

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 768**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2000 E 04018151 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 1488806**

54 Título: **Un anticuerpo monoclonal bloqueante frente a VLA-1 y su uso para el tratamiento de trastornos inflamatorios**

30 Prioridad:

01.06.1999 US 137038 P

29.02.2000 US 185336 P

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

28.01.2016

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)

250 Binney Street

Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

DE FOUGEROLLES, ANTONIN R. y

KOTELIANSKI, VICTOR E.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 557 768 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

Un anticuerpo monoclonal bloqueante frente a VLA-1 y su uso para el tratamiento de trastornos inflamatorios

Antecedentes de la invención

5 Las integrinas son complejos de proteínas de la superficie celular que forman una gran clase de moléculas de la superficie celular que median en la adhesión de las células entre si y con su entorno.

Las células necesitan adherirse entre sí y a otras moléculas en su entorno en muchos procesos fisiológicos y del desarrollo. Los ejemplos incluyen la creación de tejidos y órganos, y el mantenimiento de su integridad. Entre estos procesos fisiológicos se incluyen los trastornos inflamatorios.

10 Una de las etapas clave durante el proceso inflamatorio implica la extravasación de células hacia fuera de los vasos sanguíneos, hacia el interior de los tejidos, y hacia el sitio de la infección. El papel de las moléculas de adhesión en este proceso a menudo se descompone en un modelo de tres etapas que implica un "reclutamiento" de leucocitos inicial en el endotelio inflamado, seguido de una unión firme, que resulta en la migración transendotelial de los leucocitos hacia los tejidos inflamados (Hynes, R. O., 1992, *Cell*, 69:11-25; Springer, T. A., 1992, *Cell*, 76:301-314).
 15 Otra etapa crítica en la cascada inflamatoria que no ha sido explorada a fondo se produce dentro de los tejidos periféricos, en donde las células infiltrantes, así como las residentes, necesitan migrar hacia el sitio de la infección, reconocer al antígeno extraño y sufrir la activación celular para realizar sus funciones efectoras. Para evaluar directamente la importancia en la inflamación de las interacciones adhesivas intersticiales, aparte del papel que desempeñan las interacciones adhesivas en el reclutamiento de leucocitos, los inventores se han centrado en la importancia de las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas y sus fragmentos, y su papel en modelos
 20 animales de inflamación, en particular la artritis.

Previamente, se ha descrito un mAb de ratón 1B3.1 contra un epitopo de VLA-1 en el documento US 5.788.966 A.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así, se refiere a los siguientes artículos 1 a 13.

- 25 1. Un anticuerpo bloqueante de una función, o un fragmento de dicho anticuerpo, capaz de inhibir la adhesión dependiente de K562- α 1 al colágeno IV y capaz de unirse a un dominio α 1-I de VLA-1, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio en una enfermedad vascular en un sujeto.
2. El anticuerpo bloqueante de una función o el fragmento de anticuerpo del artículo 1, en el que la enfermedad vascular es la aterosclerosis.
- 30 3. El anticuerpo bloqueante de una función o el fragmento de anticuerpo de los artículos 1 o 2, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es monoclonal, policlonal, humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo bloqueante de una función o el fragmento de anticuerpo de los artículos 1 a 3, en el que el sujeto es un ser humano.
5. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de uno cualquiera de los artículos 1 a 4, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un epitopo que comprende los restos aminoácidos Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NO:8).
- 35 6. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 5, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un epitopo que consiste en los restos aminoácidos Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NO:8).
- 40 7. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 6, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es monoclonal.
8. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 7, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo está humanizado.
9. El fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 8, en el que el fragmento de anticuerpo es un
 45 fragmento Fab, F(ab')₂ o F(v).
10. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 9, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es para la administración parenteral.
11. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 10,
 50 en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es para la administración por vía oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, nasal o

tópica.

12. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo de uno cualquiera de los artículos 1 a 11, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es para la administración al sujeto:

- 5 a) a intervalos de cada día a 14 días en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 50 mg/kg/día, de 0,1 mg/kg/día a 20 mg/kg/día, o de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día;
- b) de 0,3 mg/kg/día a 1 mg/kg/día cuando se administra IP; o
- c) de 5 mg/kg/día a 12,5 mg/kg/día cuando se administra IV.

10 13. Un anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es capaz de unirse a un dominio R Δ H, y dicho dominio R Δ H presenta la secuencia de aminoácidos de un dominio α 1-I de rata, en el que los restos de rata G91, R92, Q93 y L96 se reemplazan por los restos V, Q, R, y R, respectivamente, y es capaz de unirse al dominio α 1-I humano pero no al dominio α 1-I de rata, en el que el dominio α 1-I humano presenta la secuencia de aminoácidos Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NO:8) en los restos 91-96, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o una enfermedad vascular en un sujeto.

15 14. El anticuerpo bloqueante de una función o un fragmento de anticuerpo del artículo 13, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un epitopo dependiente de cationes de VLA-1.

Además, se describe un método para el tratamiento de trastornos inflamatorios en un sujeto. De modo específico, se describe un método para el tratamiento de la artritis.

20 Más en concreto, se describe un método para el tratamiento de un trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo bloqueante de la función α 1 β 1, o un fragmento del anticuerpo, en el que el anticuerpo bloqueante de la función α 1 β 1, o el fragmento, es capaz de unirse a un epitopo de VLA-1 que comprende los restos aminoácidos 91-96, Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg.

25 El anticuerpo anti-integrina puede seleccionarse del grupo que comprende un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y cualquiera de sus fragmentos. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

También se describe un método para tratar trastornos inflamatorios en un sujeto que es un sujeto humano o animal.

Descripción de los dibujos

30 Figura 1. *Integrinas de unión al colágeno α 1 β 1 y α 2 β 1 sobre leucocitos activados.* (A) Análisis citométrico de flujo de la expresión de las integrinas α 1 y α 2 β 1 sobre esplenocitos activados por IL-2 (día 11). Las células se marcaron con mAb anti- α 1, mAb anti- α 2 o mAb control de no unión (líneas grises), y seguido de una inmunoglobulina anti-hámster-FITC. (B) Efecto de los mAb anti- α 1 y anti- α 2 sobre la adhesión de leucocitos al colágeno. Se trataron 10⁵ esplenocitos activados con IL-2 con los mAb indicados durante 15 min antes de cultivar en placa en pocillos revestidos con colágeno de tipo IV o de tipo I durante 1 h a 37 °C. La adhesión se calculó según se ilustra en el ejemplo 1, y se expresa como porcentaje de adhesión con relación a las células tratadas con el mAb control. Los ensayos de adhesión se realizaron por triplicado, y se realizaron al menos tres experimentos independientes. Se muestra un experimento representativo.

40 Figura 2. *Efecto de los mAb anti-integrina sobre la fase efectora de la hipersensibilidad de tipo retrasado.* Ratones sensibilizados con SRBC fueron inyectados i.p. con los mAb indicados 1 h antes de la exposición a SRBC. Se midió el espesor de la almohadilla de la pata 20 h después de la exposición al antígeno, y los resultados se muestran como porcentaje de aumento en el espesor de la almohadilla de pata $\pm$ MEE, según se ilustra en el ejemplo 2. Estos datos representan un resumen de ocho experimentos con n = 79 (PBS), 68 (Ig de hámster control), 68 (anti- α 1), 29 (anti- α 2), 18 (anti- α 1 + anti- α 2), 45 (anti- α 4), 18 (anti- α 5), 20 (anti- α 6), y 10 (anti- β 1). Los mAb utilizados fueron: Ha4/8 (Ig del grupo 2 de hámster control), Ha31/8 (anti- α 1), Ha1/29 (anti- α 2), PS/2 (anti- α 4), 5H10-27 (anti- α 5), GoH3 (anti- α 6), y HM β 1-1 (anti- β 1).

45 Figura 3. *Efecto de los mAb anti-integrina sobre la fase efectora de la hipersensibilidad por contacto.* Ratones sensibilizados con FITC fueron inyectados i.p. con los mAb indicados 4 h antes de la exposición a FITC. Se midió el espesor de la oreja en la línea de base y 24 h después, y los resultados se muestran como porcentaje de aumento en el espesor de la oreja $\pm$ MEE, según se ilustra en el ejemplo 3. Estos datos representan un resumen de nueve experimentos con n = 74 (PBS), 60 (Ig de hámster control), 26 (anti-ICAM-1), 44 (anti- α 1), 44 (anti- α 2), 38 (anti- α 1 + anti- α 2), 36 (anti- α 4), 16 (anti- α 5), 26 (anti- α 4 + anti- α 5), 24 (anti- α 6), y 22 (anti- β 1). Los mAb de hámster utilizados fueron: Ha4/8 (Ig del grupo 2 de hámster control), Ha31/8 (anti- α 1), Ha1/29 (anti- α 2), HM β 1-1 (anti- β 1), 3E2 (anti-ICAM-1); los mAb de rata utilizados fueron: R35-95 y R35-38 (IgG2a de rata e IgG2b de rata control, respectivamente), PS/2 (anti- α 4), 5H10-27 (anti- α 5), GoH3 (anti- α 6).

Figura 4. *Respuestas de hipersensibilidad por contacto en ratones deficientes en $\alpha 1$ comparado con ratones de tipo salvaje.* Ratones sensibilizados con FITC fueron inyectados i.p. con los mAb indicados 4 h antes de la exposición a FITC. Se midió el espesor de la oreja en la línea de base y 24 h después, y los resultados se muestran como porcentaje de aumento en el espesor de la oreja $\pm$ MEE, según se ilustra en el ejemplo 4. Se emplearon grupos de cuatro a cinco ratones por condición, y todos los experimentos se realizaron un mínimo de tres veces. Se muestra un experimento representativo.

Figura 5. *Efecto de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ sobre la inflamación no específica inducida por aceite de croton.* Se inyectaron ratones i.p. con los mAb indicados 4 h antes de pintar la oreja con aceite de croton. Se midió el espesor de la oreja en la línea de base y 24 h después, y los resultados se muestran como porcentaje de aumento en el espesor de la oreja $\pm$ MEE, según se ilustra en el ejemplo 5. Se emplearon grupos de cuatro a cinco ratones por condición, y todos los experimentos se realizaron un mínimo de tres veces. Se muestra un experimento representativo.

Figura 6. *Efecto de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ sobre la artritis inducida por mAb de colágeno.* Se inyectaron ratones i.p. con los mAb anti-colágeno en el día 0, seguido por LPS en el día 3. Se inyectaron ratones i.p. con los mAb indicados cada 3^{er} día, comenzando en día 0. La artritis clínica resultó evidente 2-3 días después de la inyección de LPS y continuó durante varias semanas. Cada extremidad fue evaluada en una escala de 0 a 4 cada 3^{er} día, según se ilustra en el ejemplo 6, y los resultados se expresan como la puntuación artrítica media entre el día 9 y el día 15 ($\pm$ MEE) de las cuatro extremidades. Estos datos representan un resumen de cuatro experimentos, consistiendo cada experimento en grupos de tres a cuatro ratones por condición.

Figura 7. *La administración de mAb anti- $\alpha 1$ o anti- $\alpha 2$ inhibe la infiltración de leucocitos hacia las almohadillas de la pata durante una respuesta DTH.* El experimento se realizó como se describe en la figura 2. Las almohadillas de la pata fueron extirpadas 20 h después de la exposición al antígeno y las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones de tejido de almohadillas proceden de ratones sin exponer (A) o de ratones sensibilizados con SRBC expuestos a SRBC (B-H). Los ratones se trataron 1 h antes de la exposición con PBS (B), Ig de hámster control (C, G), anti- $\alpha 1$ (D), anti- $\alpha 2$ (E), o una combinación de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ (F, H). Aumento: x 100 (A-F), x 400 (G-H).

Figura 8. *$\alpha 1\beta 1$ se expresa sobre leucocitos infiltrantes en almohadillas de la pata durante una respuesta DTH.* Tinción inmunohistoquímica de los leucocitos infiltrantes procedentes de una almohadilla inflamada no tratada 20 h después de la exposición al antígeno. (A) Secciones en serie teñidas directamente con mAb control conjugado con Alexa488 y mAb anti- $\alpha 1$. (B) Tinción inmunofluorescente dual con mAb anti- $\alpha 1$ conjugado con Alexa488 y mAb específicos de linaje celular conjugados con ficoeritrina (PE). Los mAb conjugados con PE utilizados eran específicos para granulocitos/monocitos (anti-CD11b), neutrófilos (anti-Lys6G/Gr-1) y linfocitos T (anti-CD3). Aumento: x 400.

Figura 9. *Efecto de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ sobre la artritis inducida por mAb de colágeno.* (A) Un tratamiento preventivo de ratones con mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ disminuye la puntuación artrítica. Se trataron ratones con mAb anti-colágeno en el día 0, seguido de LPS en el día 3. La artritis resultó evidente en el día 6 y continuó durante varias semanas. Los ratones fueron tratados con los mAb indicados cada 3^{er} día, comenzando en el día 0. Cada extremidad fue evaluada en una escala de 0 a 4 cada 3^{er} día. Los resultados se expresan como la puntuación artrítica media entre el día 9 y el día 15 ($\pm$ MEE) de las cuatro extremidades (puntuación máxima de 16). Se emplearon grupos de 4 ratones por condición; se muestra la media de 12 experimentos. (B) Los ratones deficientes en $\alpha 1$ tienen una puntuación artrítica reducida comparable a ratones de tipo salvaje tratados con mAb anti- $\alpha 1$. Los detalles experimentales y la puntuación son como se indicó anteriormente. Se emplearon grupos de 4 ratones por condición; se muestra la media de 2 experimentos.

Figura 10. *Efecto del tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ sobre la inmunopatología de articulaciones artríticas.* Un tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ reduce la infiltración leucocítica, la adherencia de las células a las superficies de las articulaciones y la destrucción del cartílago, según se pone en evidencia por la pérdida de proteoglicanos. Extremidades traseras de ratones normales (A-D) o ratones artríticos (día 8) que reciben Ig de hámster control (E-H) o el tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ (I-L). Las extremidades se fotografiaron (A, E, I), se extirparon y las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina/eosina (B-C, F-G, J-K) o con azul de toluidina para detectar los proteoglicanos (D, H, L). Aumento: x 16 (B, F, J); x 160 (C, G, K); x 200 (D, H, L).

Figura 11. *El desarrollo de la artritis se retrasa en ausencia de linfocitos, y la inhibición de la artritis por mAb anti- $\alpha 1$ aparece en ausencia de linfocitos.* Ratones de tipo salvaje B6.129 o B6.129 deficientes en RAG-1 fueron tratados con mAb anti-colágeno en el día 0, seguido de LPS en el día 3. La artritis resultó evidente en el día 6 y continuó durante varias semanas. Los ratones fueron tratados con los mAb indicados cada 3^{er} día, comenzando en el día 0. Cada extremidad fue evaluada en una escala de 0 a 4 cada 3^{er} día. Los resultados se expresan como la puntuación artrítica media por extremidad (puntuación máxima de 4). Se emplearon grupos de 4 ratones por condición.

Figura 12. *Dosis-respuesta de la inhibición de la artritis por mAb anti- $\alpha 1$.* Ratones Balb/c de tipo salvaje fueron tratados con mAb anti-colágeno en el día 0, seguido de LPS en el día 3. La artritis resultó evidente en el día 6 y

continuó durante varias semanas. Los ratones fueron tratados i.p. con la dosis indicada de mAb Ha4/8 (control de isotipo) o Ha31/8 (anti- $\alpha 1$) cada 3^{er} día, comenzando en el día 0. Cada extremidad fue evaluada en una escala de 0 a 4 cada 3^{er} día. Los resultados se expresan como la puntuación artrítica media por extremidad (puntuación máxima de 4). Se emplearon grupos de 4 ratones por condición.

5 Figura 13. *Un tratamiento terapéutico con mAb anti- $\alpha 1$ puede disminuir la puntuación artrítica.* Ratones Balb/c de tipo salvaje fueron tratados con mAb anti-colágeno en el día 0, seguido de LPS en el día 3. La artritis resultó evidente en el día 6 y continuó durante varias semanas. Los ratones fueron tratados i.p. con mAb (250 ug) o proteína de fusión de Ig (200 ug) cada 3^{er} día, comenzando en el día 4. Los ratones recibieron mAb (Ha4/8 de control de isotipo o Ha31/8 anti- $\alpha 1$), proteína de fusión de Ig (Ig de control de isotipo o TNF-R55-Ig), o una combinación de
10 ambos (250 ug Ha31/8 y 200 ug de TNF-R55-Ig). Cada extremidad fue evaluada en una escala de 0 a 4 cada 3^{er} día. Los resultados se expresan como la puntuación artrítica media por extremidad (puntuación máxima de 4). Se emplearon grupos de 4 ratones por condición.

Figura 14. *Localización del epitopo para los mAb bloqueantes anti-dominio $\alpha 1$ -I.* (A) Secuencia de aminoácidos del dominio $\alpha 1$ -I de rata (arriba) y humano (abajo). Los restos que comprenden el motivo MIDAS (sitio de adhesión dependiente de iones metálicos) se muestran en negrita. Los aminoácidos humanos que reemplazan los correspondientes restos de rata (R Δ H) se muestran por debajo de la secuencia de rata en la región recuadrada. Para que sea más claro, la numeración de los restos en el texto se refiere a esta figura. (B) Se unieron concentraciones crecientes de mAb AJH10 a placas revestidas con 30 μ g/ml del dominio $\alpha 1$ -I humano (círculos), de rata (triángulos) o R Δ H (cuadrados). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos.

20 Figura 15. *Secuencia de aminoácidos del dominio $\alpha 1$ -I humano.*

Figura 16. *Identificación de un mAb bloqueante contra el dominio $\alpha 1$ -I.* (A) Se unieron concentraciones crecientes de mAb AEF3 (triángulos) o AJH10 (círculos) a placas revestidas con 30 μ g/ml del dominio $\alpha 1$ -I. (B) El dominio $\alpha 1$ -I se trató con concentraciones crecientes de mAb AJH10 (rombos) o mAb BGC5 (cuadrados) y se unieron a placas revestidas con colágeno IV (2 μ g/ml). (C) Células K562- $\alpha 1$ fueron tratadas con concentraciones crecientes de mAb AEF3 (triángulos) o AJH10 (círculos) y se unieron a placas revestidas con colágeno IV (5 μ g/ml). Se añadieron 45-50% de células a cada posillo adherido a colágeno IV. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 17. *Reactividad cruzada entre especies de los mAb bloqueantes.* (A) Lisados con detergente de (1) músculo liso vascular de oveja; (2) células K562- $\alpha 1$ de leucemia humana; (3) dominio R Δ H GST-1 purificado; (4) dominio GST- $\alpha 1$ I de rata; y (5) dominio GST- $\alpha 1$ I humano, que fueron separados mediante SDS-PAGE al 10-20% en condiciones no reductoras, y se inmunotransfirieron con el mAb bloqueante de la función AJH10. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda; la integrina $\alpha 1\beta 1$ no reducida migra a aproximadamente 180 kDa; el dominio GST-I migra a aproximadamente 45 kDa. (B) Células de músculo liso vascular de conejo fueron incubadas con mAb AJH10 (abajo) o control de IgG murina (arriba), y se analizaron con un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

Figura 18. *El dominio $\alpha 1$ -I se une al colágeno.* (A) Concentraciones crecientes del dominio $\alpha 1$ -I humano fueron unidas a placas previamente revestidas con 1 μ g/ml de colágeno I (cuadrados) o colágeno IV (círculos). Los valores mostrados han sido corregidos para la unión de fondo a BSA. (B) Se mezclaron 2 μ g/ml del dominio $\alpha 1$ -I humano con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-integrina $\alpha 1$ humana 5E8D9 (cuadrados) o el anticuerpo anti-integrina $\alpha 2$ humana A2IIE10 (círculos), y después se unieron a placas previamente revestidas con 1 μ g/ml de colágeno IV. (C) Se revistieron placas con 1 μ g/ml de colágeno IV o BSA al 3%. El dominio $\alpha 1$ -I (2 μ g/ml) posteriormente se unió a las placas revestidas en presencia de Mn^{2+} 1 mM, Mg^{2+} 1 mM, o EDTA 5 mM. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Descripción detallada de la invención

45 Un descubrimiento de la presente invención es que un anticuerpo contra una integrina, y sus fragmentos, en particular, una subunidad $\alpha 1$ de integrina, puede bloquear la interacción de los leucocitos proinflamatorios con los componentes de la matriz extracelular que incluyen, pero no se limitan a colágenos, laminina y fibronectina. Aunque no se pretende limitar la invención a ningún mecanismo de acción concreto, se propone que la alteración de la interacción entre la integrina, y sus fragmentos, y la matriz circundante puede disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias. También se propone que los anticuerpos contra integrinas, y sus fragmentos, puedan estar modulando las fases efectoras de las respuestas inflamatorias actuando al nivel de la célula T específica de antígeno. Además, se propone que los anticuerpos contra integrinas, y sus fragmentos, puedan actuar alterando la migración celular dentro de los tejidos y/o los efectos sobre el cebado y la activación celular dentro de los tejidos.

Este descubrimiento ilustra la importancia de las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas, en particular $\alpha 1\beta 1$, en el entorno del tejido periférico durante trastornos relacionados con la inflamación. También extiende el papel de la familia de las integrinas, y sus fragmentos, en la inflamación más allá de la unión de leucocitos y la extravasación en la interfase endotelial, destacando la importancia del entorno del tejido periférico, rico en matriz,

frente a las respuestas inmunológicas, y revela que los tejidos periféricos son un nuevo punto de intervención para terapias basadas en la adhesión.

Los métodos descritos en la presente contemplan el uso de anticuerpos contra integrinas, en las que las integrinas contempladas incluyen moléculas que comprenden una cadena β , que incluye, pero no se limita a $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$, unida de forma no covalente a una cadena α , que incluye pero no se limita a $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, αV , αL , αM , αX , αD , αE , αIIb . Los ejemplos de las diversas integrinas contempladas para su uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a:

$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 10$

$\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha L\beta 1$, $\alpha M\beta 1$, $\alpha X\beta 1$, $\alpha D\beta 1$, $\alpha IIb\beta 1$, $\alpha E\beta 1$;

$\alpha 1\beta 2$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 5\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 7\beta 2$, $\alpha 8\beta 2$, $\alpha 9\beta 2$, $\alpha 10$

$\beta 2$, $\alpha V\beta 2$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha D\beta 2$, $\alpha IIb\beta 2$, $\alpha E\beta 2$,

$\alpha 1\beta 3$, $\alpha 2\beta 3$, $\alpha 3\beta 3$, $\alpha 4\beta 3$, $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 6\beta 3$, $\alpha 7\beta 3$, $\alpha 8\beta 3$, $\alpha 9\beta 3$, $\alpha 10$

$\beta 3$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha L\beta 3$, $\alpha M\beta 3$, $\alpha X\beta 3$, $\alpha D\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha E\beta 3$;

$\alpha 1\beta 4$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 5\beta 4$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 4$, $\alpha 8\beta 4$, $\alpha 9\beta 4$, $\alpha 10$

$\beta 4$, $\alpha V\beta 4$, $\alpha L\beta 4$, $\alpha M\beta 4$, $\alpha X\beta 4$, $\alpha D\beta 4$, $\alpha IIb\beta 4$, $\alpha E\beta 4$;

$\alpha 1\beta 5$, $\alpha 2\beta 5$, $\alpha 3\beta 5$, $\alpha 4\beta 5$, $\alpha 5\beta 5$, $\alpha 6\beta 5$, $\alpha 7\beta 5$, $\alpha 8\beta 5$, $\alpha 9\beta 5$, $\alpha 10$

$\beta 5$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha L\beta 5$, $\alpha M\beta 5$, $\alpha X\beta 5$, $\alpha D\beta 5$, $\alpha IIb\beta 5$, $\alpha E\beta 5$;

$\alpha 1\beta 6$, $\alpha 2\beta 6$, $\alpha 3\beta 6$, $\alpha 4\beta 6$, $\alpha 5\beta 6$, $\alpha 6\beta 6$, $\alpha 7\beta 6$, $\alpha 8\beta 6$, $\alpha 9\beta 6$, $\alpha 10$

$\beta 6$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha L\beta 6$, $\alpha M\beta 6$, $\alpha X\beta 6$, $\alpha D\beta 6$, $\alpha IIb\beta 6$, $\alpha E\beta 6$;

$\alpha 1\beta 7$, $\alpha 2\beta 7$, $\alpha 3\beta 7$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 5\beta 7$, $\alpha 6\beta 7$, $\alpha 7\beta 7$, $\alpha 8\beta 7$, $\alpha 9\beta 7$, $\alpha 10$

$\beta 7$, $\alpha V\beta 7$, $\alpha L\beta 7$, $\alpha M\beta 7$, $\alpha X\beta 7$, $\alpha D\beta 7$, $\alpha IIb\beta 7$, $\alpha E\beta 7$;

$\alpha 1\beta 8$, $\alpha 2\beta 8$, $\alpha 3\beta 8$, $\alpha 4\beta 8$, $\alpha 5\beta 8$, $\alpha 6\beta 8$, $\alpha 7\beta 8$, $\alpha 8\beta 8$, $\alpha 9\beta 8$, $\alpha 10$

$\beta 8$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha L\beta 8$, $\alpha M\beta 8$, $\alpha X\beta 8$, $\alpha D\beta 8$, $\alpha IIb\beta 8$, $\alpha E\beta 8$;

Los métodos descritos en la presente también contemplan el uso de anticuerpos contra fragmentos de integrinas, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos solo contra una cadena β , que incluye, pero no se limita a $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$, así como solo contra una cadena α , que incluye pero no se limita a $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, αV , αL , αM , αX , αD , αE , αIIb . Además, los métodos descritos en la presente también contemplan el uso de anticuerpos contra fragmentos de integrinas, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra el dominio I de la cadena α , que incluye, pero no se limita al dominio I de $\alpha 1\beta 1$ (Briesewitz *et al.*, 1993, J. Biol. Chem., 268:2989); $\alpha 2\beta 1$ (Takada y Hemler, 1989, J. Cell Biol., 109:397), $\alpha L\beta 2$ (Larson *et al.*, 1989, J. Cell Biol., 108:703), $\alpha M\beta 2$ (Corbi *et al.*, 1988, J. Biol. Chem., 263:12403), $\alpha X\beta 2$ (Corbi *et al.*, 1987, EMBO J., 6:4023), $\alpha D\beta 2$ (Grayson *et al.*, 1988, J. Exp. Med., 188:2187), $\alpha E\beta 7$ (Shaw *et al.*, 1994, J. Biol. Chem., 269:6016). En una realización preferida, el determinante antigénico del dominio $\alpha 1$ -I comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 6 aminoácidos contiguos, en la que la secuencia contigua se encuentra dentro de la secuencia de la figura 15. Además, en una realización preferida, la secuencia contigua es Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg.

Los métodos para producir integrinas para su uso en la presente descripción son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Springer *et al.*, 1990, *Nature*, 346:425-434).

Las realizaciones de la presente invención incluyen también anticuerpos policlonales y monoclonales anti-integrina. Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 1$.

Un anticuerpo bloqueante de la función $\alpha 1\beta 1$, tal como se emplea en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une al dominio $\alpha 1$ -I, específicamente a los restos 91-96 de la figura 15, y bloquea la función $\alpha 1\beta 1$, según se ensaya, por ejemplo, por su capacidad para inhibir la adhesión dependiente de K562- $\alpha 1a$ colágeno IV (véase el ejemplo 15).

Los anticuerpos y homólogos preferidos para el tratamiento, en particular para el tratamiento humano, incluyen homólogos de anticuerpos humanos, homólogos de anticuerpos humanizados, homólogos de anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), y monómeros o dímeros de las cadenas pesada o ligera de anticuerpos, o sus mezclas. Así, los anticuerpos monoclonales contra una molécula de integrina, y sus

fragmentos, son el agente de unión preferido en el método de la invención.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “homólogo de anticuerpo” incluye anticuerpos intactos que consisten en cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina unidas a través de enlaces disulfuro. La expresión “homólogo de anticuerpo” también pretende incluir una proteína que comprende uno o más polipéptidos seleccionados de cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, y sus fragmentos de unión al antígeno, que son capaces de unirse a uno o más antígenos (es decir, subunidades de integrina que contienen dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$ o alfa-I). Los componentes polipeptídicos de un homólogo de anticuerpo compuesto por más de un polipéptido pueden estar opcionalmente unidos a través de enlaces disulfuro o entrecruzados covalentemente de otra forma.

Por consiguiente, los “homólogos de anticuerpos” incluyen inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como sus subtipos), en las que las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda.

Los “homólogos de anticuerpos” también incluyen porciones de anticuerpos intactos que conservan su especificidad de unión al antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos F(v), monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera, y similares. Así, los fragmentos de unión al antígeno, así como los polipéptidos dímicos o triméricos de longitud completa derivados de los anticuerpos descritos anteriormente, también son útiles en sí mismos.

Tal como se emplea en la presente, un “homólogo de anticuerpo humanizado” es un homólogo de anticuerpo, producido mediante la tecnología del ADN recombinante, en el que algunos o todos los aminoácidos de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no son necesarios para la unión al antígeno han sido sustituidos por los correspondientes aminoácidos procedentes de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de mamífero no humano.

Tal como se emplea en la presente, un “homólogo de anticuerpo quimérico” es un homólogo de anticuerpo, producido mediante la tecnología del ADN recombinante, en el que todas o partes de las regiones bisagra y constantes de una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina, o ambas, han sido sustituidas por las correspondientes regiones de otra cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina. En otro aspecto, la invención incluye un variante de una molécula quimérica, que incluye: (1) un resto dirigido a integrinas; (2) opcionalmente, un segundo péptido, por ejemplo, un péptido que aumente la solubilidad o la semivida *in vivo* del resto dirigido a integrinas, por ejemplo, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, o uno de sus fragmentos o porciones, por ejemplo, un fragmento o una porción de IgG, por ejemplo, la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana, por ejemplo, las regiones bisagra CH2 y CH3; y un resto de toxina. La molécula quimérica puede utilizarse para tratar un sujeto, por ejemplo, un ser humano, que esté en riesgo de padecer un trastorno relacionado con la proliferación de células epiteliales, tales como folículos capilares y similares.

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

Tal como se emplea en la presente, un “trastorno inflamatorio” incluye, pero no se limita a trastornos, tales como trastornos relacionados con la piel, como psoriasis, eccema, quemaduras y dermatitis. Otros trastornos inflamatorios contemplados para el tratamiento según los métodos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan al tratamiento del asma, bronquitis, calambres menstruales, tendinitis, bursitis, y el tratamiento del dolor y las cefaleas, o como antipirético para el tratamiento de la fiebre. Los métodos descritos en la presente también serían útiles para tratar trastornos gastrointestinales, tales como la enfermedad del intestino inflamatoria, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome del intestino irritable y colitis ulcerosa, y para la prevención del cáncer colorrectal. Los métodos descritos en la presente serían útiles para tratar trastornos inflamatorios en enfermedades tales como enfermedades vasculares, cefaleas migrañosas, periartitis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, fiebre reumática, diabetes de tipo I, miastenia grave, esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome nefrótico, síndrome de Behcet, polimiositis, gingivitis, hipersensibilidad, conjuntivitis, hinchamiento después de lesiones, isquemia miocárdica y similares. Los métodos descritos en la presente también son útiles para el tratamiento de la rinitis alérgica, síndrome de insuficiencia respiratoria, síndrome de choque por endotoxinas y aterosclerosis.

En una realización preferida, los métodos descritos en la presente son útiles para el tratamiento de la artritis que incluye, por ejemplo, la artritis reumatoide y la osteoartritis.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para lograr resultados clínicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. En términos de tratamiento de un trastorno inflamatorio, una “cantidad eficaz” de un anticuerpo anti-integrina es una cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, frenar o retrasar el avance de un trastorno relacionado con la inflamación según los estándares clínicamente aceptables para los trastornos que se van a tratar o para objetivos cosméticos. La detección y la medición de indicadores de la eficacia puede realizarse mediante una serie de herramientas de diagnóstico

disponibles, que incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a un examen físico, que incluye pruebas sanguíneas, pruebas de la función pulmonar y rayos X del pecho; barrido de CT; broncoscopia; lavado broncoalveolar; biopsia de pulmón y barrido de CT.

La tecnología para producir anticuerpo monoclonales que incluyen, por ejemplo, anticuerpo monoclonales anti-integrina, es muy conocida. Véase, por ejemplo, Mendrick *et al.*, 1995, *Lab. Invest.*, 72:367-375 (mAb contra anti- $\alpha 1\beta 1$ y anti- $\alpha 2\beta 1$ murinos); Sonnenberg *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:10376-10383 (mAb contra anti- $\alpha 6\beta 1$ murino); Yao *et al.*, 1996, *J. Cell Sci.*, 1996 109:3139-3150 (mAb contra anti- $\alpha 7\beta 1$ murino); Hemler *et al.*, 1984, *J. Immunol.*, 132:3011-3018 (mAb contra $\alpha 1\beta 1$ humano); Pischel *et al.*, 1987, *J. Immunol.*, 138:226-233 (mAb contra $\alpha 2\beta 1$ humano); Wayner *et al.*, 1988, *J. Cell Biol.*, 107:1881-1891 (mAb contra $\alpha 3\beta 1$ humano); Hemler *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:11478-11485 (mAb contra $\alpha 4\beta 1$ humano); Wayner *et al.*, 1988, *J. Cell Biol.*, 107:1881-1891 (mAb contra $\alpha 5\beta 1$ humano); Sonnenberg *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:10376-10383 (mAb contra $\alpha 6\beta 1$ humano); Wang *et al.*, 1996, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 15:664-672 (mAb contra $\alpha 9\beta 1$ humano); Davies *et al.*, 1989, *J. Cell Biol.*, 109:1817-1826 (mAb contra $\alpha V\beta 1$ humano); Sánchez-Madrid *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7489-7493 (mAb contra $\alpha L\beta 1$ humano); Diamond *et al.*, 1993, *J. Cell Biol.*, 120:1031-1043 (mAb contra $\alpha M\beta 2$ humano); Stacker *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 146:648-655 (mAb contra $\alpha X\beta 2$ humano); Van der Vieren *et al.*, 1995, *Immunity*, 3:683-690 (mAb contra $\alpha D\beta 2$ humano); Bennett *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2417-2421 (mAb contra $\alpha IIb\beta 3$ humano); Hessle *et al.*, 1984, *Differentiation*, 26:49-54 (mAb contra $\alpha 6\beta 4$ humano); Weinacker *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:6940-6948 (mAb contra $\alpha V\beta 5$ humano); Weinacker *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:6940-6948 (mAb contra $\alpha V\beta 6$ humano); Cerf-Bensussan *et al.*, 1992, *Eur. J. Immunol.*, 22:273-277 (mAb contra $\alpha E\beta 7$ humano); Nishimura *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:28708-28715 (mAb contra $\alpha V\beta 8$ humano); Bossy *et al.*, 1991, *EMBO J.*, 10:2375-2385 (antisuero policlonal contra $\alpha 8\beta 1$ humano); Camper *et al.*, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273:20383-20389 (antisuero policlonal contra $\alpha 10\beta 1$ humano).

En general, una línea celular inmortal (generalmente células de mieloma) se fusiona con linfocitos (generalmente esplenocitos) procedentes de un mamífero inmunizado con células completas que expresan un antígeno concreto, por ejemplo, una integrina, y los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma resultantes se seleccionan para anticuerpos contra el antígeno, Véase, en general, Kohler *et al.*, 1975, *Nature*, 265:295-497, "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity".

La inmunización puede lograrse empleando procedimientos convencionales. La dosis unitaria y el régimen de inmunización dependen de la especie de mamífero inmunizado, su estado inmunológico, el peso corporal del mamífero, etc. Generalmente, los mamíferos inmunizados se sangran, y el suero de cada muestra de sangre se ensaya para anticuerpos concretos empleando los ensayos de selección apropiados. Por ejemplo, los anticuerpos anti-integrina pueden identificarse mediante inmunoprecipitación de lisados de células marcadas con 125I a partir de células que expresan integrinas. Los anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-integrina, también pueden identificarse mediante citometría de flujo, por ejemplo, midiendo la tinción fluorescente de células que expresan anticuerpos incubadas con el anticuerpo que se cree que reconoce las moléculas de integrina. Los linfocitos empleados para la producción de células de hibridoma generalmente se aíslan a partir de mamíferos inmunizados, cuyo suero ya ha dado positivo para la presencia de anticuerpos anti-integrina empleando estos ensayos de selección.

Generalmente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea de células de mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas de células de mieloma de ratón que son sensibles a un medio de cultivo que contenga hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Generalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón empleando polietilenglicol de peso molecular 1500 ("PEG 1500"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión después se seleccionan empleando medio HAT, que mata las células no fusionadas y las células de mieloma fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren varios días después porque no están transformados). Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado se detectan seleccionando los sobrenadantes de los cultivos de los hibridomas. Por ejemplo, los hibridomas preparados para producir anticuerpos anti-integrina pueden seleccionarse ensayando el sobrenadante del cultivo del hibridoma para anticuerpos segregados que tengan la capacidad de unirse a una línea celular que expresa una integrina recombinante.

Para producir homólogos de anticuerpos que incluyen, por ejemplo, homólogos de anticuerpos anti-integrina, que son inmunoglobulinas intactas, se cultivan células de hibridoma que han puntuado como positivas en estos ensayos de selección, en un medio nutriente bajo condiciones y durante un tiempo suficiente como para permitir que las células de hibridoma segreguen los anticuerpos monoclonales hacia el medio de cultivo. Las técnicas de cultivo de tejidos y los medios de cultivo adecuados para las células de hibridoma son muy conocidos. El sobrenadante del cultivo de hibridoma condicionado puede recogerse, y los anticuerpos anti-integrina después pueden purificarse opcionalmente mediante métodos muy conocidos.

Como alternativa, el anticuerpo deseado puede producirse inyectando las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón no inmunizado. Las células de hibridoma proliferan en la cavidad peritoneal, segregando el anticuerpo que se acumula como fluido de ascitis. El anticuerpo puede recolectarse extrayendo el fluido de ascitis de la cavidad peritoneal con una jeringa.

Los homólogos de anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra, por ejemplo, integrinas, son otro agente de unión preferido que puede bloquear antígenos en el método de la invención. En su forma intacta, estos pueden prepararse empleando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, según se describe en Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol., 147:86-95, "Production of Antigen-specific Human Monoclonal Antibodies from In Vitro-Primed Human Splenocytes".

Como alternativa, pueden prepararse mediante la clonación de un repertorio, según se describe en Persson *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88:2432-2436, "Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning"; y en Huang y Stollar, 1991, J. Immunol. Methods, 141: 227-236, "Construction of representative immunoglobulin variable region CDNA libraries from human peripheral blood lymphocytes without in vitro stimulation". La patente de EEUU n.º 5.798.230 (25 de agosto, 1998, "Proceso para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos y su uso") describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B humanas. Según este proceso, células B productoras de anticuerpos humanos son inmortalizadas mediante una infección con un virus de Epstein-Barr, o un derivado de este, que exprese el antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr (EBNA2). La función EBNA2, que es necesaria para la inmortalización, posteriormente se desactiva, lo cual resulta en un aumento en la producción de anticuerpos.

En otro método para producir anticuerpos totalmente humanos, la patente de EEUU 5.789.650 (4 de agosto, 1998, "Animales no humanos transgénicos para producir anticuerpos heterólogos") describe animales no humanos transgénicos capaces de producir anticuerpos heterólogos y animales no humanos transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina endógenos inactivados. Los genes de inmunoglobulina endógenos son reprimidos por polinucleótidos antisentido y/o por un antisuero dirigido contra las inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos heterólogos son codificados por genes de inmunoglobulina que no se encuentran normalmente en el genoma de esa especie de animal no humano. Uno o más transgenes que contienen secuencias de cadenas pesadas de inmunoglobulina humana heterólogas no redispuestas se introducen en un animal no humano, formando con ello un animal transgénico capaz de disponer funcionalmente secuencias de inmunoglobulina transgénicas y producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humanos. Estos anticuerpos humanos heterólogos son producidos en células B que después son inmortalizadas, por ejemplo, fusionándolas con una línea celular inmortalizante, tal como un mieloma, o manipulando dichas células B mediante otras técnicas para perpetuar una línea celular capaz de producir un homólogo de anticuerpo totalmente humano heterólogo y monoclonal.

Otro agente de unión preferido que puede bloquear antígenos de integrina, o sus fragmentos, en el método descrito en la presente, es un homólogo de anticuerpo humanizado que tiene la capacidad de unirse a una proteína de integrina, o a sus fragmentos. Siguiendo los métodos anteriores para la preparación de anticuerpos quiméricos, se ha descrito una nueva estrategia en el documento EP 0239400 (Winter *et al.*), mediante la cual se alteran anticuerpos mediante la sustitución de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie por las de otra especie. Este proceso puede emplearse, por ejemplo, para sustituir las CDR de los dominios de la región variable de Ig de cadena pesada y ligera humanas por CDR alternativas de dominios de la región variable murinos. Estas regiones variables de Ig alteradas después pueden combinarse con regiones constantes de Ig humana para crear anticuerpos que sean totalmente humanos en su composición, excepto por las CDR murinas sustituidas. Se puede predecir que es menos probable que estos anticuerpos con CDR sustituidas susciten una respuesta inmunológica en seres humanos, comparado con anticuerpos quiméricos, porque los anticuerpos con CDR sustituidas contienen considerablemente menos componentes no humanos. El proceso para humanizar anticuerpos monoclonales a través del "injerto" de CDR se ha denominado "rediseño" ("reshaping") (Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332: 323-327, "Reshaping human antibodies for therapy"; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science, 239:1534-1536, "Reshaping of human antibodies using CDR-grafting in Monoclonal Antibodies").

Generalmente, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo murino son transplantadas a las correspondientes regiones en un anticuerpo humano, puesto que las CDR (tres en las cadenas pesadas de anticuerpos, tres en las cadenas ligeras) son las regiones del anticuerpo de ratón que se unen a un antígeno específico. El trasplante de las CDR se logra mediante modificación genética, en la que las secuencias de ADN de CDR se determinan clonando segmentos de genes de la región variable (V) de cadena pesada y ligera murina, y después se trasladan a las correspondientes regiones V humanas mediante mutagénesis dirigida específica de sitio. En la etapa final del proceso, se añaden segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (habitualmente gamma I para CH y kappa para CL), y los genes de cadena ligera y pesada humanizados se coexpresan en células de mamífero para producir un 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. Las seis CDR en el anticuerpo murino se montan estructuralmente en una región "de marco" de la región V. La razón de que el injerto de CDR tenga éxito es que las regiones de marco entre los anticuerpos de ratón y humanos pueden tener estructuras tridimensionales muy parecidas, con puntos de unión similares para las CDR, de modo que las CDR pueden intercambiarse. Estos homólogos de anticuerpos humanizados pueden prepararse como se ejemplifica en Jones *et al.*, 1986, Nature, 321: 522-525, "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse"; Riechmann, 1988, Nature, 332:323-327, "Reshaping human antibodies for therapy"; Queen *et al.*, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86:10029, "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor"; y Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

86:3833 "Cloning Immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction".

No obstante, se cree que ciertos aminoácidos dentro de las regiones de marco interaccionan con las CDR e influyen en la afinidad de unión al antígeno global. La transferencia directa de CDR desde un anticuerpo murino para producir un anticuerpo humanizado sin ninguna modificación de los marcos de la región V humana a menudo provoca una pérdida parcial o completa de la afinidad de unión. En una serie de casos, parece que resulta crítico alterar restos en las regiones marco del anticuerpo aceptor para obtener la actividad de unión.

Queen *et al.*, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033, "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor", y el documento WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) han descrito la preparación de un anticuerpo humanizado que contiene restos modificados en las regiones marco del anticuerpo aceptor combinando las CDR de un mAb murino (anti-Tac) con regiones constantes y de marco de inmunoglobulinas humanas. Han demostrado una solución al problema de la pérdida de afinidad de unión que a menudo surge de la transferencia directa de CDR sin modificaciones en los restos marco de la región V humana. Su solución implica dos etapas clave. En primer lugar, las regiones de marco de V humanas son elegidas por informáticos para obtener la óptima homología de secuencia de proteína con el marco de la región V del anticuerpo murino original, en este caso, el mAb anti-Tac. En la segunda etapa, la estructura terciaria de la región V murina se modela por ordenador para visualizar los restos aminoácidos del marco que es probable que interaccionen con las CDR murinas, y estos restos aminoácidos murinos después se superponen sobre el marco humano homólogo. Su estrategia de emplear marcos humanos homólogos con restos de contacto murinos putativos produce anticuerpos humanizados con afinidades de unión similares al anticuerpo murino original con respecto a anticuerpos específicos para el receptor 2 de interleuquina (Queen *et al.*, 1989 [*supra*]) y también para anticuerpos específicos para el virus del herpes simplex (HSV) (Co. *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88:2869-2873, "Humanised antibodies for antiviral therapy").

Según la estrategia de dos etapas descrita anteriormente en el documento WO 90/07861, Queen *et al.* perfilaron varios criterios para diseñar inmunoglobulinas humanizadas. El primer criterio es emplear, como aceptor humano, el marco de una inmunoglobulina humana concreta que habitualmente sea homóloga con la inmunoglobulina donante no humana que va a ser humanizada, o emplear un marco consenso para muchos anticuerpos humanos. El segundo criterio es emplear el aminoácido donante en lugar del aceptor si el resto aceptor humano no es habitual y el resto donante es típico para secuencias humanas en un resto específico del marco. El tercer criterio es emplear el resto aminoácido del marco donante en lugar del aceptor en posiciones inmediatamente adyacentes a las CDR.

Se puede emplear una estrategia diferente (véase Tempest, 1991, Biotechnology, 9:266-271, "Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection *in vivo*") que emplea, como patrón, marcos de la región V derivados de las cadenas pesada y ligera NEWM y REI, respectivamente, para el injerto de CDR sin la introducción radical de restos de ratón. Una ventaja de utilizar la estrategia de Tempest *et al.*, 1991, para construir anticuerpos humanizados basados en NEWM y REI es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables NEWM y REI son conocidas a partir de la cristalografía de rayos X y, así, las interacciones específicas entre los restos marco de la región V y las CDR pueden modelarse.

Los presentes tratamientos son eficaces en sujetos humanos y animales que padecen estos trastornos. Los sujetos animales a los que se aplica la invención se extienden a animales domésticos y ganado, criados como mascotas o para fines comerciales. Los ejemplos son perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos y cabras.

En los métodos descritos en la presente, los anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, los anticuerpos anti-VLA-1, pueden administrarse por vía parenteral. El término "parenteral", tal como se emplea en la presente, incluye técnicas de infusión o de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden cualquiera de los compuestos de la presente invención, o sus derivados farmacéuticamente aceptables, junto con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo", tal como se emplea en la presente, incluye vehículos y adyuvantes aceptables conocidos.

Según esta invención, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según técnicas conocidas en la técnica empleando agentes suspensores y agentes dispersantes o humectantes adecuados.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por vía oral. Si se administran por vía oral, pueden administrarse en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en un ungüento adecuado que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse mediante un aerosol nasal o inhalación empleando un nebulizador, un inhalador de polvo seco o un inhalador dosimétrico.

La dosificación y tasa de dosis de los compuestos de esta invención eficaces para producir los efectos deseados dependerá de una diversidad de factores, tales como la naturaleza del inhibidor, el tamaño del sujeto, el objetivo del tratamiento, la naturaleza de la patología que se va a tratar, la composición farmacéutica específica empleada, y el criterio del médico encargado. Son útiles unos niveles de dosificación entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal diarios, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal diarios del compuesto del ingrediente activo. Lo más preferiblemente, los homólogos de anticuerpos se administrarán a una dosis que varía entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal/día, preferiblemente varía entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, y a intervalos de cada 1-14 días. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra a una dosis de aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg cuando se administra i.p. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra a una dosis de aproximadamente 5 a 12,5 mg/kg cuando se administra i.v. Preferiblemente, una composición de anticuerpos se administra en una cantidad eficaz para proporcionar un nivel plasmático del anticuerpo de al menos 1 ug/ml.

Los expertos en la técnica pueden ensayar con facilidad si un antagonista de la invención está teniendo su efecto previsto. Por ejemplo, se sondan células contenidas en una muestra del epitelio del individuo para la presencia del agente *in vitro* (o *ex vivo*) empleando un segundo reactivo para detectar el agente administrado. Por ejemplo, este puede ser un anticuerpo marcado con un fluorocromo que sea específico para el agente administrado, que entonces se mide mediante análisis FACS (clasificación de células activada por fluorescencia) convencional. Como alternativa, la presencia del agente administrado se detecta *in vitro* (o *ex vivo*) por la incapacidad o la capacidad disminuida de las células de individuo a unirse al mismo agente que ha sido marcado en sí mismo (por ejemplo, mediante un fluorocromo). La dosificación preferida debe producir un revestimiento detectable sobre casi todas las células positivas a erizo. Preferiblemente, el revestimiento se mantiene, en el caso de un homólogo de anticuerpo, durante un periodo de 1-14 días.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, las técnicas convencionales de la biología celular, el cultivo celular, la biología molecular, la microbiología, el ADN recombinante, la química de proteínas y la inmunología, que están dentro de la técnica. Estas técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *DNA Cloning*, volúmenes I y II (D. N. Glover, ed.), 1985; *Oligonucleotide Synthesis*, (M. J. Gait, ed.), 1984; patente de EEUU n.º 4.683.195 (Mullis *et al.*); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds.), 1984; *Transcription and Translation* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds.), 1984; *Culture of Animal Cells* (R. I. Freshney, ed.), Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, volúmenes 154 y 155 (Wu *et al.*, eds), Academic Press, Nueva York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds.), Academic Press, Londres, 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.), 1986; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar la presente invención, y no deben considerarse como limitantes de esta.

Ejemplos

Reactivos químicos

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se obtuvo en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El aceite de crotón se obtuvo en ICN Biochemicals (Aurora, OH). La sangre de oveja entera en disolución de Alsevers se obtuvo en East Acres Biologicals (Southbridge, MA). El colágeno de cola de rata de tipo I y el colágeno de ratón de tipo IV se obtuvieron en Collaborative Research Inc. (Bedford, MA) y Gibco (Gaithersburg, MD), respectivamente.

Los ratones hembra Balb/c de 6-8 semanas de edad se obtuvieron en Taconic (Germantown, NY), y los ratones deficientes en integrina $\alpha 1\beta 1$ sobre un entorno Balb/c fueron como se ha descrito previamente (3).

Ejemplo 1

Anticuerpos monoclonales: Los mAb bloqueantes de la función contra antígenos murinos se prepararon en un formato de bajo contenido en endotoxinas y sin azida: Ha31/8 (anti-CD49a de hámster; integrina $\alpha 1$) (Mendrick *et al.*, 1995, *Lab. Invest.*, 72:367-375), Ha1/29 (anti-CD49b de hámster; integrina $\alpha 2\beta 1$) (Mendrick *et al.*, 1995, *Lab. Invest.*, 72:367-375; Mendrick, D. L. y D. M. Kelly, 1993, *Lab. Invest.*, 69:690-702), mAb control del grupo II de hámster Ha4/8 (anti-KLH de hámster) (Mendrick, D. L. y D. M. Kelly, 1993, *Lab. Invest.*, 69:690-702), y PS/2 (anti-CD49d de rata; cadena $\alpha 4\beta 1$ de integrina) (Miyake *et al.*, 1991, *J. Exp. Med.*, 173:599-607). Además, se obtuvieron los siguientes mAb bloqueantes de la función contra antígenos murinos, como preparaciones con bajo contenido en endotoxinas y sin azida en Pharmingen (San Diego, CA): HM β 1-1 (anti-CD29 de hámster; cadena $\beta 1$ de integrina) (Noto *et al.*, 1995, *Int. Immunol.*, 7:835-842), Ha2/5 (anti-CD29 de hámster; cadena $\beta 1$ de integrina) (Mendrick, D. L. y D. M. Kelly, 1993, *Lab. Invest.*, 69:690-702), 3E2 (anti-CD54 de hámster, ICAM-1) (Scheynius *et al.*, 1993, *J. Immunol.*, 150:655-663), 5H10-27 (anti-CD49e de rata; integrina $\alpha 5$) (Kinashi, T., y T. A. Springer, 1994, *Blood Cells*,

20:25-44), GoH3 (anti-CD49f de rata; integrina $\alpha 6$) (Sonnenberg *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:10376-10383), y los mAb de control de isotipo de rata R35-95 (IgG2a de rata) y R35-38 (IgG2b de rata).

Ensayo de adhesión: Se cultivaron esplenocitos de ratones Balb/c con IL-2 20 ng/ml durante 7-12 días. La adhesión de las células al colágeno de tipo I y de tipo IV fue como previamente se ha descrito (Gotwals *et al.*, 1996, *J. Clin. Invest.*, 97:2469-2477). Brevemente, placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc, Napierville, IL) fueron revestidas con 10 μ g/ml de colágeno de tipo IV o 5 μ g/ml de colágeno de tipo I, y los sitios no específicos fueron bloqueados con BSA al 1%. Los esplenocitos activados con IL-2 fueron marcados con BCECF [2',7'-bis(carboxietil)-5(6)carboxilfluorescein pentaacetoximetil éster] 2 μ M (Molecular Probes, Eugene, OR) y se incubaron con 10 μ g/ml de los mAb indicados durante 15 min. Después se añadieron 10^5 células en BSA al 0,25% en RPMI a los pocillos revestidos y se incubó durante 60 min a 37 °C. Las células no unidas se eliminaron lavando tres veces con BSA al 0,25% en RPMI. La adhesión se cuantificó empleando un lector de placas fluorescente CytoFluor 2350 (Millipore, Bedford, MA). La proporción de células unidas a células añadidas se midió, y se calculó el porcentaje de adhesión relativa a las células tratadas con mAb control (normalizado al 100%). Se restaron los valores de fondo debido a la adhesión de células en pocillos revestidos solo con BSA.

Expresión y bloqueo funcional de $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en leucocitos activados. Debido al papel clave que desempeñan los leucocitos en la inflamación, los inventores decidieron ensayar si unos mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ eran capaces de bloquear la adhesión de los leucocitos a colágenos. Para obtener leucocitos que expresan altos niveles de $\alpha 1$ y $\alpha 2$, células T murinas fueron estimuladas *in vitro* con IL-2 durante 7-12 días. Estas células expresan altos niveles de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (figura 1A), y se unen bien a superficies revestidas con colágeno de tipo IV y de tipo I (figura 1B). La adhesión al colágeno de tipo IV fue parcialmente inhibida por el mAb anti- $\alpha 1$ por sí solo y no fue inhibida por el mAb anti- $\alpha 2$ por sí solo. Por contraste, la adhesión al colágeno de tipo I fue completamente inhibida por el mAb anti- $\alpha 2$, y el mAb anti- $\alpha 1$ por sí solo mostró únicamente una inhibición parcial. Ambos mAb anti- $\beta 1$ y la combinación de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ inhibieron completamente la adhesión al colágeno de tipo I y IV. Habiendo demostrado que las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ se expresan sobre células T activadas y que los mAb anti- $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son capaces de bloquear funcionalmente la adhesión de leucocitos a los colágenos, los inventores emplearon estos mAb para investigar el papel *in vivo* de estas integrinas en modelos animales de trastornos inflamatorios.

Ejemplo 2

Inhibición de las respuestas DTH por mAb anti-integrina. Las respuestas de hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH) inducidas por SRBC fueron adaptadas a partir de un protocolo previamente publicado (Hurtrel *et al.*, 1992, *Cell. Immunol.*, 142:252-263). Brevemente, se inmunizaron ratones s.c. en la espalda con 2×10^7 SRBC en 100 μ l de PBS en el día 0. Los ratones fueron expuestos el día 5 con una inyección de 1×10^8 SRBC en 25 μ l de PBS s.c. en la almohadilla de la pata trasera derecha. Se midió el espesor de la almohadilla de la pata con un calibrador de ingeniero (Mitutoyo/MIT, Paramus, NJ) 20 h después de la exposición al antígeno, y se calculó el grado de hinchamiento de la almohadilla de la pata. Los resultados se indican como el porcentaje medio de aumento en el espesor de la almohadilla de la pata $\pm$ MEE, y se calcula como porcentaje de aumento = $[1 - (\text{espesor de la almohadilla de la pata derecha 20 h después de la exposición al antígeno} / \text{espesor de la almohadilla de la pata izquierda no inyectada 20 h después de la exposición al antígeno})] \times 100$. Para bloquear la fase efectora de la respuesta DTH inducida por SRBC, se administraron i.p. mAb terapéuticos o control (100 μ g), que se prepararon según los métodos descritos en el ejemplo 1, 1 h antes de la exposición al antígeno en el día 5.

La DTH inducida por SRBC es un modelo *in vivo* bien caracterizado de la inflamación, y en particular la psoriasis, que se ha empleado para demostrar la importancia de una diversidad de citoquinas y moléculas de adhesión en la inflamación (Tedder *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.*, 181:2259-2264; Terashita *et al.*, 1996, *J. Immunol.*, 156:4638-4643). Los ratones sensibilizados con SRBC reciben mAb anti-integrina 1 h antes de la exposición al antígeno de la almohadilla de la pata, y se evaluó la inflamación 20 h después, según se mide mediante el aumento en el espesor de la almohadilla de la pata. Ratones tratados con PBS y con Ig de hámster control mostraron un aumento del 60-70% en el espesor de la almohadilla de la pata 20 h después de la exposición al antígeno (figura 2). Comparado con el tratamiento con Ig de hámster control, los mAb anti- $\alpha 1$ o anti- $\alpha 2$ produjeron una inhibición del 68% y 60% en el espesor de la almohadilla de la pata, respectivamente. La combinación de mAb anti- $\alpha 1$ y $\alpha 2$ produjo una inhibición del 71%, lo cual demuestra poco efecto aditivo frente a los mAb anti- $\alpha 1$ o anti- $\alpha 2$ por sí solos. El tratamiento con otros mAb anti-integrina también resultó eficaz para inhibir la respuesta efectora de DTH. El grado de inhibición observado con los diversos tratamientos con mAb fue del 49% (anti- $\alpha 4$), 23% (anti- $\alpha 5$), y 57% (anti- $\alpha 6$). Por último, el bloqueo de mAb de la subunidad de integrina $\beta 1$ común (mAb HMBl-1) inhibió la respuesta DTH efectora en 67%.

Ejemplo 3

Inhibición de las respuestas efectoras CHS por mAb anti-integrina. Se ensayó la hipersensibilidad por contacto (CHS) a FITC como se ha descrito previamente (Gaspari *et al.*, 1991, en *Current Protocols in Immunology*, J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, y W. Strober, editores, John Wiley & Sons, Nueva York, sección 4.2:1). Brevemente, los ratones fueron sensibilizados extendiendo 100 μ l de FITC al 0,5% en acetona/dibutilftalato 1:1 sobre la espalda afeitada en el día 0. Diez días después, los animales se expusieron mediante la aplicación de 5 μ l de FITC al 0,5% a ambos lados de cada oreja. Se determinó la respuesta de

hinchamiento de la oreja mediante el espesor de la oreja medido con un calibrador de ingeniero (Mitutoyo/MTI, Paramus, NJ) en el momento de la exposición al antígeno (día 10) y 24 h después, y los resultados se indican como el porcentaje medio de aumento en el espesor de la oreja desde la línea de base $\pm$ MEE. El aumento en el espesor de la oreja se calcula como porcentaje de aumento = $[1 - (\text{espesor de la oreja 24 h después de la exposición al antígeno} / \text{espesor de la oreja en el momento de la exposición al antígeno})] \times 100$. Para bloquear la fase efectora de la respuesta CHS, se administraron mAb terapéuticos o control (250 μ g) i.p. 4 h antes de la exposición al antígeno en el día 10. Los ratones que fueron sensibilizados con el antígeno y que su oreja fue expuesta solo a vehículo (control de vehículo), o los ratones que fueron expuestos en la oreja sin sensibilización previa (control irritante) actuaron como controles negativos (nunca exceden de un aumento del 2% en el espesor de la oreja).

Puesto que CHS es mecánicamente diferente de DTH e implica a diferentes células efectoras, los inventores investigaron el efecto de los mAb anti-integrina sobre la fase efectora de la respuesta CHS. Los ratones fueron sensibilizados con haptenos empleando FITC aplicado a la espalda afeitada, seguido 10 días después por una exposición a FITC en la oreja que produce una respuesta inflamatoria al día siguiente. Los ratones sensibilizados con FITC mostraron un aumento del 60-70% en el espesor 24 h después de la exposición al antígeno (figura 3). En coherencia con los resultados publicados (Scheynius *et al.*, J. Immunol., 150:655-663), el tratamiento con mAb anti-ICAM-1 produjo una inhibición del 51% en el hinchamiento de la oreja. Comparado con el mAb de hámster control, el tratamiento de ratones con mAb anti- α 1 o anti- α 2 4 h antes de la exposición al antígeno produjo una inhibición del 37% y 57% en el hinchamiento de la oreja, respectivamente (figura 3). La combinación de mAb anti- α 1 y anti- α 2 produjo una inhibición ligeramente mayor del hinchamiento de la oreja (65%). El tratamiento con otros mAb contra integrinas β 1 reveló que, aunque los mAb anti- α 4 y anti- α 5 no producen inhibición de la respuesta efectora CHS inducida por FITC cuando se comparan con el mAb de rata control, el tratamiento con mAb anti- α 6 produjo una inhibición del 86% de las respuestas efectoras. Por último, el bloqueo de mAb de la subunidad de integrina β 1 común inhibe las respuestas efectoras CHS en 74%. Se obtuvieron resultados similares de CHS empleando diferentes razas de ratones (C57/BL6, 129/Sv) y un agente sensibilizante diferente (oxazolona) (los datos no se muestran). De forma similar a los resultados observados en el modelo de DTH inducida por SRBC, los análisis histológicos de las orejas inflamadas demostraron que la formación de edemas y la infiltración de leucocitos fueron inhibidas por el tratamiento con mAb anti- α 1 y anti- α 2.

En coherencia con el descubrimiento de que α 1 β 1 y α 2 β 1 pueden ser expresadas sobre esplenocitos activados con IL-2, el análisis de los nódulos linfáticos de ratones sensibilizados con el antígeno (FITC u oxazolona) reveló que α 1 β 1 y α 2 β 1 se expresan exclusivamente sobre células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas con CD44^{hi} LFA-1^{hi} (los datos no se muestran). El tratamiento de ratones con los mAb anti- α 1 y anti- α 2 no produjo la deleción de estas células, puesto que el número de células T activadas en el bazo y en los nódulos linfáticos en respuesta a la sensibilización con el antígeno en el modelo de CHS no se vió afectado. Además, las células efectoras no fueron funcionalmente delecionadas, puesto que un tratamiento prolongado de los ratones sensibilizados con el antígeno con los mAb anti- α 1 y anti- α 2 (día 10-16) no afectó a la respuesta inflamatoria de los ratones expuestos al antígeno en el día 20 (los datos no se muestran).

Ejemplo 4

Las respuestas efectoras CHS son menores en ratones deficientes en α 1 β 1. Para excluir la posibilidad de que el papel inhibidor de α 1 β 1 en la respuesta efectora de CHS mediada por FITC también esté mediada por mAb, se realizaron experimentos en ratones deficientes en la integrina α 1 β 1 y de tipo salvaje (figura 4). La inhibición por mAb de la fase efectora en los ratones de tipo salvaje fue coherente con los resultados previos, observándose una inhibición del 56% en el espesor de la oreja con anti- α 1, del 56% con anti- α 2, y del 62% con una combinación de anti- α 1 y anti- α 2. La fase efectora de CHS se redujo significativamente en los ratones deficientes en α 1 β 1 no tratados, comparado con los ratones de tipo salvaje no tratados (aumento del 30% frente al 71% en el espesor de la oreja, respectivamente). Tal como se esperaba, el nivel de hinchamiento de la oreja en los ratones deficientes en α 1 β 1 no tratados fue equivalente al nivel de hinchamiento de la oreja observado en los ratones de tipo salvaje tratados con el mAb anti- α 1. Por último, el bloqueo por mAb de α 2 β 1 en los ratones deficientes en α 1 β 1 solo produjo una inhibición ligeramente mayor del hinchamiento de la oreja, lo cual es coherente con los resultados observados en los ratones de tipo salvaje tratados con una combinación de mAb anti- α 1 y anti- α 2.

Ejemplo 5

Para excluir también la posibilidad de que el efecto inhibidor de los mAb anti-integrina observado en los modelos de inflamación de DTH y CHS esté provocado por un efecto antiinflamatorio general mediado por los mAb anti- α 1 y anti- α 2, se estudió el efecto de estos mAb sobre la dermatitis irritante.

Para evaluar la dermatitis irritante, los ratones fueron pintados con 5 μ l de aceite de crotón al 0,8% en acetona en ambos lados de cada oreja. Se administraron anticuerpos terapéuticos o control 4 h antes de la aplicación del irritante. El hinchamiento de la oreja se midió 24 h después tal como se describió anteriormente y se compara con el espesor de la oreja antes de la aplicación del aceite de crotón. Los resultados se indican como el porcentaje medio de aumento en el espesor de la oreja desde la línea de base $\pm$ MEE, según se describió anteriormente. Los ratones pintados solo con acetona (control de vehículo) actúan como control negativo.

Veinticuatro horas después, las orejas de los ratones tratados con aceite de croton mostraron un aumento significativo en el espesor de la oreja (48%), cuando se compara con ratones que reciben solo vehículo (acetona). El hinchamiento tóxico de la oreja provocado por el aceite de croton no se vió significativamente afectado en ratones pretratados con los mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$, cuando se compara con los animales tratados con mAb control o PBS (figura 5). El examen histológico de las orejas tratadas con aceite de croton no reveló diferencias en el número o el tipo de células infiltrantes o en la formación de edemas en ratones tratados con los mAb anti- $\alpha 1$ o anti- $\alpha 2$, comparado con los ratones tratados con el mAb control o los ratones tratados con PBS (los datos no se muestran).

Ejemplo 6

Inhibición de la artritis por $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$. Puesto que $\alpha 1\beta 1$ se expresa bien en células infiltrantes en el sinovio de pacientes con artritis, los inventores decidieron estudiar si los mAb anti- $\alpha 1$ o anti- $\alpha 2$ serían inhibidores en un modelo acelerado de artritis previamente descrito (Terato *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, 148:2103-2108; Terato *et al.*, 1995, *Autoimmunity*, 22:137-147).

Los kits de anticuerpos Arthrogen-CIA se obtuvieron en Stratagene (La Jolla, CA) y se indujo la artritis empleando un protocolo bien establecido (Terato *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, 148:2103-2108; Terato *et al.*, 1995, *Autoimmunity*, 22:137-147). Brevemente, la artritis se indujo a través de una inyección i.p. de un cóctel de 4 mAb anti-colágeno de tipo II (1 mg cada uno) en el día 0, seguido de una inyección i.p. de 50 ug de LPS en el día 3. A lo largo de los siguientes 3-4 días, los ratones desarrollaron hinchamiento en muñecas, tobillos y dedos. Los mAb terapéuticos o control (250 ug) se administraron i.p. 4 h antes de la inyección de los mAb anti-colágeno en el día 0, y de nuevo 4 h antes de la administración de LPS en el día 3, y después continuando cada 3^{er} día durante todo el experimento. Comenzando en el día 3, los ratones fueron evaluados para el desarrollo de la artritis. La gravedad de la artritis en cada extremidad fue puntuada empleando un sistema de cuatro puntos: 0 = normal; 1 = enrojecimiento ligero, hinchamiento ligero del tobillo o muñeca; 2 = hinchamiento moderado del tobillo o muñeca; 3 = hinchamiento grave que incluye algunos dedos, tobillo y pie; 4 = máximamente inflamado.

La artritis grave en ratones Balb/c se desarrolló en las 72 h después de la inyección de LPS y persistió durante más de 3 semanas. Ni la inyección de los mAb anti-colágeno solos ni el LPS solo indujeron artritis. Los ratones que recibieron un tratamiento con mAb control mostraron una artritis igual de grave que la que se observa en los ratones tratados con PBS (figura 6). Por contraste, el tratamiento con el mAb anti- $\alpha 1$ solo produjo una reducción marcada (78%) en la artritis, que dura todo el experimento. El tratamiento con el mAb anti- $\alpha 2$ solo también tuvo un efecto beneficioso, dando como resultado una disminución del 32% en la puntuación artrítica comparado con los ratones tratados con mAb control. La combinación de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ produjo un grado de inhibición similar al observado con el mAb anti- $\alpha 1$ solo.

Ejemplo 7

Análisis histológico del efecto del tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ sobre el infiltrado celular inflamatorio. Otros análisis histológicos de la respuesta DTH inducida por SRBC confirmaron la capacidad del tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ para modular la respuesta inflamatoria suscitada (figura 7). Una almohadilla de la pata no expuesta de un ratón sensibilizado con SRBC (figura 7, panel A) mostró prácticamente ningún infiltrado celular inflamatorio cuando se compara con una almohadilla de la pata expuesta a SRBC del mismo ratón (figura 7, panel B). El tratamiento de ratones sensibilizados con SRBC con mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ solos o combinados redujo en gran medida el número de estas células infiltrantes que se encuentran en almohadillas de la pata expuestas a SRBC, cuando se compara con ratones tratados con mAb control (figura 7, panel C-F). Un examen más exhaustivo de las células infiltrantes reveló que la mayoría de las células estaban compuestas de neutrófilos, con algunos monocitos y linfocitos presentes, y confirmó que el tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ disminuyó en gran medida el número de estas células (figura 7, panel G-H).

Ejemplo 8

Demostración inmunohistoquímica de células que expresan $\alpha 1$ en el infiltrado celular inflamatorio. Se realizó una inmunohistoquímica para determinar con más precisión la naturaleza de las células infiltrantes y si expresan integrinas de unión al colágeno (figura 8). Las células infiltrantes de una almohadilla de la pata inflamada de un ratón no tratado se estudiaron para la expresión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ y los marcadores del linaje celular (figura 8). Se descubrió que la integrina $\alpha 1\beta 1$ era expresada por muchos leucocitos infiltrantes (figura 8A). Se empleó una inmunohistoquímica dual para identificar la naturaleza de las células infiltrantes y la distribución de la expresión de $\alpha 1\beta 1$ (figura 8B). Empleando marcadores del linaje celular, se descubrió que el infiltrado estaba compuesto en gran medida por granulocitos/monocitos (Mac-1+), siendo muchas de estas células neutrófilos (Gr1+), junto con un número más pequeño de linfocitos T (CD3+) (figura 8B). La expresión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ se encontró en los tres subconjuntos de células, siendo $\alpha 1$ expresada en un subconjunto de granulocitos/monocitos Mac-1+, un subconjunto de neutrófilos Gr1+, y sobre la mayoría de los linfocitos T CD3+ infiltrantes (figura 8B). Un análisis inmunohistoquímico detallado reveló que aunque el tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ reduce el número de células infiltrantes, no se observan cambios en la composición celular del infiltrado (los datos no se muestran). La tinción inmunohistoquímica con un mAb anti-hámster FITC confirmó la capacidad de los mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ para

localizarse en la almohadilla de la pata inflamada (los datos no se muestran).

Ejemplo 9

Inhibición de la artritis por mAb contra $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en un ratón deficiente en $\alpha 1$. Puesto que $\alpha 1\beta 1$ se expresa bien en células infiltrantes en el sinovio de pacientes con artritis, los inventores decidieron estudiar si los mAb anti- $\alpha 1$ o anti- $\alpha 2$ serían inhibidores en un modelo acelerado de artritis previamente descrito (Terato *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, 148:2103-2108; Terato *et al.*, 1995, *Autoimmunity*, 22:137-147). Este modelo implica la inyección de un cóctel de mAb anti-colágeno de tipo II en ratones, seguido de la administración de LPS, dando como resultado el desarrollo de la artritis en los siguientes 3-7 días. Los ratones recibieron mAb cada 3^{er} día, comenzando en el día 0, y fueron puntuados para el desarrollo de la artritis cada 3^{er} día. Se desarrolló una artritis grave en todos los ratones a las 72 h después de la inyección de LPS y persistió durante más de 3 semanas. Ni la inyección con los mAb anti-colágeno solos ni el LPS solo indujeron artritis. Los ratones que recibieron un tratamiento con mAb control mostraron una artritis igual de grave que la que se observa en los ratones tratados con PBS (figura 9A). Por contraste, el tratamiento con el mAb anti- $\alpha 1$ solo produjo una reducción marcada (79% y mayor) en la artritis, que dura todo el experimento. El tratamiento con el mAb anti- $\alpha 2$ solo también tuvo un efecto beneficioso, dando como resultado una disminución del 37% en la puntuación artrítica comparado con los ratones tratados con mAb control. La combinación de mAb anti- $\alpha 1$ y anti- $\alpha 2$ produjo un grado de inhibición similar al observado con el mAb anti- $\alpha 1$ solo. Se observó una reducción en la puntuación artrítica con el tratamiento de mAb anti- $\alpha 1$ en todos los ratones, y supone un mejor resultado que varios otros tratamientos basados en mAb para la artritis, tales como la proteína de fusión Ig-receptor de TNF soluble (Mori *et al.*, 1996, *J. Immunol.*, 157:3178-3182), anti-Mac-1 (Taylor *et al.*, 1996, *Immunology*, 88:315-321), anti- $\alpha 4$ (Seiffge, 1996, *J. Rheumatol.*, 23:2086-2091), y anti-ICAM-1 (Kakimoto *et al.*, 1992, *Cell Immunol.*, 142:326-337) (figura 9A). En conformidad con los datos basados en mAb que demuestran un papel importante de $\alpha 1\beta 1$ en la artritis, los ratones deficientes en $\alpha 1$ mostraron una reducción significativa en la puntuación artrítica cuando se comparan con los ratones de tipo salvaje (figura 9B).

Ejemplo 10

Efecto de un tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ sobre la inmunopatología de articulaciones artríticas. Las articulaciones de ratones artríticos de tipo salvaje (día 8) que recibieron mAb control o un tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ fueron comparadas de modo visual e histológico con articulaciones de un ratón no tratado normal (figura 10). Desde el punto de vista visual, las articulaciones de los ratones tratados con mAb control mostraron enrojecimiento e hinchamiento del pie entero, incluyendo los dedos, mientras que los ratones tratados con mAb anti- $\alpha 1$ mostraron poca o ninguna señal de inflamación en las articulaciones o en los dedos. El examen histológico mostró cambios graves en las articulaciones artríticas tratadas con mAb control, con una extensa infiltración del tejido subsinovial por células inflamatorias, la adherencia de células a la superficie de la articulación, y una marcada destrucción del cartílago, según se pone en evidencia por la pérdida de proteoglicanos (figura 10). En coherencia con informes previos (Terato *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, 148:2103-2108; Terato *et al.*, 1995, *Autoimmunity*, 22:137-147), la mayoría de las células infiltrantes en este modelo son neutrófilos. El tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ de los ratones redujo drásticamente la cantidad de infiltrado inflamatorio y el grado de destrucción del cartílago (figura 10).

Ejemplo 11

El desarrollo de la artritis se retrasa en ausencia de linfocitos, y la inhibición de la artritis por mAb anti- $\alpha 1$ se produce en ausencia de linfocitos. Para determinar qué tipos celulares pueden ser importantes en el modelo de artritis inducida por mAb de colágeno, los inventores compararon la capacidad de ratones B6-129 de tipo salvaje y ratones B6-129 deficientes en RAG-1 para desarrollar artritis (figura 11). La delección genética del gen RAG-1 (gen activador de la recombinación-1) produce la pérdida completa de linfocitos B y T maduros (Mombaerts *et al.*, 1992, *Cell*, 68:869-877). Tanto los ratones de tipo salvaje como los ratones deficientes en RAG-1 desarrollaron artritis, aunque la cinética de la inducción en los ratones deficientes en RAG-1 es significativamente más lenta (figura 11). Estos resultados sugieren que aunque los linfocitos están implicados en este modelo de artritis, no son necesarios para el desarrollo y el avance de la enfermedad. Los informes publicados que estudian el efecto de los ratones deficientes en RAG-1 en otros modelos de artritis también han descubierto que la pérdida de linfocitos T y B retrasa la aparición de la artritis (Plows *et al.*, 1999, *J. Immunol.*, 162:1018-1023). El tratamiento de ratones de tipo salvaje o deficientes en RAG-1 con mAb anti- $\alpha 1$ inhibe completamente la artritis (figura 11). Estos resultados demuestran que la eficacia del mAb anti- $\alpha 1$ en este modelo no depende de la presencia de linfocitos y que, tal como sugieren los experimentos previos (figura 9), la eficacia de un mAb anti- $\alpha 1$ para prevenir la enfermedad puede ser a través de su acción sobre otras células que expresan $\alpha 1$, tales como macrófagos y neutrófilos.

Ejemplo 12

Dosis-respuesta de la inhibición de la artritis por mAb anti- $\alpha 1$. Dados los sorprendentes efectos del tratamiento con mAb anti- $\alpha 1$ en la prevención de la artritis, los inventores extendieron estos estudios para incluir un análisis de dosis-respuesta (figura 12). Se administraron i.p. diferentes dosis de mAb cada 3^{er} día comenzando en el día 0. En coherencia con los datos previos, una dosis de 250 ug de mAb anti- $\alpha 1$ produjo una prevención casi completa de la artritis. Una dosis menor de 100 ug de mAb anti- $\alpha 1$ fue parcialmente eficaz para prevenir la artritis en este modelo,

mientras que unas dosis menores no tuvieron ningún efecto perceptible sobre la puntuación artrítica (figura 12).

Ejemplo 13

Un tratamiento terapéutico con un mAb anti- $\alpha 1$ puede disminuir la puntuación artrítica. Dada la eficacia del mAb anti- $\alpha 1$ para prevenir la artritis, los inventores intentaron tratar a ratones que están en camino de desarrollar la enfermedad. La artritis se indujo en ratones mediante una inyección con un cóctel de mAb anti-colágeno de tipo II en el día 0, seguido de la administración de LPS en el día 3. Después, los ratones fueron tratados con mAb anti- $\alpha 1$ o una proteína de fusión de Ig-receptor TNF soluble en el día 4. El avance de la artritis resultó completamente bloqueado en ratones que recibieron el mAb anti- $\alpha 1$ comenzando en el día 4, cuando se compara con ratones que recibieron el mAb de hámster control comenzando en el día 4 (figura 13). El grado de inhibición observado con la administración terapéutica del mAb anti- $\alpha 1$ fue completo e igual al observado con un tratamiento preventivo de mAb anti- $\alpha 1$ (comenzando en el día 0) (figura 13). En comparación, el tratamiento con la proteína de fusión de Ig-receptor de TNF desde el día 4 en adelante produjo solo una inhibición del 60-70% en la puntuación artrítica cuando se compara con la proteína de fusión de Ig control (figura 13). El tratamiento combinado con mAb anti- $\alpha 1$ y fusión de Ig-receptor de TNF fue eficaz para inhibir completamente la puntuación artrítica, lo cual no resulta sorprendente, dada la completa eficacia del tratamiento con el mAb anti- $\alpha 1$ solo para reprimir la artritis. En resumen, estos resultados indican que un tratamiento terapéutico con un mAb anti- $\alpha 1$ es eficaz para inhibir la puntuación artrítica, y supone un mejor resultado que con el tratamiento terapéutico con un antagonista de TNF.

Ejemplo 14

Clonación y mutagénesis del dominio $\alpha 1$ -I. Las secuencias del dominio I de la integrina $\alpha 1\beta 1$ humana y de rata se amplificaron a partir de ADNc de longitud completa (Kern, *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 22811-22816; Ignatius *et al.* (1990), *J. Cell Biol.*, 111, 709-720) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (kit PCR CORE; Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania), empleando cebadores específicos humanos (5'-CAGGATCCGTCAGCCCCACATTTCAA-3' [directo] (SEQ ID NO:10); 5'-TCCTCGAGGGCTTGCAAGGCAAATAT-3' [inverso] (SEQ ID NO:11)), o específicos de rata (5'-CAGGATCCGTCAGTCCTACATTTCAA-3' [directo] (SEQ ID NO:12); 5'-TCCTCGAGCGCTTCCAAAGCGAATAT-3' [inverso] (SEQ ID NO:13)). Los productos amplificados de la PCR resultantes se purificaron, se acoplaron en pGEX4t-i (Pharmacia) y se transformaron en células DH5 α competentes (Life Technologies). Las colonias resistentes a ampicilina fueron seleccionadas para la expresión de una proteína de fusión del dominio I-glutación-S-transferasa de aproximadamente 45 kDa. Las secuencias de las inserciones del ADN plasmídico de clones que fueron seleccionados para la posterior caracterización fueron confirmadas mediante secuenciación de ADN.

Se generó un dominio $\alpha 1$ -I quimérico de rata/humano (RAH) (kit de mutagénesis MORPH, cebador 5-cebador 3), intercambiando los restos de rata G92, R93, Q94 y L97 (figura 14) por los correspondientes restos humanos, V, Q, R y R, respectivamente. Los clones que portan el dominio I RAH se identificaron por la pérdida de un sitio de enzima de restricción Stu 1 de diagnóstico, y las inserciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN. La secuencia de aminoácidos del dominio $\alpha 1$ -I humano se muestra en la figura 15.

Ejemplo 15

Generación de mAb específicos del dominio $\alpha 1$ -I. Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser sondas muy útiles para estudiar la relación entre estructura y función de la subunidades de integrina. Por ejemplo, se han empleado mucho los mAb para estudiar regiones de la subunidad $\beta 1$ asociadas con una conformación activada (Qu, A., y Leahy, D. J. (1996), *Structure*, 4, 931-942). Así, para identificar sondas potenciales para los cambios conformacionales del dominio $\alpha 1$ -I, los inventores generaron un panel de mAb contra el dominio $\alpha 1$ -I humano.

Generación de anticuerpos monoclonales anti-dominio $\alpha 1$ -I. Ratones Robertsonian hembra (Jackson Labs) fueron inmunizados por vía intraperitoneal (i.p.) con 25 μ g de $\alpha 1\beta 1$ humana purificada (Edwards *et al.* (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 12635-12640) emulsionada con adyuvante de Freund completo (Life Technologies). Fueron reforzados tres veces i.p. con 25 μ g de $\alpha 1\beta 1$ emulsionada en adyuvante de Freund incompleto (Life Technologies). El ratón con la mayor titulación de anti-dominio $\alpha 1$ -I fue reforzado i.p. con 100 μ g de $\alpha 1\beta 1$ tres días antes de la fusión, y por vía intravenosa con 50 μ g de $\alpha 1\beta 1$ un día antes de la fusión. Se fusionaron esplenocitos con células de mieloma FL653 a una proporción de 1:6 y se cultivaron a 100.000 y 33.000 por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos.

Los sobrenadantes se ensayaron para la unión a la integrina $\alpha 1\beta 1$ mediante FACS de un solo color. Antes del análisis de FACS, los sobrenadantes se incubaron con células K562 no transfectadas para eliminar la IgG que solo se une a la subunidad β . Posteriormente, 3-5 $\times 10^4$ células K562 transfectadas con la subunidad de integrina $\alpha 1$ (K562- $\alpha 1$) suspendidas en tampón FACS (suero de ternera fetal (FCS) al 1% en PBS que contenía NaN₃ al 0,5%) se incubaron con el sobrenadante durante 45 minutos a 4 °C, se lavaron y se incubaron con IgG anti-ratón conjugada con ficoeritrina. Después de lavar dos veces con tampón FACS, las células se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson.

Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se seleccionaron para la unión al dominio $\alpha 1$ -I. Bervemente, 50 μ l

de la fusión GST-dominio $\alpha 1$ -I humano 30 $\mu\text{g/ml}$ en PBS se revistieron sobre pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con BSA al 1% en PBS, y el sobrenadante del hibridoma se incubó con el dominio I a temperatura ambiente durante una hora. Después de un lavado extenso con PBS que contenía Tween 20 al 0,03%, se añadió fosfatasa alcalina unida a IgG anti-ratón (Jackson ImmunoResearch) durante una hora más. Después de un lavado final se añadió *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) 1 mg/ml en glicina 0,1 M, ZnCl_2 1 mM, y MgCl_2 1 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente, y las placas se leyeron a D.O. 405.

Se ensayaron sobrenadantes seleccionados para su capacidad para inhibir la adhesión dependiente de K562- $\alpha 1$ al colágeno IV. Células K562- $\alpha 1$ se marcaron con 2',7'-(bis-2-carboxietil-5 y 6)carboxifluorescein-pentaacetoximetil éster 2 mM (BCECF, Molecular Probes) en DMEM que contenía BSA al 0,25% a 37 °C durante 30 minutos. Las células marcadas se lavaron con tampón de unión (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl al 0,9% y glucosa al 2%) y se resuspendieron en tampón de unión más MgCl_2 5 mM a una concentración final de 1×10^6 células/ml. Se incubaron 50 μl del sobrenadante con un volumen igual de 2×10^5 células K562- $\alpha 1$ en los pocillos de una placa de 96 pocillos. La placa después se centrifugó y se retiraron los sobrenadantes. Las células se resuspendieron en tampón de unión y se trasladaron a los pocillos de una placa revestida con colágeno y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, las células no adherentes se retiraron lavando tres veces con tampón de unión. Las células unidas se analizaron en un Cytofluor (Millipore).

Inicialmente se identificaron 19 hibridomas, cuyos sobrenadantes se unen a células K562 de leucemia que expresan la integrina $\alpha 1\beta 1$ (K562- $\alpha 1$) y al dominio $\alpha 1$ -I. Se purificaron las inmunoglobulinas de cada uno de estos hibridomas y se ensayaron para la capacidad de bloquear la unión de K562- $\alpha 1$ o del dominio $\alpha 1$ -I al colágeno IV. Los mAb pertenecen a dos clases: los que bloquean y los que no bloquean la función $\alpha 1\beta 1$. Por ejemplo, aunque los mAb producidos por los clones AEF3, BGC5 y AJH10 se unen al dominio $\alpha 1$ -I (figura 16A, los datos no se muestran para BGC5), solo el mAb AJH10 inhibe la adhesión dependiente del dominio de $\alpha 1$ -I (figura 16B) o de K562- $\alpha 1$ (figura 16C) al colágeno IV.

Secuenciación de las regiones determinantes de la complementariedad. Para establecer el origen clonal de este panel de mAb, los inventores amplificaron mediante PCR y secuenciaron las CDR de 12 de los 19 anticuerpos (los datos no se muestran).

Dos μg de ARNm, aislados a partir de 10^7 hibridomas (kit de aislamiento de ARNm FastTrack, Invitrogen) se sometieron a transcripción inversa (kit Ready-To-Go You Prime First Strand Kit, Pharmacia Biotech) empleando 25 pM de cada uno de los siguientes cebadores: cadena pesada, VH1FOR-2 (Michishita *et al.* (1993), *Cell*, 72, 857-867); cadena ligera, VK4FOR, que define cuatro oligos diferentes (Kern *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 22811-22816). Para cada hibridoma, las cadenas pesada y ligera se amplificaron en cuatro reacciones de PCR distintas empleando diversas combinaciones de los siguientes oligos: 1) Cadena pesada: VH1FR1K (Kamata *et al.* (1995), *J. of Biol. Chem.*, 270, 12531-12535), VH1BACK, VH1BACK (Baldwin *et al.* (1998), *Structure*, 6, 923-935), V_{Hfr1a} , V_{Hfr1b} , V_{Hfr1e} , V_{Hfr1f} , V_{Hfr1g} (Ignatius *et al.* (1990), *J. Cell Biol.*, 111, 709-720), o VH1FOR-2 (Michishita, M., Videm, V., y Arnaut, M. A. (1993), *Cell*, 72, 857-867); 2) Cadena ligera: VK1BACK (Baldwin *et al.* (1998), *Structure*, 6, 923-935), VK4FOR, oligos VK2BACK (Kern *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 22811-22816), o V_{Kfr1a} , V_{Hfr1c} , V_{Hfr1e} , V_{Hfr1f} (Ignatius *et al.* (1990), *J. Cell Biol.*, 111, 709-720). Los productos se amplificaron (5 min a 95 °C, 50 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 55 °C, 2 min a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C), se purificaron en gel (QIAquick, Qiagen), y se secuenciaron directamente empleando varios de los oligos listados en un secuenciador ABI 377.

Las secuencias de los clones que producen mAb bloqueantes de la función fueron casi idénticas a lo largo de todas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones marco intermedias, lo cual sugiere que estos hibridomas están clonalmente relacionados.

Ejemplo 16

Inmunotransferencia y análisis FACS. Las secuencias de las regiones variables de los anticuerpos no bloqueantes son muy diferentes de la familia de secuencias clonalmente relacionadas que se encuentran en los anticuerpos bloqueantes. Puesto que los anticuerpos bloqueantes parecen originarse a partir de un único clon, los inventores escogieron uno (AJH10) para su posterior caracterización.

Inmunotransferencia. Una capa de células del músculo liso diseccionada de aorta de oveja y células K562- $\alpha 1$ fueron extraídas con Triton X-100 al 1% en Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10 mM, aprotinina 20 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM. Las muestras se sometieron a un gradiente de SDS-PAGE al 4-20%, y se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Las transferencias se bloquearon con leche en polvo al 5% en TBS, se lavaron en TBS que contenía Tween-20 al 0,03% y se incubaron con anticuerpos en tampón de bloqueo que contenía NaN_3 al 0,05% durante 2 horas. Las transferencias después se lavaron como antes, se incubaron con IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano durante una hora, se volvieron a lavar y después se trataron con reactivo ECL (Amersham). Después las transferencias se expusieron a una película (Kodak) durante 30 a 60 segundos, y se revelaron.

La inmunotransferencia (figura 17A) y los análisis FACS (figura 17B) demostraron que AJH10 reacciona con la

integrina $\alpha 1\beta 1$ humana, de conejo y de oveja, pero no de rata, lo cual sugiere que los mAb bloqueantes se unen a un epítipo lineal conservado evolutivamente. Los mAb no bloqueantes no son eficaces en la inmunotransferencia ni reaccionan con especies diferentes a la especie humana.

Ejemplo 17

5 La unión del dominio $\alpha 1$ -I al colágeno depende de cationes divalentes

A. Purificación de los dominios $\alpha 1$ -I.

Los dominios $\alpha 1$ -I fueron expresados en *E. coli* como proteínas de fusión de GST (glutación-S-transferasa) que contienen un sitio de ruptura de trombina en la unión de las secuencias. El sobrenadante aclarado de las células lisadas en PBS se cargó sobre una columna de glutatión-Sepharose 4B (Pharmacia) que se lavó a fondo con PBS. La proteína de fusión del dominio $\alpha 1$ -I-GST eluyó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, glutatión (reducido) 5 mM. Para los estudios de desnaturalización, el dominio I se rompió con trombina en Tris 50 mM, pH 7,5, y se purificó del compañero de fusión GST. Se añadió DTT a 2 mM y la muestra se cargó sobre una columna de glutatión-Sepharose 4B. La corriente y las fracciones de lavado se reunieron y se cargaron en una columna Q Sepharose FF (Pharmacia). El dominio $\alpha 1$ -I eluyó con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 2-mercaptoetanol 10 mM, NaCl 75 mM. El dominio I purificado muestra su masa predicha (Lee *et al.* (1995), *Structure*, 3, 1333-1340, 871 Da) mediante una ionización de electropulverización-espectrometría de masas (ESI-MS), migra como una única banda mediante SDS-PAGE, y la proteína eluye como un único pico con el tamaño apropiado mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superose 6 FPLC (Pharmacia).

B. Análisis funcional.

Se revistieron a 4 °C durante la noche placas de 96 pocillos con colágeno IV 1 μ g/ml (Sigma) o colágeno de tipo I (Collaborative Biomedical), se lavaron con tampón Triton (Triton X-100 al 0,1%, MnCl_2 1 mM, Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM) y se bloquearon con albúmina de suero bovina (BSA) al 3% en Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM (TBS). Unas diluciones en serie de la proteína de fusión del dominio $\alpha 1$ -I-GST en TBS que contenía MnCl_2 1 mM y BSA al 3% se incubaron en las placas revestidas a temperatura ambiente durante 1 hora, y se lavaron en tampón Triton. Se detectó el dominio $\alpha 1$ -I unido con adiciones en serie de anticuerpo policlonal anti-GST biotinilado 10 μ g/ml (Pharmacia), ExtrAvidin-peroxidasa de rábano (Sigma) diluido 1:3000 en TBS que contenía MnCl_2 1 mM y BAS al 3%, y 1-Step ABTS (2,2'-azina-di[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina], Pierce). Las placas se leyeron a D.O. 405 en un lector de microplacas (Molecular Devices).

Resultados:

Los dominios $\alpha 1$ -I humano y de rata (95% de identidad con el humano) se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión con GST y se purificaron en glutatión-Sepharose. Ambas proteínas se estudiaron para la unión al colágeno I y IV empleando una variación de un ensayo basado en ELISA previamente descrito (Qu, A., y Leahy, D. J. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10277-10281). El dominio $\alpha 1$ -I humano se une al colágeno IV con mejor eficacia que al colágeno I (figura 18A). Un anticuerpo específico para el dominio $\alpha 1$ -I, pero no un anticuerpo específico para el dominio $\alpha 2$ -I (figura 18b) aboga la unión de ambos ligandos (los datos para el colágeno I no se muestran). Tanto Mn^{2+} como Mg^{2+} estimulan la unión, y EDTA reduce la unión a niveles de fondo (figura 18C). No se detectaron diferencias mensurables entre los dominios $\alpha 1$ -I humano y de rata, lo cual sugiere que las diferencias de secuencia entre las especies no son importantes desde el punto de vista funcional (los datos no se muestran). Así, el dominio $\alpha 1$ -I, específicamente, requiere cationes para una unión eficaz al ligando.

40 Ejemplo 18

Un epítipo dependiente de cationes reside cerca del motivo MIDAS. Los inventores han aprovechado la observación de que AJH10 reconoce las secuencias del dominio $\alpha 1$ -I humano, pero no de rata, para cartografiar el epítipo para los mAb bloqueantes de la función $\alpha 1\beta 1$. Las secuencias humana y de rata se diferencian solo en 12 aminoácidos, 4 de los cuales se encuentran en un tramo de 6 aminoácidos (aa 92-97, figura 14A), adyacentes a la treonina crítica (figura 14A, aa 98) dentro del motivo MIDAS. Para ensayar la hipótesis de que los 6 restos aminoácidos, Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg, comprenden el epítipo para los mAb bloqueantes, los inventores construyeron un dominio I quimérico (R Δ H), intercambiando los restos de rata G91, R92, Q93 y L96 por los correspondientes restos humanos, V, Q, R y R, respectivamente. AJH10, junto con todos los mAb bloqueantes de la función, reconoce el dominio I quimérico (R Δ H, figura 14B).

Para orientar a estos restos con respecto al dominio MIDAS en la estructura terciaria del dominio $\alpha 1$ -I, los inventores realizaron un modelo del dominio $\alpha 1$ -I empleando las coordenadas de la estructura cristalina del dominio $\alpha 2$ -I.

Se construyó un modelo de homología del dominio $\alpha 1$ -I humano empleando la estructura cristalina de rayos X del dominio $\alpha 2$ -I humano (Ward *et al.* (1989), *Nature*, 341, 544-546). El modelo se construyó empleando el módulo de formación de modelos de homología de Insight II (versión 2.3.5; Biosym Technologies). Se empleó el programa CHARMM (Clackson *et al.* (1991), *Nature*, 352, 624-628) con el parámetro de todo hidrógeno ajustado a 22 con una

5 constante dieléctrica dependiente de la distancia de dos veces la distancia de separación de los átomos. En primer lugar se realizaron 1000 etapas de una minimización descendiente con la máxima pendiente con restricciones posicionales armónicas ponderadas de 1 kcal/(mol Å²) en todos los átomos del dominio α 1-I. A esta minimización le siguieron otras 1000 etapas del descenso con la máxima pendiente y 5000 etapas de Adopted-Basis Newton Raphson con restricciones de 1 kcal/(mol Å²) en los átomos de C- α del dominio α 1-I para evitar desviaciones significativas de la estructura cristalina de rayos X del dominio α 2-I.

10 Las secuencias de integrina α 1 β 1 y α 2 β 1 muestran 51% de identidad sin inserciones ni deleciones, lo cual sugiere que la estructura global de los dos dominios I debe ser similar. Se predice que el sitio de coordinación del metal es el mismo en el dominio α 1-I que en el dominio α 2-I, y los restos que comprenden el epitopo para los mAb bloqueantes se encuentran en un bucle entre la hélice α 3 y la hélice α 4 que contiene la treonina dentro del motivo MIDAS que es crítica para la unión de los cationes. El modelo del dominio α 1-I predice que el nitrógeno de amida de Q92 (figura 14A) se unirá con enlaces de hidrógeno al grupo carbonilo de I33, el resto adyacente a S32. Por tanto, el bucle que contiene el epitopo puede desempeñar un papel funcional en la estabilización de la región MIDAS.

Listado de secuencias

<110> Biogen, Inc. SEQUENCE LISTING De Fougerolles, Antonin Gotwals, Philip Lobb, Roy Koteliensky, Victor

5 <120> Método para el tratamiento de trastornos inflamatorios

<130> A076PCT

<140> PCT/US00/15004

10 <141> 2000-06-01

<150> 60/185336

<151> 2000-02-29

15 <150> 60/137038

<151> 1999-06-01

<160> 9

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

25 <213> Homo Sapiens

<400> 1

caggatccgt cagccccaca tttcaa
26

30

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

35

<400> 2

tcctcgaggg cttgcagggc aaatat
26

40

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> rata

45

<400> 3

caggatccgt cagtccctaca tttcaa
26

50

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> rata

<400> 4

55

tcctcgagcg cttccaaagc gaatat
26

60

<210> 5

<211> 212

<212> PRT

<213> rata

<400> 5

```

Val Ser Pro Thr Phe Gln Val Val Asn Ser Phe Ala Pro Val Gln Glu
1      5      10      15
Cys Ser Thr Gln Leu Asp Ile Val Ile Val Leu Asp Gly Ser Asn Ser
20      25      30
Ile Tyr Pro Trp Glu Ser Val Ile Ala Phe Leu Asn Asp Leu Leu Lys
35      40      45
Arg Met Asp Ile Gly Pro Lys Gln Thr Gln Val Gly Ile Val Gln Tyr
50      55      60
Gly Glu Asn Val Thr His Glu Phe Asn Leu Asn Lys Tyr Ser Ser Thr
65      70      75      80
Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Lys Lys Ile Gly Arg Gln Gly Gly Leu
85      90      95
Gln Thr Met Thr Ala Leu Gly Ile Asp Thr Ala Arg Lys Glu Ala Phe
100      105      110
Thr Glu Arg Ala Arg Arg Gly Val Lys Lys Val Met Val Ile Val Thr
115      120      125
Asp Gly Glu Ser His Asp Asn Tyr Arg Leu Lys Gln Val Ile Gln Asp
130      135      140
Cys Glu Asp Glu Asn Ile Gln Arg Phe Ser Ile Ala Ile Leu Gly His
145      150      155      160
Tyr Asn Arg Gly Asn Leu Ser Thr Glu Lys Phe Val Glu Glu Ile Lys
165      170      175
Ser Ile Ala Ser Glu Pro Thr Glu Lys His Phe Phe Asn Val Ser Asp
180      185      190
Glu Leu Ala Leu Val Thr Ile Val Lys Ala Leu Gly Glu Arg Ile Phe
195      200      205
Ala Leu Glu Ala
210

```

5 <210> 6
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <400> 6

```

Val Ser Pro Thr Phe Gln Val Val Asn Ser Ile Ala Pro Val Gln Glu
1      5      10      15
Cys Ser Thr Gln Leu Asp Ile Val Ile Val Leu Asp Gly Ser Asn Ser
20      25      30
Ile Tyr Pro Trp Asp Ser Val Thr Ala Phe Leu Asn Asp Leu Leu Lys
35      40      45
Arg Met Asp Ile Gly Pro Lys Gln Thr Gln Val Gly Ile Val Gln Tyr
50      55      60
Gly Glu Asn Val Thr His Glu Phe Asn Leu Asn Lys Tyr Ser Ser Thr
65      70      75      80
Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Lys Lys Ile Val Gln Arg Gly Gly Arg
85      90      95
Gln Thr Met Thr Ala Leu Gly Thr Asp Thr Ala Arg Lys Glu Ala Phe
100      105      110
Thr Glu Arg Ala Arg Arg Gly Val Lys Lys Val Met Val Ile Val Thr
115      120      125
Asp Gly Glu Ser His Asp Asn His Arg Leu Lys Lys Val Ile Gln Asp
130      135      140
Cys Glu Asp Glu Asn Ile Gln Arg Phe Ser Ile Ala Ile Leu Gly Ser
145      150      155      160
Tyr Asn Arg Gly Asn Leu Ser Thr Glu Lys Phe Val Glu Glu Ile Lys
165      170      175
Ser Ile Ala Ser Glu Pro Thr Glu Lys His Phe Phe Asn Val Ser Asp
180      185      190
Glu Leu Ala Leu Val Thr Ile Val Lys Thr Leu Gly Glu Arg Ile Phe
195      200      205
Ala Leu Glu Ala
210

```

15 <210> 7
 <211> 6

```

<212> PRT
<213> rata

<400> 7
5      Gly Arg Gln Gly Gly Leu
      1          5

<210> 8
<211> 6
10     <212> PRT
      <213> Homo Sapiens

<400> 8

15     Val Gln Arg Gly Gly Arg
      1          5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
20     <213> Homo Sapiens

<400> 9

25     Val Gln Arg Gly Gly Arg
      1          5

```

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo o un fragmento de dicho anticuerpo, capaz de 1) unirse a un dominio $\alpha 1$ -I de VLA-1, y 2) capaz de inhibir la adhesión dependiente de K562- $\alpha 1$ al colágeno IV, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio en una enfermedad vascular en un sujeto.
- 5 2.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad vascular es la aterosclerosis.
- 3.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es monoclonal, policlonal, humano, humanizado o quimérico.
- 10 4.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto es un ser humano.
- 5.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un epitopo que comprende los restos aminoácidos Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NO:8).
- 15 6.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un epitopo que consiste en los restos aminoácidos Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NO:8).
- 7.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es monoclonal.
- 20 8.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo está humanizado.
- 9.- El fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, F(ab')₂ o F(v).
- 10.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es para la administración parenteral.
- 25 11.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es para la administración por vía oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, o tópica.
- 12.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es para la administración al sujeto:
- 30 a) a intervalos de cada día a 14 días en una cantidad de 0,1 mg/kg/día a 20 mg/kg/día, o de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día;
- b) de 0,3 mg/kg/día a 1 mg/kg/día cuando se administra IP; o
- c) de 5 mg/kg/día a 12,5 mg/kg/día cuando se administra IV.
- 35 13.- Un anticuerpo o un fragmento de dicho anticuerpo, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es capaz de unirse a un dominio R Δ H, y dicho dominio R Δ H presenta la secuencia de aminoácidos de un dominio $\alpha 1$ -I de rata, en el que los restos de rata G91, R92, Q93 y L96 se reemplazan por los restos V, Q, R, y R, respectivamente, y es capaz de unirse al dominio $\alpha 1$ -I humano de VLA- 1 pero no al dominio $\alpha 1$ -I de rata, en el que el dominio $\alpha 1$ -I humano presenta la secuencia de aminoácidos Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg (SEQ ID NO:8) en los restos 91-96, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio en una enfermedad vascular en un sujeto.
- 40 14.- El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para el uso de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un epitopo dependiente de cationes de VLA-1.

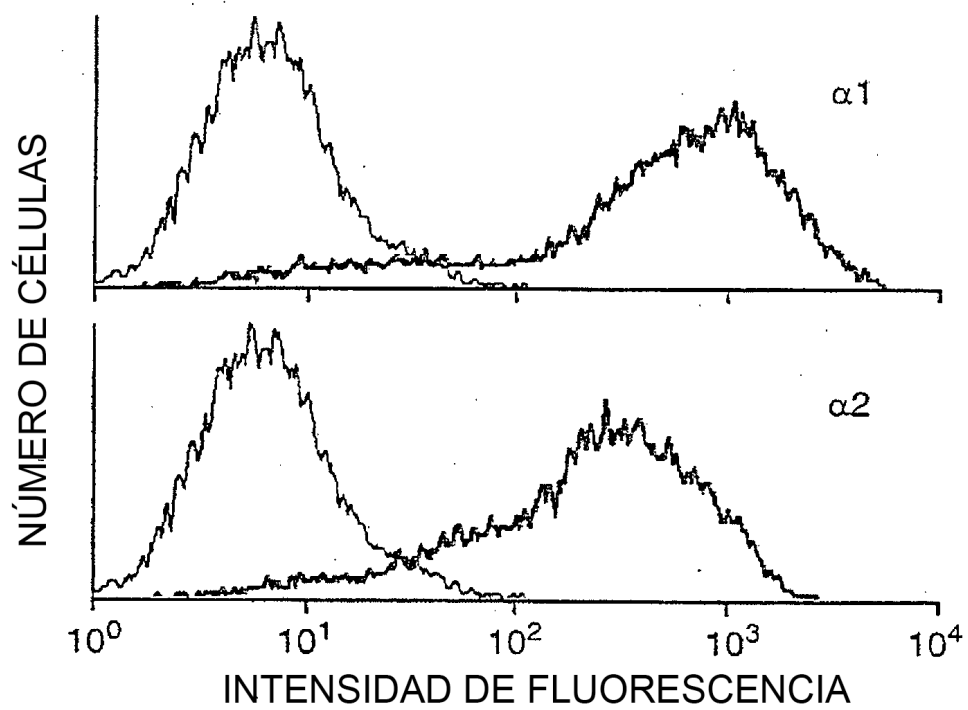


FIG. 1A

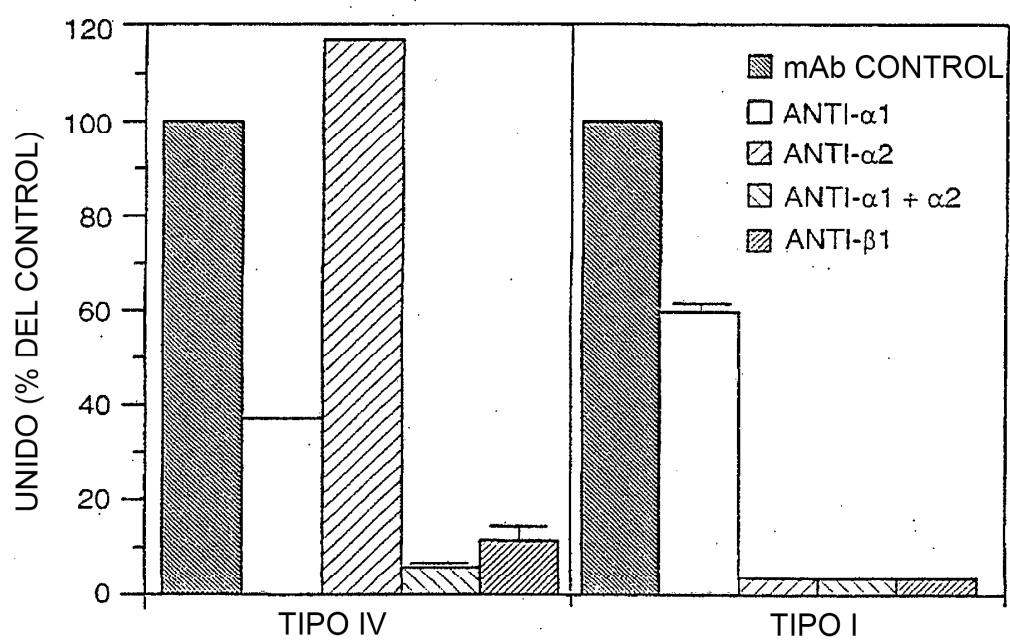


FIG. 1B

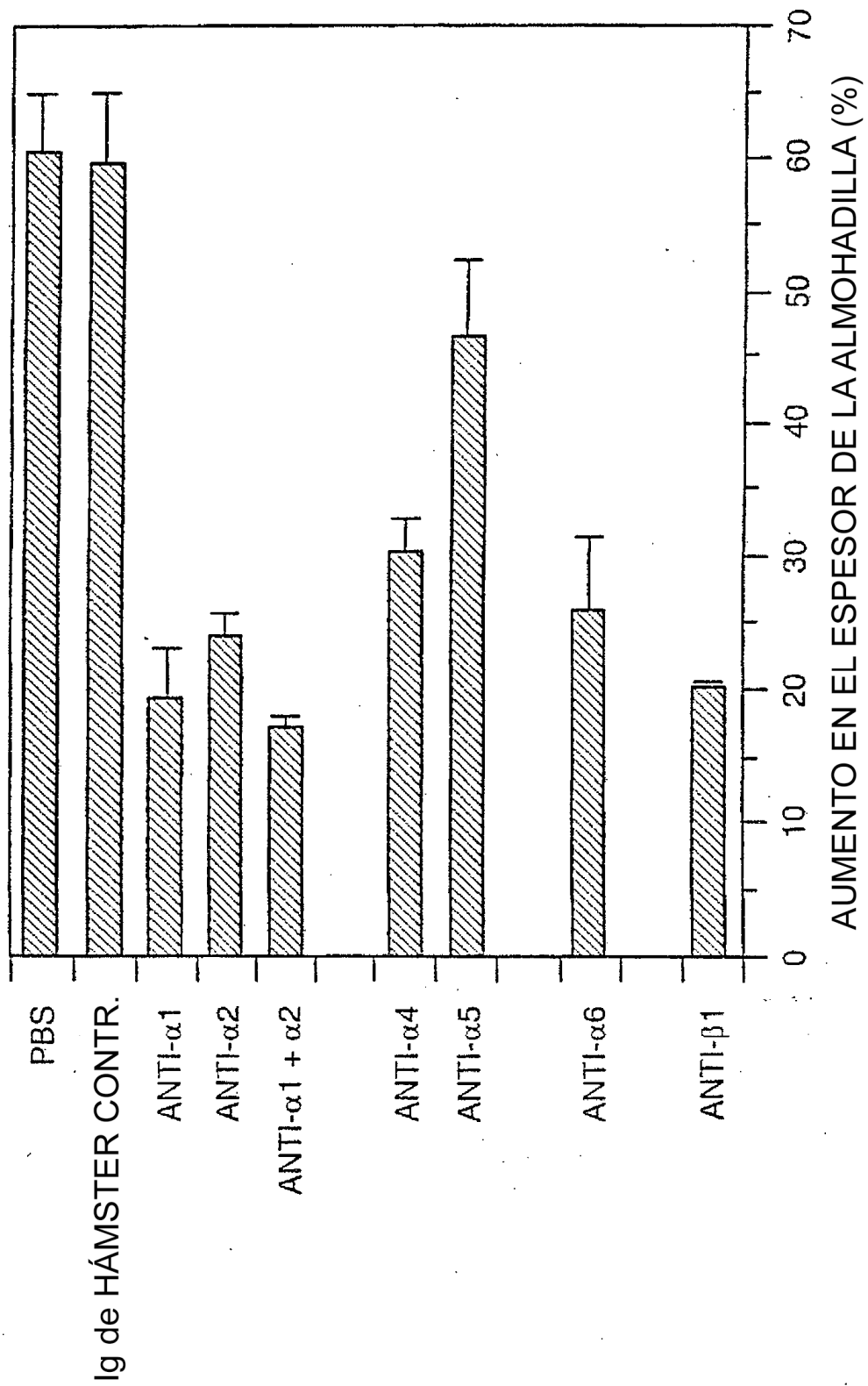


FIG. 2

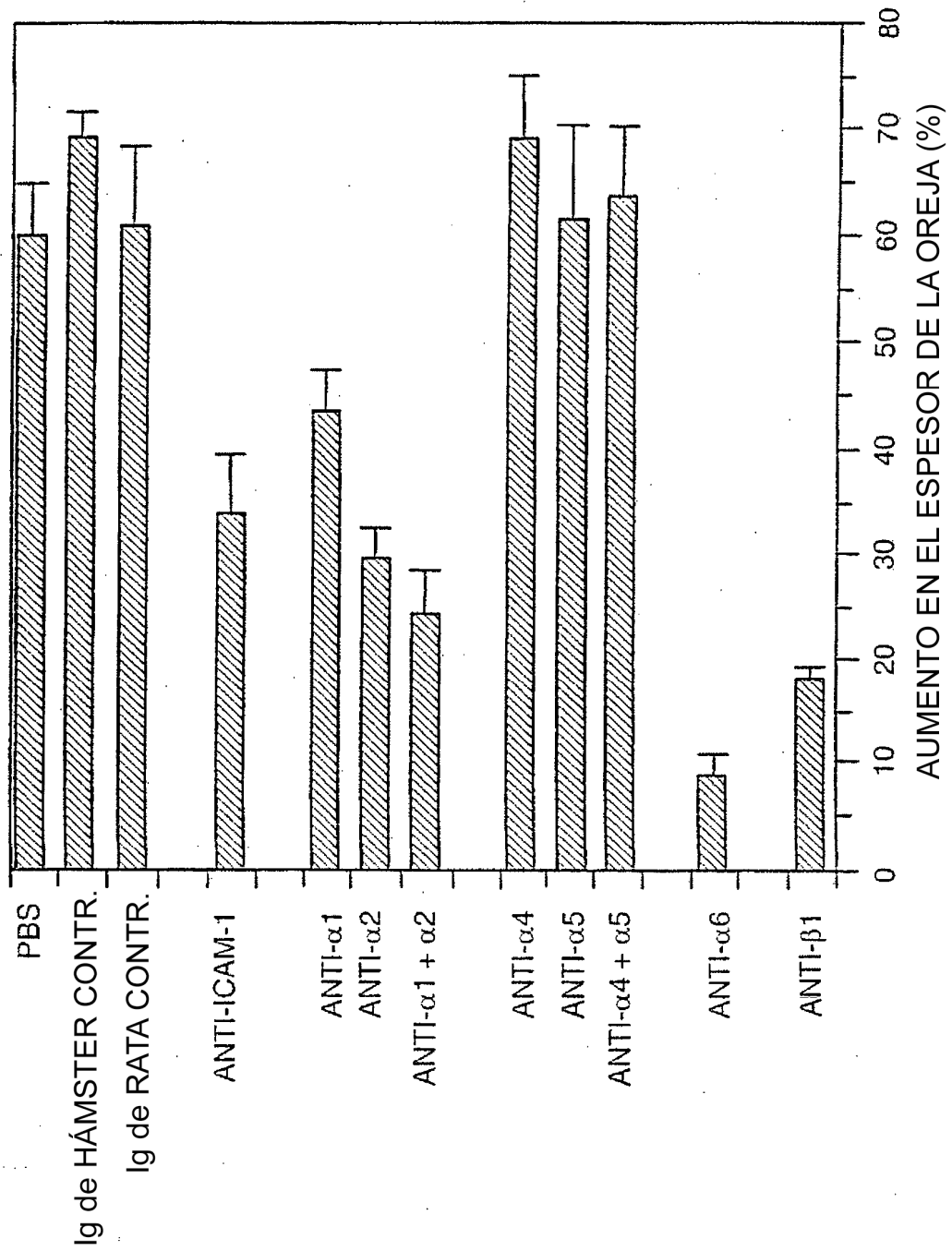


FIG. 3

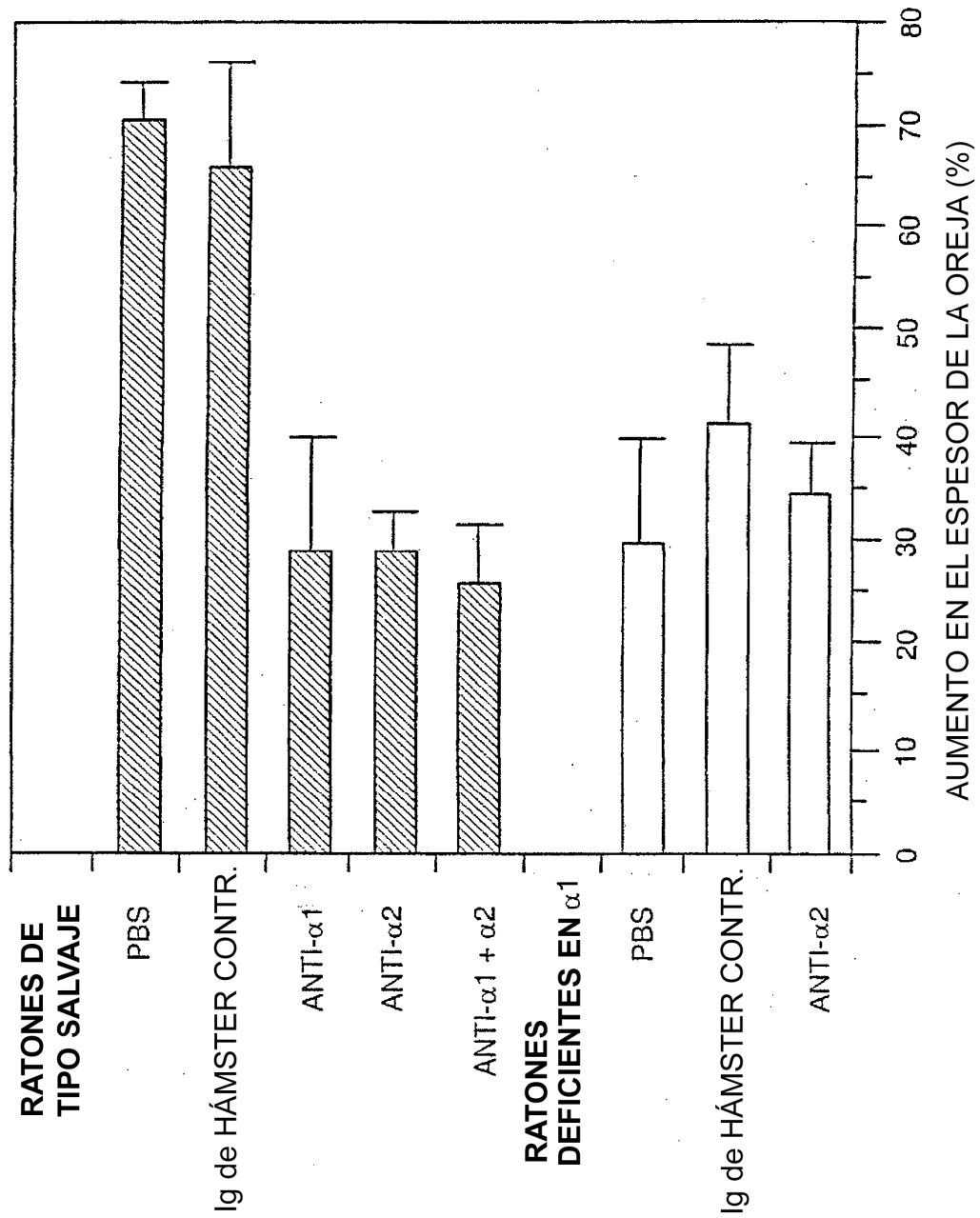


FIG. 4

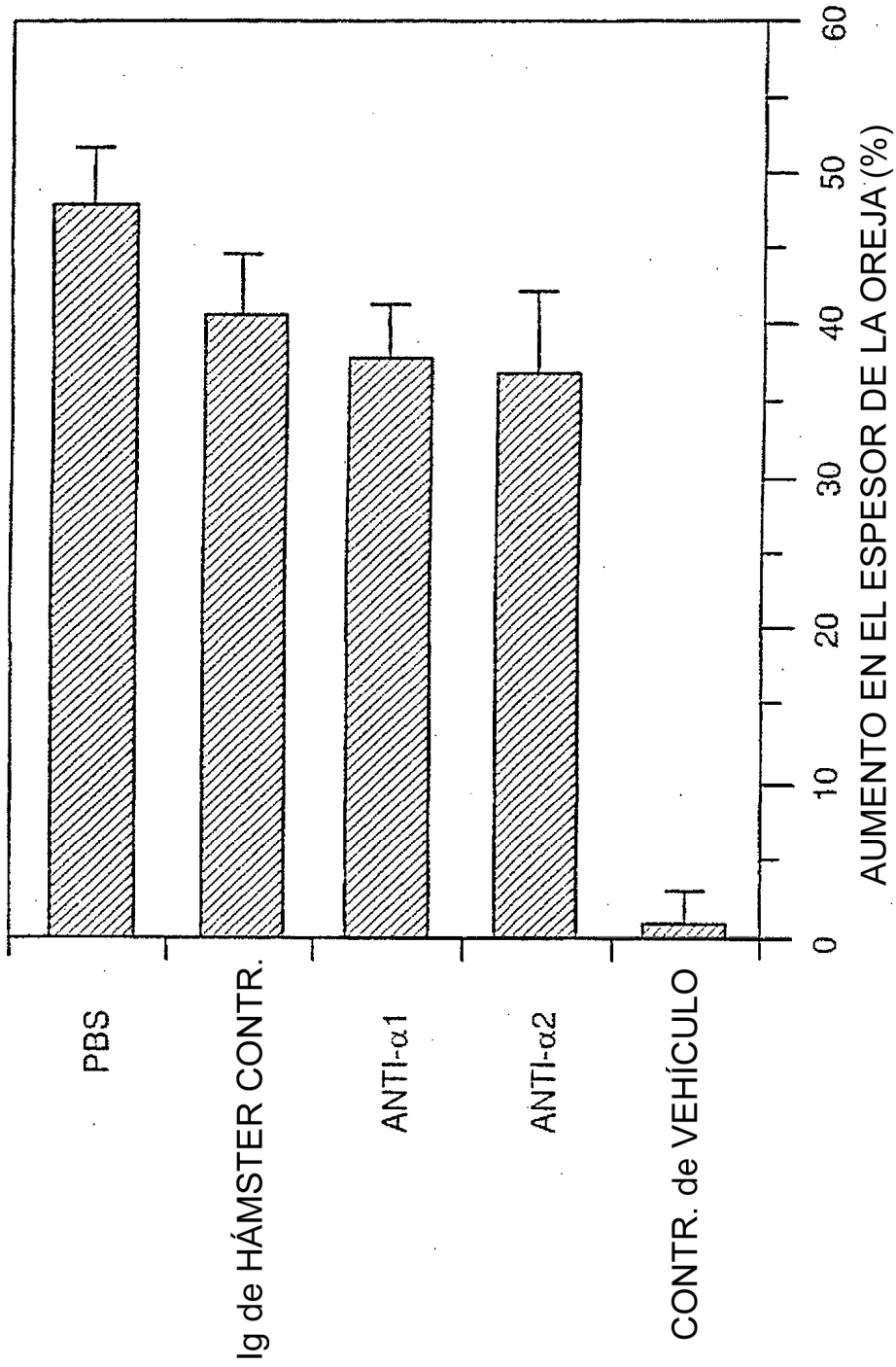
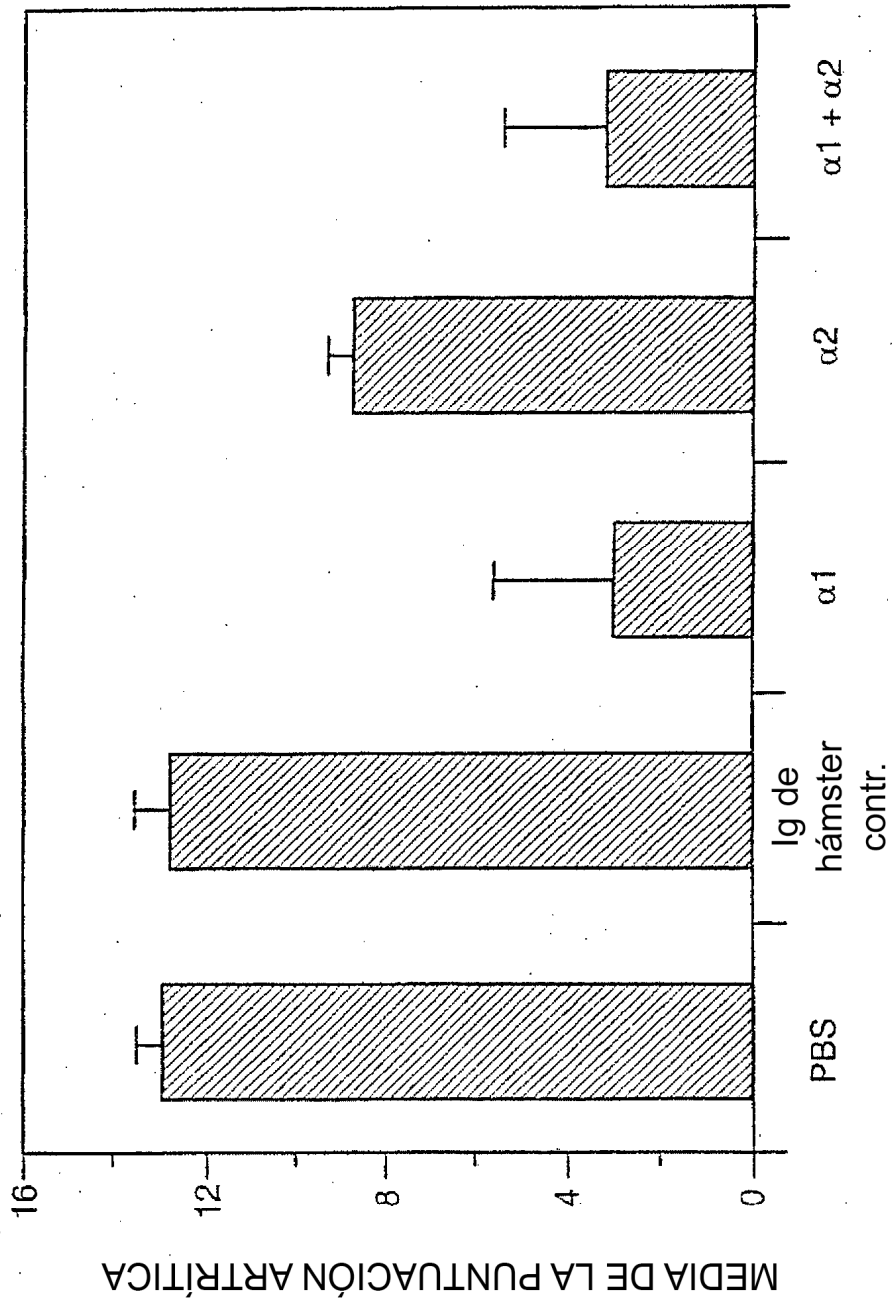


FIG. 5



TRATAMIENTO con mAb

FIG. 6

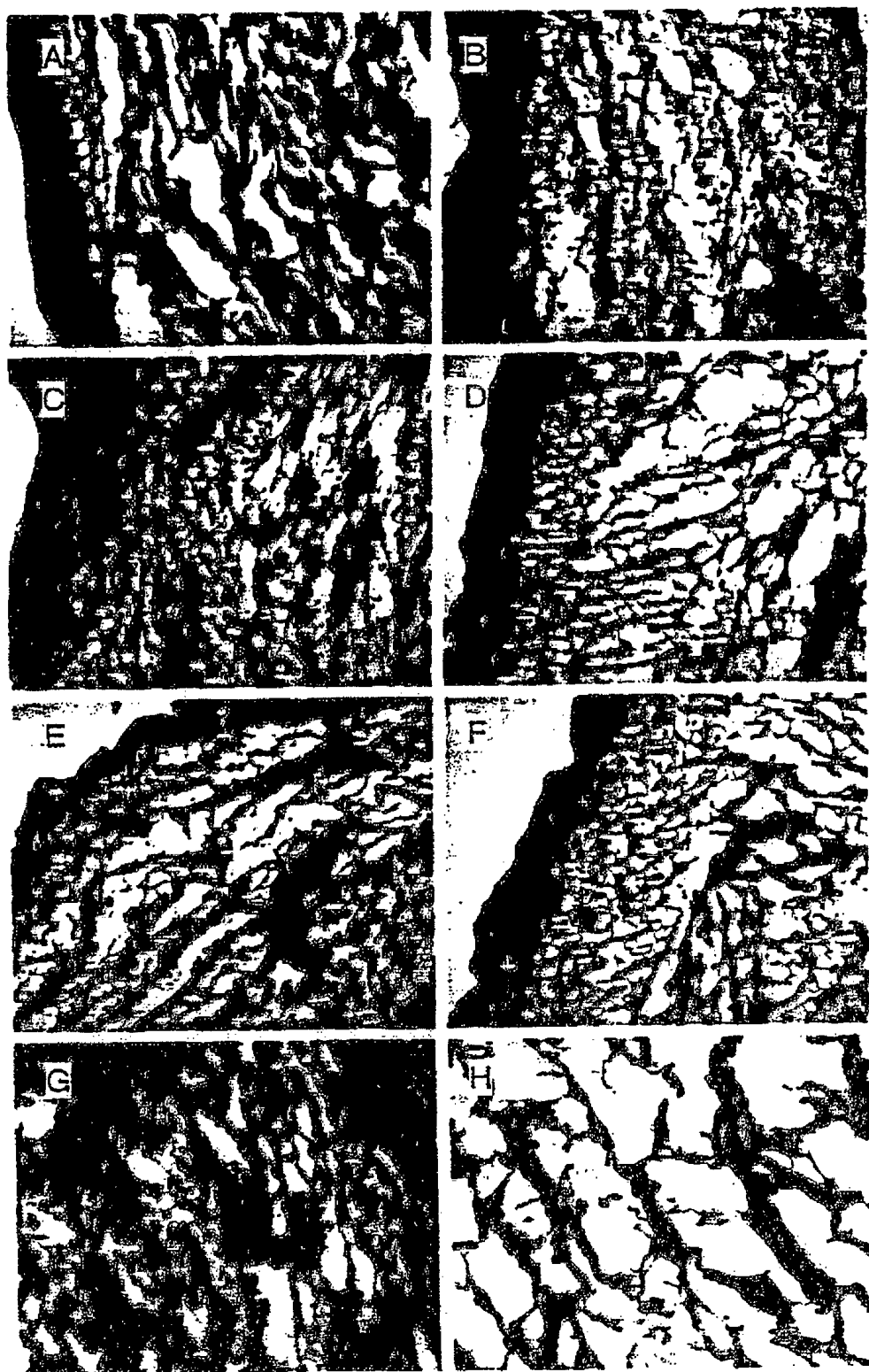


FIG. 7

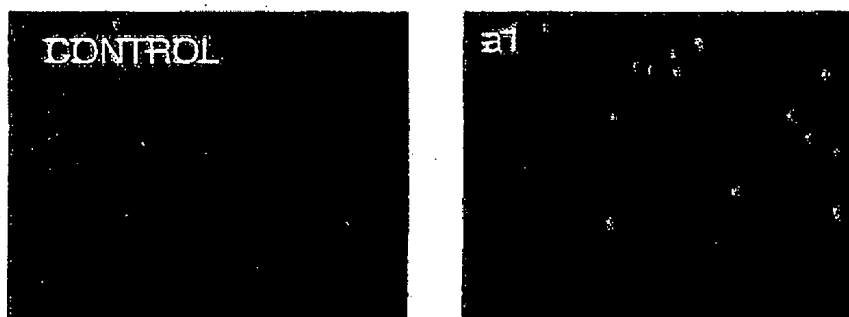


FIG. 8A

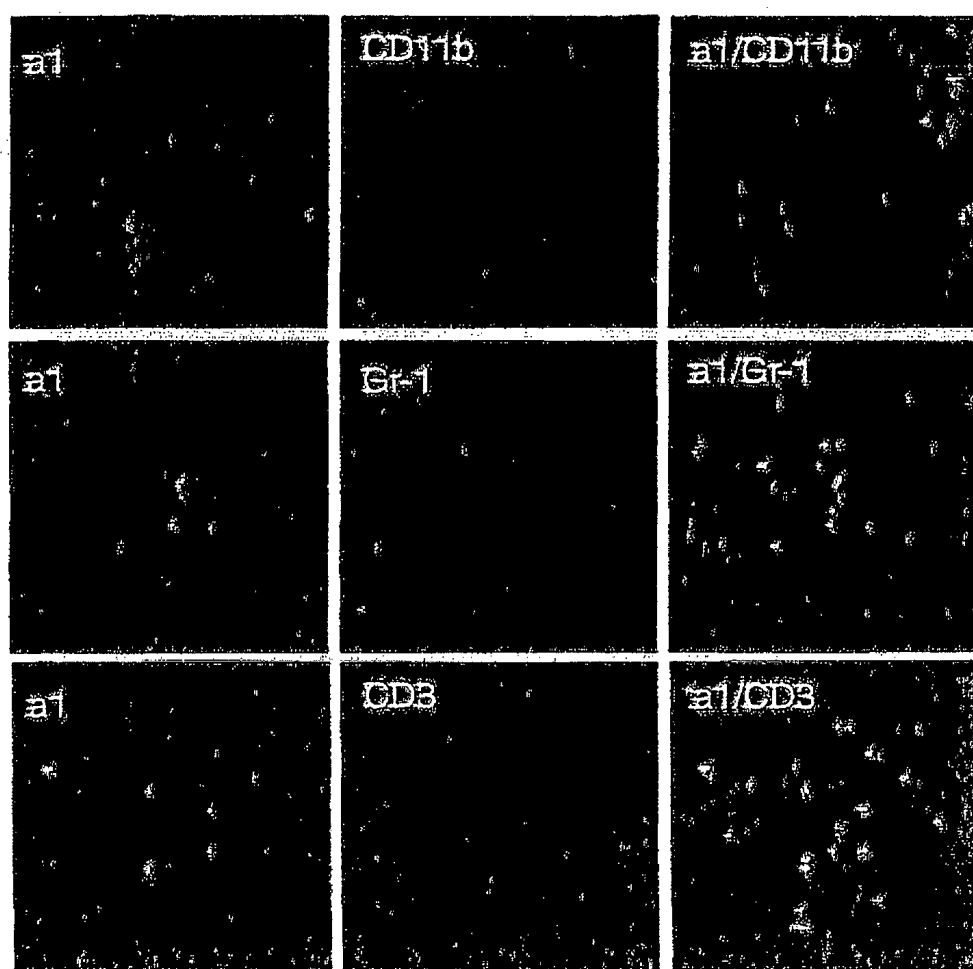


FIG. 8B

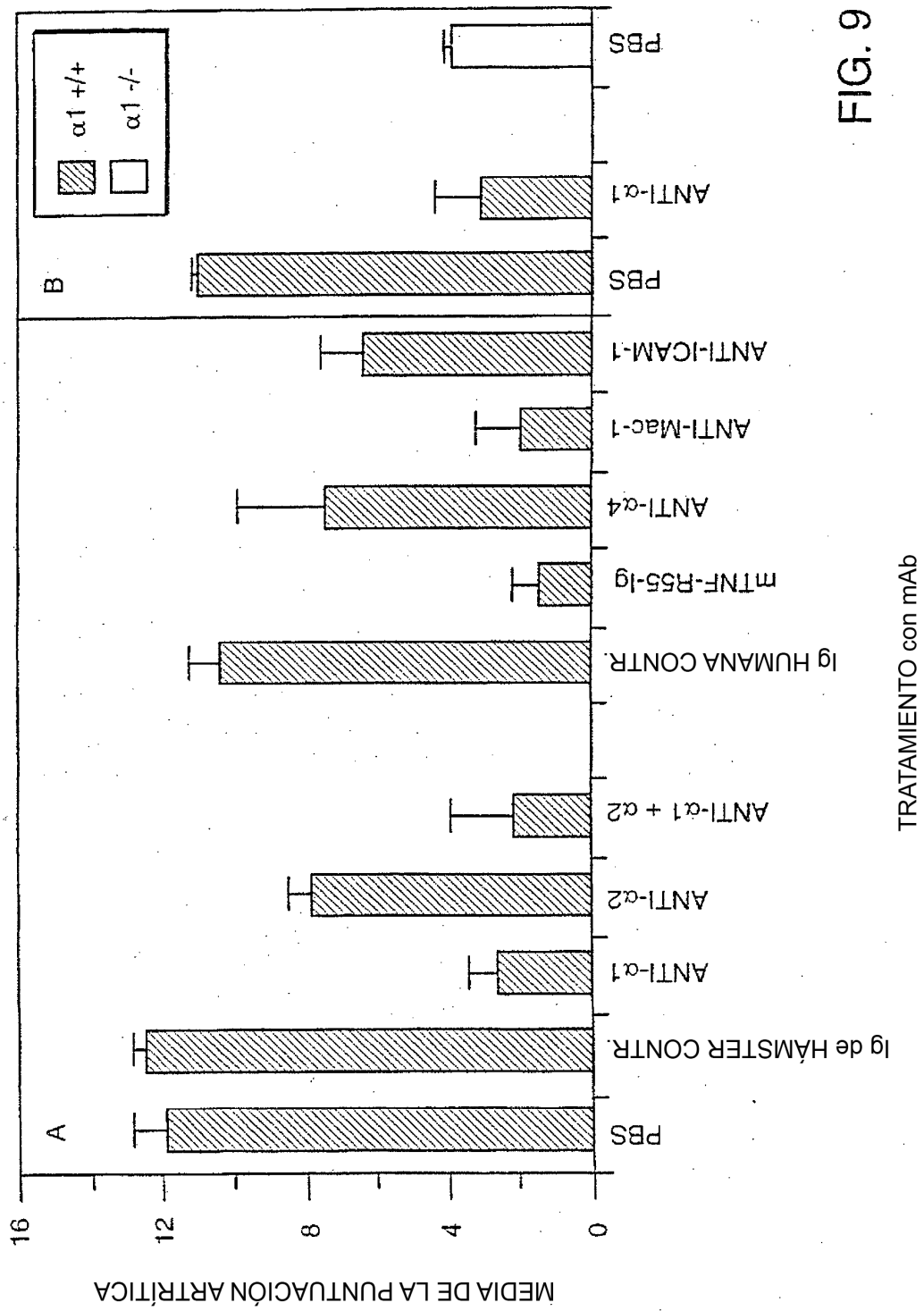


FIG. 9



FIG. 10

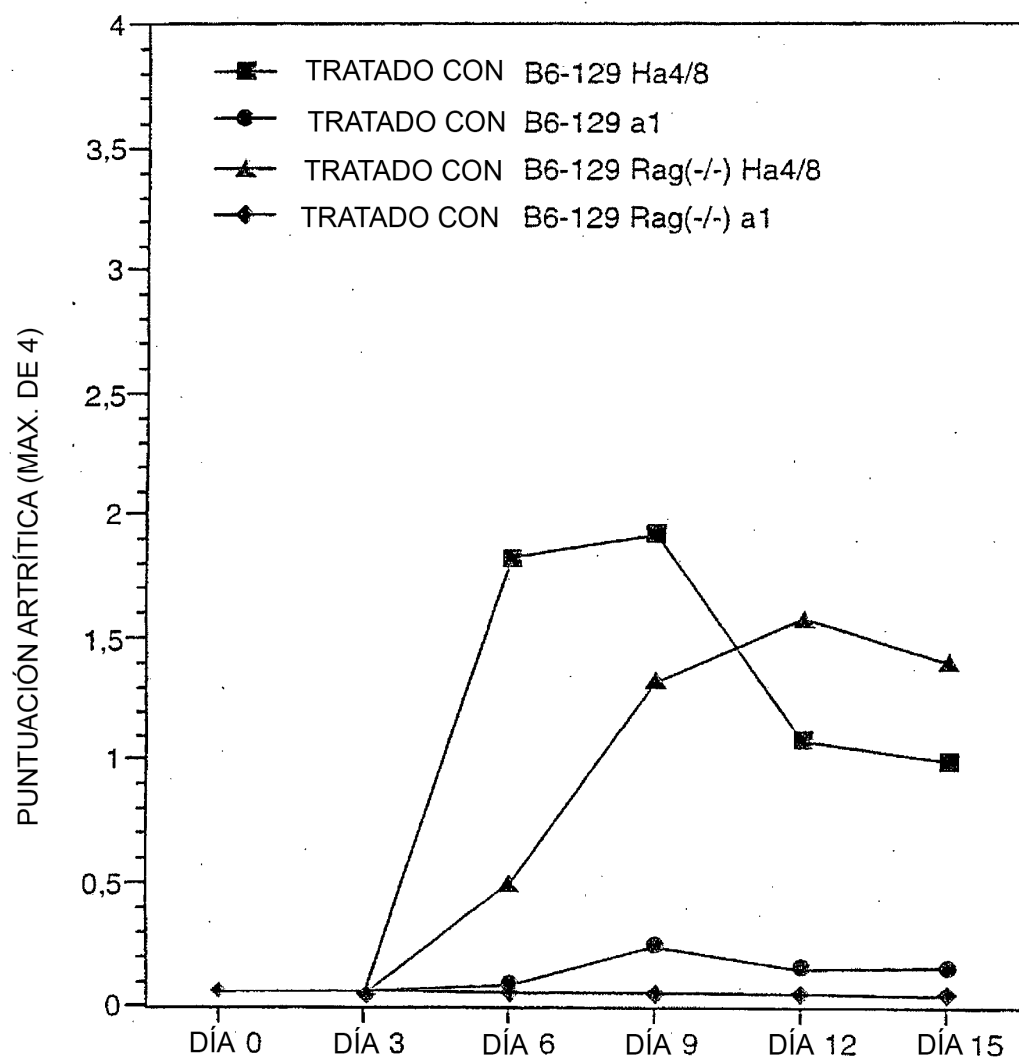


FIG. 11

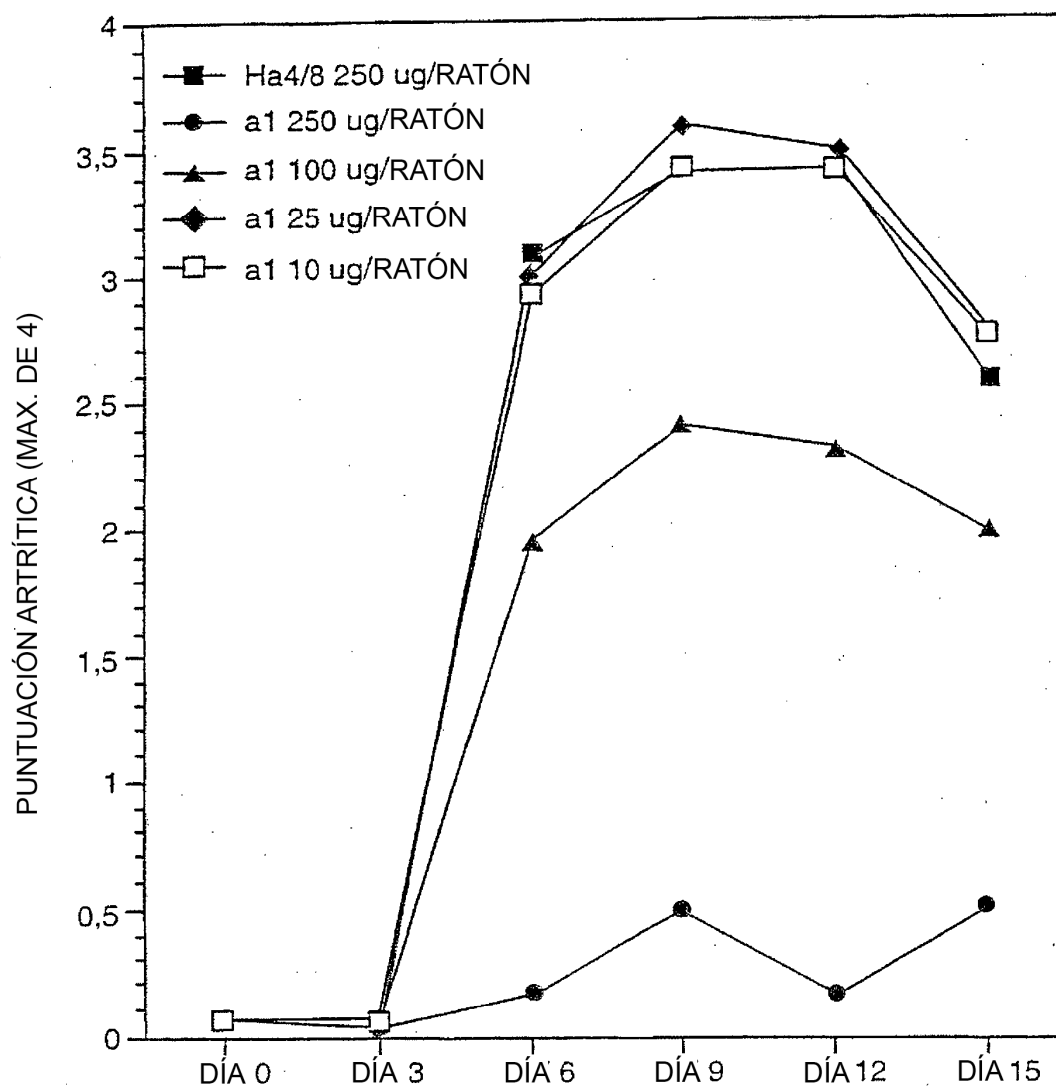


FIG. 12

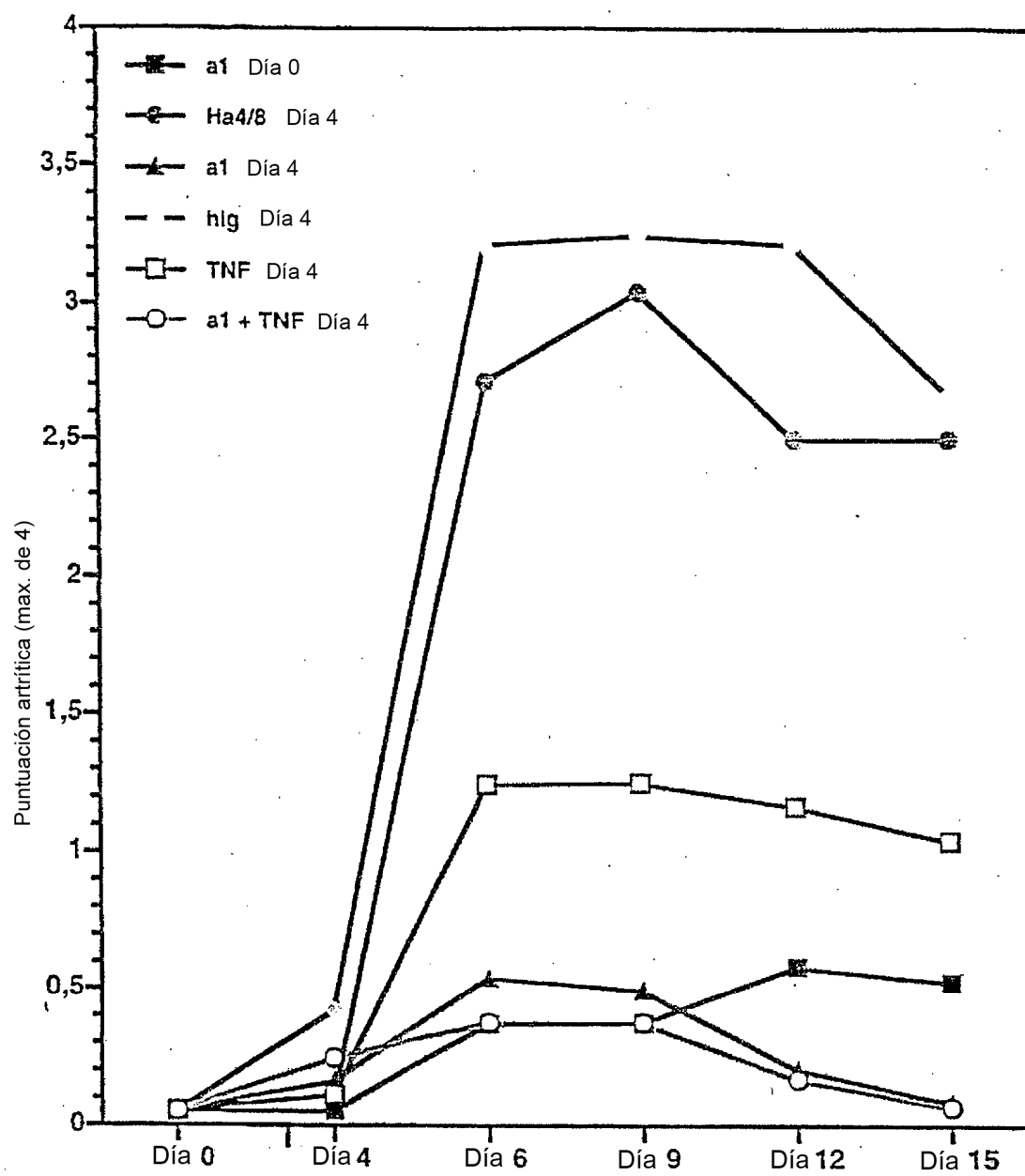


FIGURA 13

```

1  V S P T F Q V V N S F A P V Q E C S T Q
21 L D I V I V L D G S N S I Y P W E S V I
41 A F L N D L L K R M D I G P K Q T Q V G
61 I V Q Y G E N V T H E F N L N K Y S S T
81 E E V L V A A K K I G R Q G G L Q T M T
101 A L G I D T A R K E A F T E A R G A R R
121 G V K K V M V I V T D G E S H D N Y R L
141 K Q V I Q D C E D E N I Q R F S I A I L
161 G H Y N R G N L S T E K F V E E I K S I
181 A S E P T E K H F F N V S D E L A L V T
201 I V K A L G E R I F A L E A

```

FIG. 14A

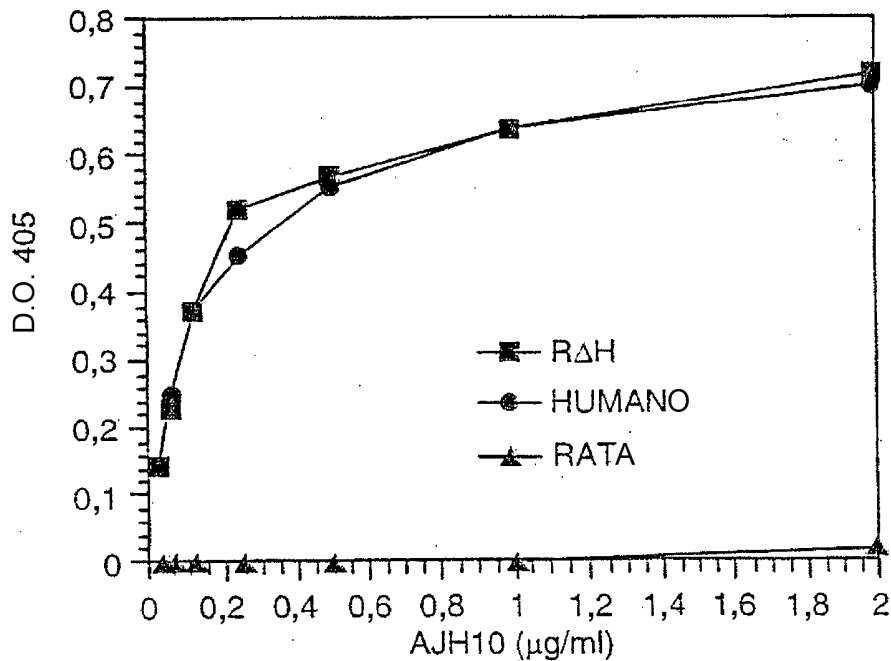


FIG. 14B

1 V S P T F Q V V N S I A P V Q E C S T Q
 21 L D I V I V L D G S N S I Y P W D S V T
 41 A F L N D L L K R M D I G P K Q T Q V G
 61 I V Q Y G E N V T H E F N L N K Y S S T
 81 E E V L V A A K K I V Q R G G R Q T M T
 101 A L G T D T A R K E A F T E A R G A R R
 121 G V K K V M V I V T D G E S H D N H R L
 141 K K V I Q D C E D E N I Q R F S I A I L
 161 G S Y N R G N L S T E K F V E E I K S I
 181 A S E P T E K H F F N V S D E L A L V T
 201 I V K T L G E R I F A L E A

FIG. 15

FIG. 16A

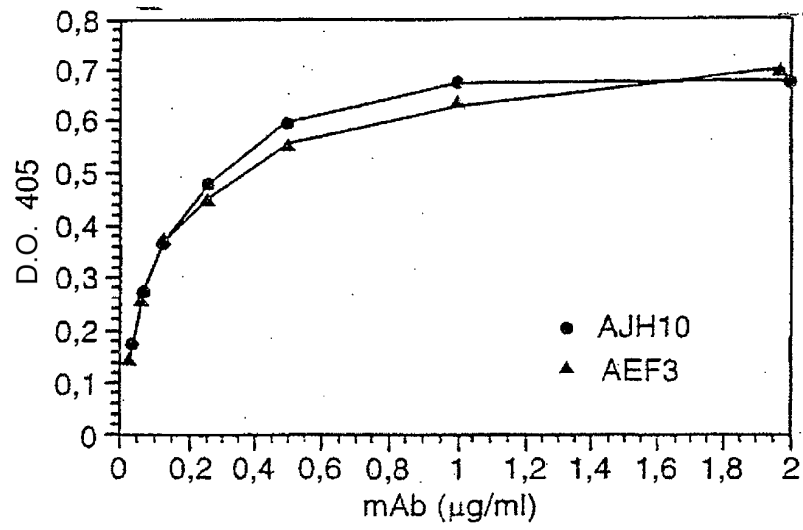


FIG. 16B

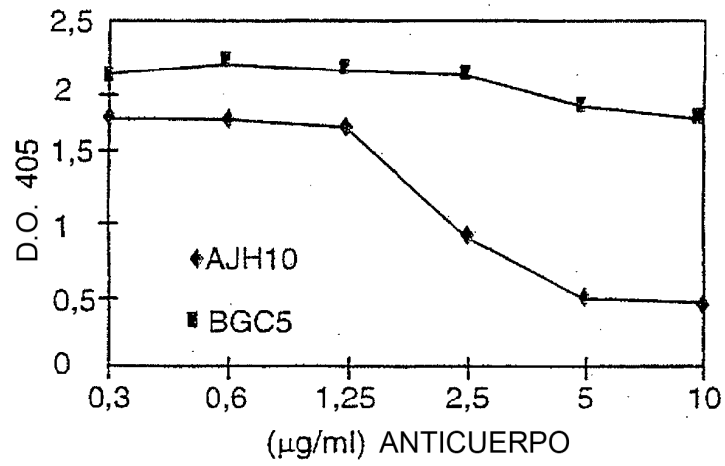
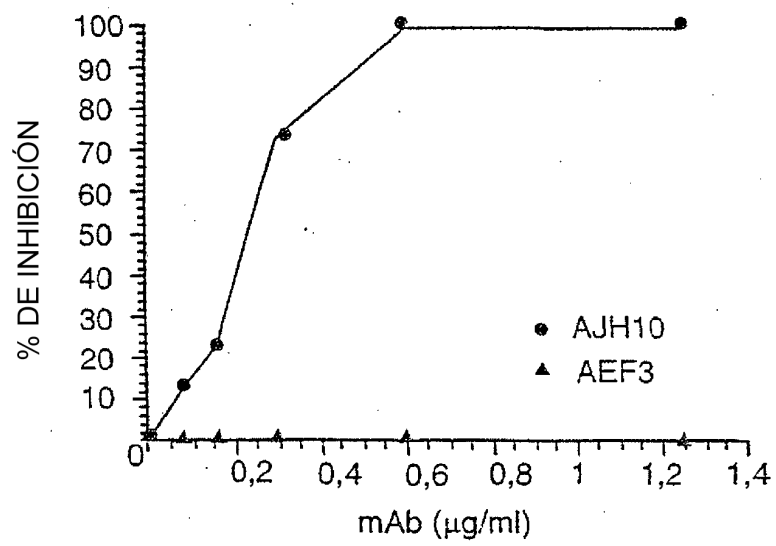


FIG. 16C



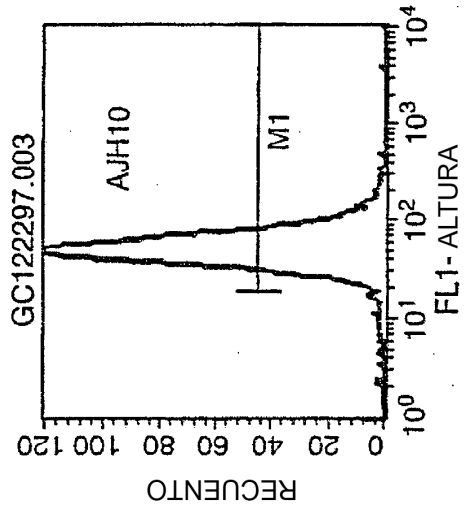
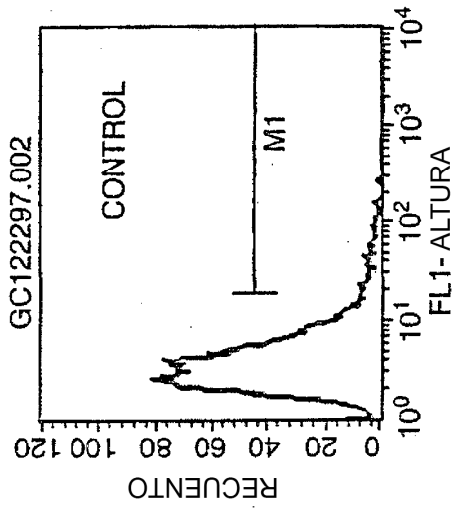


FIG. 17B

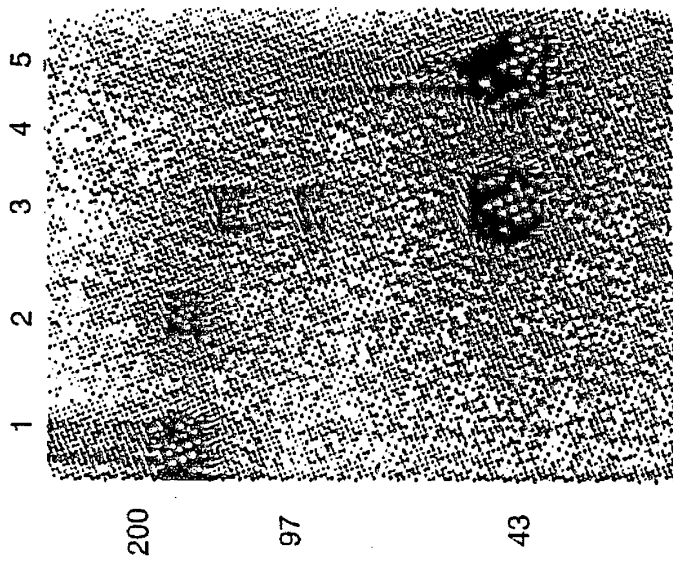


FIG. 17A

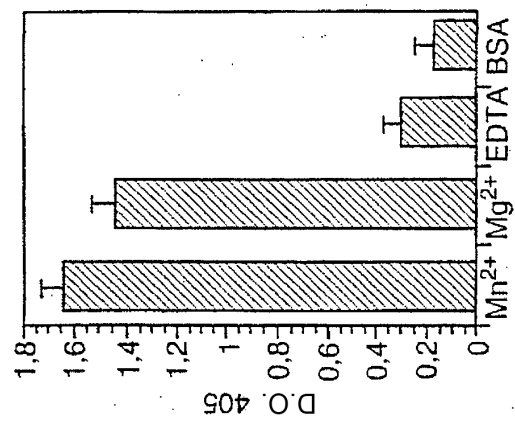


FIG. 18C

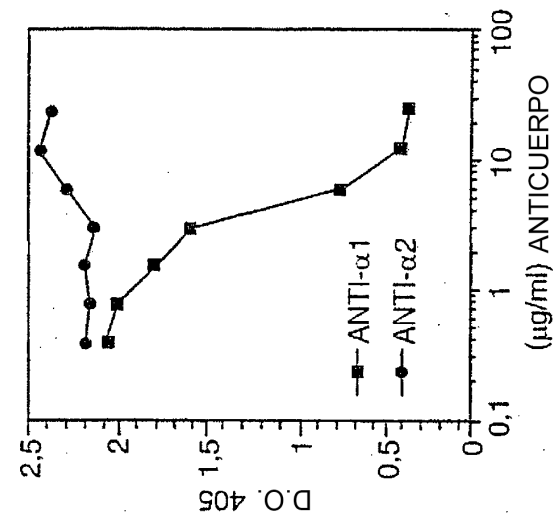


FIG. 18B

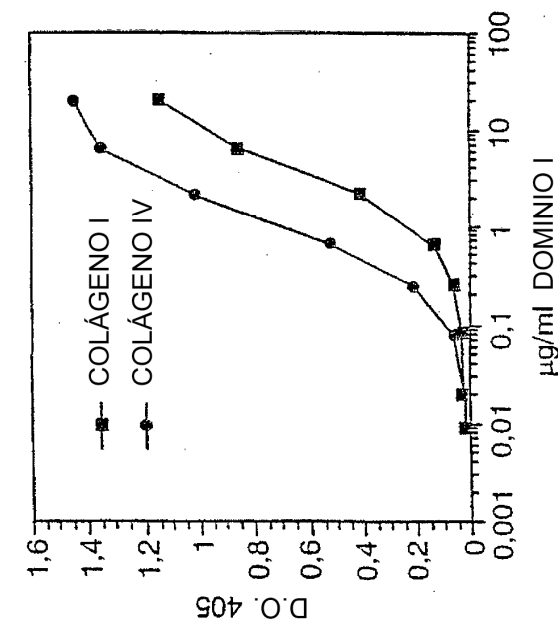


FIG. 18A