudios. De éstos, se esperaba que 200 sujetos hubieran logrado la remisión (definida como una puntuación del IAEC <150).

A un tamaño de muestra de 285 sujetos aleatorizados y dosificados (142 por grupo de tratamiento; relación 1:1) se le adjudicó una potencia de 90% a una significación de 5% para detectar una diferencia entre el grupo de tratados con natalizumab y el grupo tratado con placebo en el mantenimiento de las tasas de respuesta (definidas como una puntuación del IAEC <220 y sin uso de la intervención de rescate), suponiendo una tasa de respuesta de 65% para natalizumab y una tasa de respuesta de 44% para el placebo y permitiendo una tasa de deserción del 10%.

Concordantemente, al subgrupo de 200 sujetos en remisión, aleatorizados y dosificados se le adjudicó una potencia de 90% a una significación de 5% para detectar una diferencia entre el grupo tratado con natalizumab y el grupo del placebo en el mantenimiento de la remisión (definida como una puntuación del IAEC <150 y sin uso de la intervención de rescate), suponiendo una tasa de respuesta de 55% para natalizumab y una tasa de respuesta de 30% para el placebo y permitiendo una tasa de deserción del 10%.

Análisis de eficacia

Todos los análisis y resúmenes de eficacia se basaron en la población con intención de tratar. Se llevó a cabo un análisis confirmatorio del parámetro de eficacia primaria usando la población por protocolo. Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad en los criterios de valoración primarios y secundarios utilizando un subconjunto de la población con intención de tratar, que incluía los que respondieron del primer estudio que fueron aleatorizados para recibir natalizumab en el primer estudio.

Resultados

En el segundo estudio, los sujetos que no tomaban esteroides en el mes 9 (de los que tomaban esteroides al inicio del primer estudio) mostraron los resultados siguientes:

Tabla 5

	Placebo N = 760	Natalizumab	valor p
No tomaban esteroides	19 (25%)	37 (55%)	<0.001
Remisión y no tomaban esteroides	17 (22%)	31 (46%)	0.009

Los efectos secundarios más frecuentes en ambos grupos fueron cefalea, náuseas y dolor abdominal. De los eventos adversos graves (EAG), 8% versus 7% placebo versus natalizumab.

La figura 1 muestra un gráfico de la respuesta al natalizumab cuando se administra a pacientes en un ensayo clínico de la enfermedad de Crohn. De la población que respondió al natalizumab a los 3 meses en el ensayo clínico, 61.3% de los pacientes mantuvo una respuesta después de 9 meses, mientras sólo 28.8% del grupo placebo mantuvo una respuesta.

La figura 2 muestra un gráfico del nivel de remisión en respuesta al natalizumab cuando se administra a pacientes en un ensayo clínico de la enfermedad de Crohn. De la población en remisión con natalizumab a los 3 meses en el ensayo clínico, 43.8% de los pacientes mantuvo una respuesta después de 9 meses, mientras sólo 25.8% del grupo placebo mantuvo una respuesta.

5 La figura 3 muestra un gráfico del nivel de remisión en respuesta al natalizumab cuando se administra a pacientes en un ensayo clínico de la enfermedad de Crohn en diversas poblaciones: la población con intención de tratar (PIT), la población con proteína C reactiva (PCR) elevada, la población insensible o intolerante los inmunosupresores (immuno II) y la población insensible o intolerante a los esteroides, o dependiente de éstos (esteroides IID). Estas categorizaciones se basaron en los antecedentes del paciente respecto al uso previo de estos medicamentos.

10 **Resumen de eficacia**

En las poblaciones de interés, se observaron diferencias clínicamente significativas en las tasas de remisión y respuesta con natalizumab en comparación con placebo en el primer estudio. El segundo estudio (estudio de retirada doble ciego de pacientes que respondieron en el primer estudio) confirma el efecto de inducción observado en el primer estudio. Se observaron datos alentadores de mantenimiento después de 6 meses en el segundo estudio. En el segundo estudio, natalizumab permitió a los sujetos disminuir gradualmente con éxito los esteroides.

15

Tabla 6 ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD DE CROHN (IAEC)

Variable	Factor de ponderación
Número total de heces diarreicas para cada uno de los 7 días previos	× 2
Dolor abdominal para cada uno de los 7 días previos	× 5
Ninguno = 0	
Leve = 1	
Moderado = 2	
Intenso = 3	
Bienestar general para cada uno de los días previos	× 7
Bien = 0	
Por debajo de la par = 1	
Malo = 2	
Muy malo = 3	
Terrible = 4	

Todos los otros índices serán evaluados por el Doctor en la visita ambulatoria de la manera siguiente:

Tabla 7

Signos clínicos durante los 7 días previos	× 20
Artritis o artralgia = 1	
Lesiones cutáneas o en la boca = 1	
Iritis o uveítis = 1	

Lesión anorrectal = 1	
Otras fístulas = 1	
Fiebre superior a 38 °C durante la semana = 1	
Lomotil u otro antidiarreico	× 30
No = 0, sí = 1	
Masa abdominal	×10
Ninguna = 0	
Cuestionable = 2	
Definida = 5	
Anemia definida por hematocrito menor de:	× 6
Para los hombres 47%	
Para las mujeres 42%	
Peso estándar - peso actual × 100	× 1
Peso estándar*	
Índice de actividad de la enfermedad de Crohn (IAEC) total	=
*Obtener de las tablas de peso y altura estándar que se proporcionarán.	

Ejemplo 10

Este experimento fue un estudio doble ciego, controlado con placebo sobre la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de natalizumab para mantener la respuesta clínica y la remisión en la enfermedad de Crohn.

- 5 Natalizumab, un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado contra la integrina $\alpha 4$, se evaluó en un estudio aleatorizado y controlado para determinar la capacidad de un régimen de seis meses para mantener la respuesta clínica o la remisión lograda en sujetos tratados con natalizumab en un estudio de fase III de inducción de respuesta o remisión.

Métodos

- 10 339 sujetos adultos con enfermedad de Crohn (EC) que alcanzaron respuesta (≥ 70 puntos de reducción en el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (IAEC) al inicio) y/o remisión (IAEC < 150) y tuvieron una puntuación de IAEC < 220 después de recibir tres infusiones de natalizumab en un primer estudio se volvieron a aleatorizar en una proporción de 1:1 a natalizumab (300 mg) (n = 168) o placebo (n = 171) por hasta 12 infusiones mensuales adicionales. El criterio de valoración primario fue la proporción de sujetos que no perdieron esa respuesta del primer estudio en cada tiempo de toma de datos durante 6 meses consecutivos adicionales en el segundo estudio. La pérdida de la respuesta se definió como un IAEC ≥ 220 y un aumento de ≥ 70 puntos desde el inicio en IAEC en el segundo estudio o el uso de la intervención de rescate. También se evaluó el mantenimiento de la remisión.

Resultados

- 20 En el mes 6, 61% (103/168) de los sujetos tratados con natalizumab (población ITT) siguió cumpliendo los criterios de respuesta clínica frente a 29% (49/170) de los sujetos que se volvieron a aleatorizar para recibir placebo (p < 0.001). 44% (57/130) del grupo de tratamiento con natalizumab mantuvo la remisión clínica, en comparación con el 26% (31/120) del grupo del placebo (p = 0.003). Además, 55% (37/67) de los sujetos tratados con natalizumab que

estaban tomando esteroides en el primer estudio que se volvieron a aleatorizar para recibir natalizumab en el segundo estudio dejaron de recibir esteroides, en comparación con el 25% (19/76) que se volvió a aleatorizar para recibir placebo ($p < 0.001$). No se observó ninguna diferencia notable en las tasas de eventos adversos graves y no graves entre grupos de tratamiento.

- 5 En el segundo estudio, natalizumab demostró una superioridad significativa respecto al placebo en su capacidad de mantener la respuesta y la remisión en todos los tiempo de toma de datos consecutivos durante un período de 6 meses en los pacientes que respondieron al natalizumab en el primer estudio. La administración mensual de natalizumab durante 6 meses fue bien tolerada y permitió a los sujetos suprimir exitosamente los esteroides.

REIVINDICACIONES

1. El uso de natalizumab o un fragmento inmunológicamente activo de éste para la preparación de un medicamento destinado a la administración a un sujeto humano en una cantidad eficaz para economizar esteroides a fin de reducir o eliminar la necesidad del tratamiento con esteroides en el sujeto humano que sufre una enfermedad elegida del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad injerto contra huésped, enfermedad huésped contra injerto, espondiloartropatías y sus combinaciones, donde el sujeto humano está en tratamiento con esteroides.
2. El uso de la reivindicación 1, donde natalizumab se administra por vía parenteral al sujeto humano que lo necesita.
3. El uso de la reivindicación 1, donde natalizumab se administra crónicamente al sujeto humano que lo necesita.
4. El uso de la reivindicación 2, donde la administración parenteral resulta en una concentración sanguínea eficaz de natalizumab de al menos 1 ng/mL en dicho sujeto humano.
5. El uso de la reivindicación 4, donde la concentración sanguínea eficaz de natalizumab es 1 ng/mL en dicho sujeto humano.
6. El uso de la reivindicación 3, donde la administración crónica de natalizumab es semanal o mensual durante un período de al menos un año.
7. El uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad es enfermedad inflamatoria intestinal y el natalizumab se administra en una cantidad eficaz para permitir al sujeto humano disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides.
8. El uso de la reivindicación 7, donde la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
9. El uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad es esclerosis múltiple y el natalizumab se administra en una cantidad para permitir al sujeto humano disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides.
10. El uso de la reivindicación 8 o 9, donde el natalizumab se administra a dicho sujeto humano en una cantidad de 2 mg/kg a 8 mg/kg.
11. El uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad es artritis reumatoide y el natalizumab se administra en una cantidad suficiente para permitir al sujeto humano disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides.
12. El uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad es enfermedad injerto contra huésped o enfermedad huésped contra injerto, y el natalizumab se administra en una cantidad para permitir al sujeto humano disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides.
13. El uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad es asma y el natalizumab se administra en una cantidad para permitir al sujeto humano disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides.
14. El uso de la reivindicación 1, donde la enfermedad es una espondiloartropatía y el natalizumab se administra en una cantidad para permitir al sujeto humano disminuir gradualmente el tratamiento con esteroides.
15. El uso de la reivindicación 14, donde la espondiloartropatía se elige del grupo que consiste en espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis de enfermedad inflamatoria intestinal, espondiloartropatía indiferenciada y espondiloartropatía juvenil.
16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 7, 10, 11, 12, 13 o 14, donde el sujeto humano es resistente o intolerante a los esteroides, o dependiente de los mismos.
17. El uso de la reivindicación 16, donde sujeto humano requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de esteroides que es menor que la que requeriría en ausencia de la administración de natalizumab.
18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 7, 10, 11, 12, 13 o 14, donde el sujeto humano es: a) un paciente que es insensible o intolerante al tratamiento con inmunosupresores; b) un paciente que es insensible o intolerante al tratamiento con esteroides o dependiente de éste; o c) un paciente que es una combinación de a) y b).
19. El uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de una enfermedad inflamatoria intestinal destinada a ser administrada a fin de reducir y/o eliminar la necesidad de tratamiento con esteroides en el sujeto humano.

- 5 20. El uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de esclerosis múltiple destinada a ser administrada a fin de reducir y/o eliminar la necesidad de tratamiento con esteroides en el sujeto humano.
- 10 21. El uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de artritis reumatoide destinada a ser administrada a fin de reducir y/o eliminar la necesidad de tratamiento con esteroides en el sujeto humano.
- 15 22. El uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de la enfermedad injerto contra huésped o enfermedad huésped contra injerto destinada a ser administrada a fin de reducir y/o eliminar la necesidad de tratamiento con esteroides en el sujeto humano.
- 20 23. El uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de asma destinada a ser administrada a fin de reducir y/o eliminar la necesidad de tratamiento con esteroides en el sujeto humano.
- 25 24. El uso de una cantidad eficaz para economizar esteroides de natalizumab o de un fragmento inmunológicamente activo de éste y un segundo agente elegido del grupo que consiste en: (i) un inmunosupresor, donde el inmunosupresor no es un esteroide; (ii) una composición anti-TNF; (iii) una composición 5-ASA; y (iv) sus combinaciones para preparar una combinación de medicamentos para la terapia de combinación de una espondiloartropatía destinada a ser administrada a fin de reducir y/o eliminar la necesidad de tratamiento con esteroides en el sujeto humano.
- 30 25. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde la terapia de combinación comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente economizador de esteroides.
26. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde el inmunosupresor se elige del grupo que consiste en azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato y micofenolato.
27. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde la composición anti-TNF es infliximab.
- 35 28. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 19-24, donde la composición 5-ASA se elige del grupo que consiste en sulfasalazina, mesalazina y olsalazina.

Mantenimiento de la respuesta
Población que responde al natalizumab

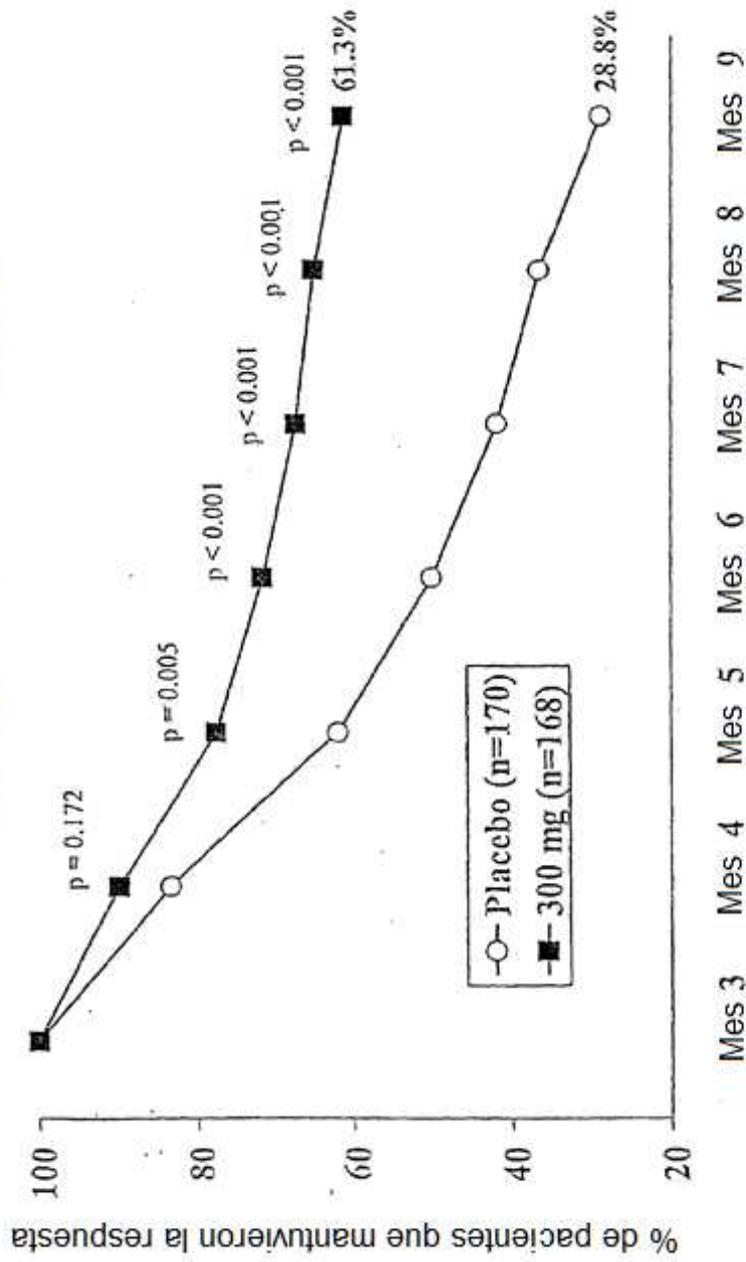


Fig.1

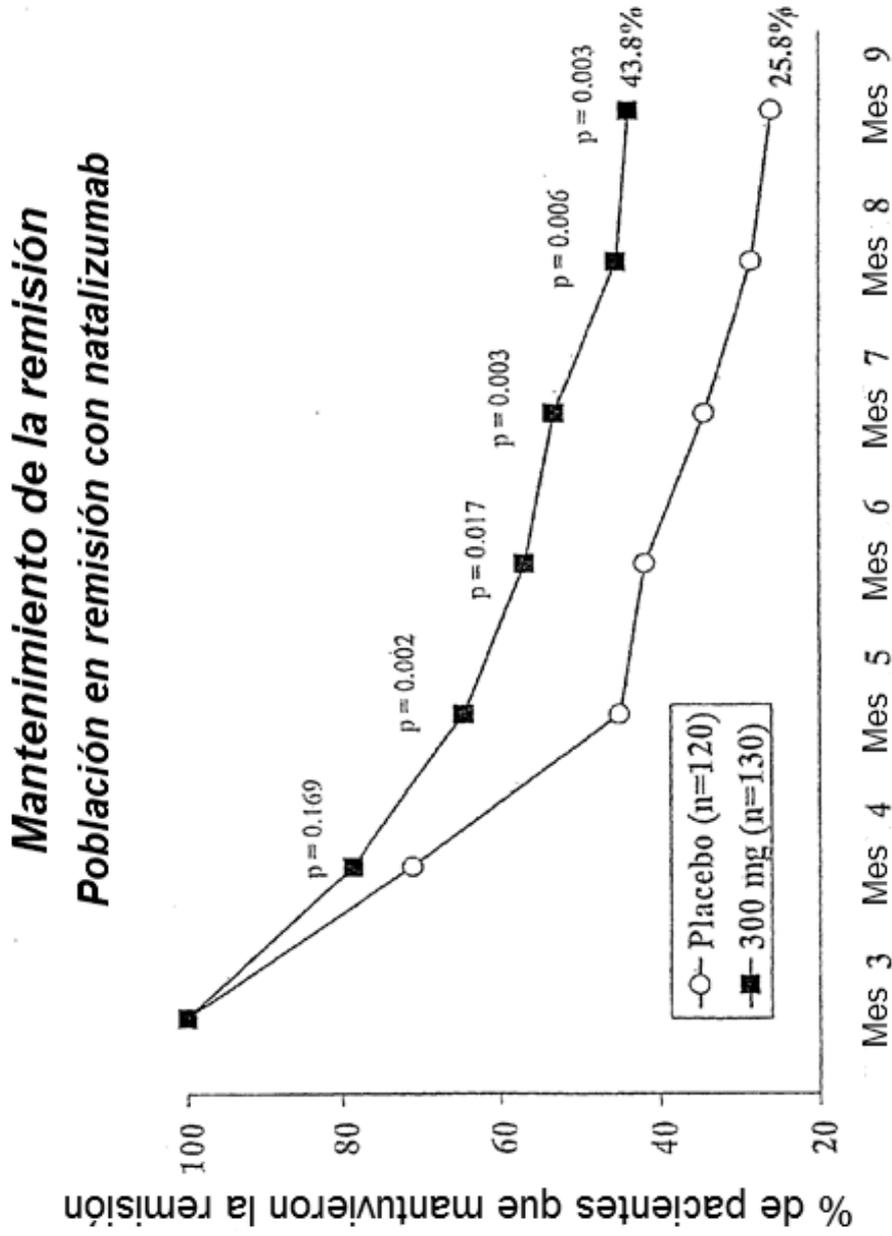


Fig. 2

Resultados mes 9

Mantenimiento de la remisión para diferentes subgrupos

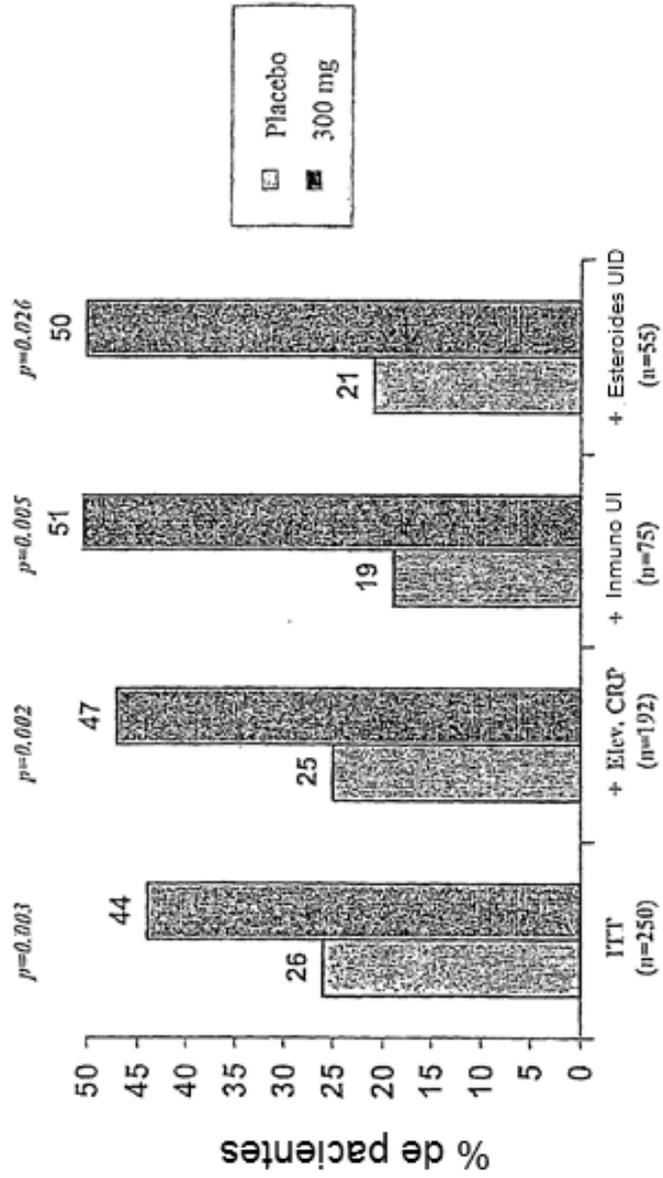


Fig.3