

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 105**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011 PCT/US2011/032641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11730120 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2558499**

54 Título: **Anticuerpos contra VLA-4**

30 Prioridad:

16.04.2010 US 324944 P

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

19.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 633 105 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra VLA-4

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los EE. UU. n.º 65/324.944, presentada el 16 de abril de 2010.

10 CAMPO DE LA INVENCION

[0002] Esta invención se refiere a anticuerpos que se unen a $\alpha 4$ y a fragmentos de los mismos que se unen a $\alpha 4$.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Los anticuerpos humanizados pueden usarse como agentes terapéuticos en lugar de anticuerpos murinos para evitar la respuesta inmunitaria indeseada en humanos denominada respuesta HAMA (anticuerpos humanos contra inmunoglobulinas de ratón). Los anticuerpos humanizados se construyen generalmente sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano por las CDR de otra especie, típicamente de un anticuerpo de ratón.

[0004] VLA-4 (o también $\alpha 4\beta 1$) es un miembro de la familia de integrinas $\beta 1$ de los receptores de la superficie celular. VLA-4 contiene una cadena $\alpha 4$ y una cadena $\beta 1$ y está implicada en interacciones intercelulares. Su expresión se limita principalmente a células linfocíticas y mielocíticas. VLA-4 se une al ligando de células endoteliales VCAM-1 (molécula de adhesión a células vasculares 1) y puede facilitar la fijación de los linfocitos T y B al fragmento que se une a la heparina II de la fibronectina del plasma humano.

[0005] El documento WO 2006096653 describe un anticuerpo contra VLA-4 denominado HP1/2 y variantes humanizadas del mismo que usan un armazón aceptor de la región variable de la cadena pesada de IGHV1-f.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] El tema de la invención se define por las reivindicaciones.

[0007] Los inventores han descubierto que pueden usarse armazones de las regiones variables de la línea germinal para optimizar anticuerpos que se unen a $\alpha 4$ con CDR injertadas, como los anticuerpos contra VLA-4. Por consiguiente, la invención presenta cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) contra VLA-4 y moléculas de anticuerpos que incluyen tales armazones.

[0008] En un aspecto, la descripción presenta una cadena VH de un anticuerpo contra $\alpha 4$ que tiene regiones CDR de un anticuerpo contra $\alpha 4$ donante, por ejemplo, un anticuerpo contra $\alpha 4$ descrito en este documento, y un armazón de la VH que tiene las regiones 1, 2, 3 y 4 de la secuencia de una región variable de la línea germinal para la cadena VH, o que no tiene más de cinco, diez o quince diferencias con respecto a la misma. En una realización, la región de armazón variable 4 (FR4) es una secuencia consenso humana. En una realización, están presentes todas las regiones de armazón FR1, FR2, FR3 y FR4 de la cadena VH. En otra realización, la cadena es un fragmento de unión antigénica de una región de VH.

[0009] En una realización, la secuencia de la línea germinal es la del IGHV1-f humano (SEQ ID NO:2) mostrada en la figura 1. En ciertas realizaciones, la secuencia del armazón de la VH puede diferir en al menos uno, pero no más de dos, tres, cuatro, cinco, diez o quince restos aminoacídicos de una secuencia de la línea germinal, por ejemplo, SEQ ID NO:2. En una realización, el armazón de la VH incluye además restos distintos de los restos humanos correspondientes. Por ejemplo, la cadena VH incluye restos no humanos en una o más de las posiciones 24, 67, 76, 80 y 94 (numeración de Kabat) del armazón de SEQ ID NO:2.

[0010] En una realización, al menos una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables derivan de un anticuerpo no humano donante que se une a $\alpha 4$. En una realización, las regiones de unión antigénica del dominio variable de la cadena pesada con CDR injertadas incluyen las CDR correspondientes a las posiciones 26-34 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3) (numeración de Kabat; Kabat *et*

al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a edición, vol. 4, 1995, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE. UU., NIH, EE. UU.).

5 **[0011]** Por lo tanto, en una realización, el armazón de la cadena pesada variable (VH) tiene una secuencia aceptora derivada de la secuencia de la línea germinal del anticuerpo humano IGHV1-f.

10 **[0012]** En otra realización, al menos un aminoácido, y menos de dos, tres, cuatro, cinco o diez restos aminoacídicos, en la región FR1 de la VH es distinto del resto correspondiente de la línea germinal humana. Por ejemplo, uno o más de tales restos pueden ser idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano de que derivan las secuencias CDR. En una realización, el resto aminoacídico en la posición 24 de Kabat está mutado para ser idéntico al de la región de armazón del anticuerpo no humano.

15 **[0013]** En otra realización, al menos un aminoácido, y menos de dos, tres, cuatro, cinco o diez restos aminoacídicos, en la región FR2 de la VH es distinto del resto correspondiente de la línea germinal humana. Por ejemplo, uno o más de tales restos pueden ser idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano de que derivan las secuencias CDR.

20 **[0014]** En otra realización más, al menos un aminoácido, y menos de dos, tres, cuatro, cinco o diez restos aminoacídicos, en la región FR3 de la cadena VH es distinto del resto correspondiente de la línea germinal humana. Por ejemplo, uno o más de tales restos pueden ser idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano de que derivan las secuencias CDR. En una realización, el resto aminoacídico en la posición 94 de Kabat es idéntico al de la región de armazón del anticuerpo no humano. En otra realización más, los restos aminoacídicos en las posiciones 67, 76, 80 y 94 de Kabat son idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano.

25 **[0015]** En ciertas realizaciones, la cadena VH del anticuerpo tiene la secuencia de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.

30 **[0016]** En un aspecto, la descripción presenta una cadena VL contra VLA-4 que tiene regiones CDR de un anticuerpo contra VLA-4 donante, por ejemplo, un anticuerpo contra VLA-4 descrito en este documento, y un armazón de la VL que tiene las regiones 1, 2, 3 y 4 de la secuencia de una región variable de la línea germinal para la cadena VL, o que no tiene más de cinco, diez o quince diferencias (por región o en total) con respecto a la misma. En una realización, la región de armazón variable 4 (FR4) es una secuencia consenso humana. En una realización, están presentes todas las regiones de armazón FR1, FR2, FR3 y FR4 de la cadena VL. En otra realización, la cadena es un fragmento de unión antigénica de una región VL.

35 **[0017]** En otra realización, la secuencia de la línea germinal es la de IGKV4-1 (SEQ ID NO:7), mostrada en la figura 2. En otras realizaciones más, la secuencia del armazón de VL puede diferir en al menos uno, pero no más de dos, tres, cuatro, cinco, diez o quince restos aminoacídicos de una secuencia de armazón de la línea germinal, por ejemplo, SEQ ID NO:7. En otra realización, la VL incluye además restos distintos de los restos aminoacídicos humanos correspondientes. Por ejemplo, la cadena VL incluye además restos no humanos en una o más de las posiciones 1, 73 y 87 (numeración de Kabat) del armazón de SEQ ID NO:7.

45 **[0018]** En una realización, la secuencia es la de AAH7035.1 (SEQ ID NO:12) o la versión genomanipulada en la línea germinal (SEQ ID NO:13) mostrada en la figura 2. En algunas realizaciones, la secuencia del armazón de la VL puede diferir en al menos uno, pero no más de cinco, diez, quince, veinte o veinticinco restos aminoacídicos de una secuencia de armazón genomanipulada en la línea germinal, por ejemplo, SEQ ID NO:13. En una realización, la cadena VL incluye restos distintos de los restos humanos correspondientes. Por ejemplo, la cadena VL incluye además restos no humanos en una o más de las posiciones 1 y 87 (numeración de Kabat) del armazón de SEQ ID NO:12. En otra realización, la VL incluye sustituciones aminoacídicas en las regiones de armazón para parecerse a una secuencia de armazón de la línea germinal humana diferente, como la secuencia de IGKV4-1 de la línea germinal. En ciertas realizaciones, la secuencia del armazón de la VL se altera para ser idéntica a la secuencia de IGKV4-1 de la línea germinal en las posiciones 1-3, 5-23, 35-37, 39-42, 45-49, 57, 59-61, 63-64, 70-72, 74-84, 86-88 y 99-106 (numeración de Kabat) de SEQ ID NO:12.

55 **[0019]** En una realización, al menos una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables derivan de un anticuerpo no humano donante que se une a $\alpha 4$. En otra realización, las regiones de unión antigénica del dominio variable de la cadena pesada con CDR injertadas incluyen las CDR correspondientes a las posiciones 24-31 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3) (numeración de Kabat). Por lo tanto, en una realización, el armazón de la VL tiene una secuencia aceptora construida a partir de la secuencia de la

línea germinal de IGKV4-1, del anticuerpo AAH70335.1 o del anticuerpo AAH70335.1 genomanipulado en la línea germinal.

- 5 **[0020]** En otra realización más, al menos un aminoácido, y menos de dos, tres, cuatro, cinco, diez o quince restos, en la región FR1 de la cadena VL es distinto del resto humano correspondiente. Por ejemplo, uno o más de tales restos pueden ser idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano de que derivan las secuencias CDR. En una realización, el resto aminoacídico en la posición N-terminal de la FR1 está mutado para ser idéntico al de la región de armazón del anticuerpo no humano.
- 10 **[0021]** En otra realización, al menos un aminoácido, y menos de dos, tres, cuatro, cinco, diez o quince restos, en la región FR2 de la cadena VL es distinto del resto humano correspondiente. Por ejemplo, uno o más de tales restos pueden ser idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano de que derivan las secuencias CDR.
- 15 **[0022]** En otra realización más, al menos un aminoácido, y menos de dos, tres, cuatro, cinco, diez o quince restos, en la región FR3 de la cadena VL es distinto del resto humano correspondiente. Por ejemplo, uno o más de tales restos pueden ser idénticos a los de la región de armazón del anticuerpo no humano de que derivan las secuencias CDR. En otra realización, el resto aminoacídico en la posición 87 de Kabat está mutado para ser idéntico al de la región de armazón del anticuerpo no humano. En otra realización más, los restos aminoacídicos en las
20 posiciones 67 y 87 de Kabat están mutados para ser idénticos a los de la secuencia del armazón del anticuerpo no humano. En otra realización más, los restos aminoacídicos en las posiciones 67, 73 y 87 de Kabat de SEQ ID NO:7 están mutados para ser idénticos a los de la secuencia del armazón del anticuerpo no humano.
- [0023]** En otras realizaciones, la cadena VL del anticuerpo tiene la secuencia de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9,
25 SEQ ID N:10 o SEQ ID NO:11.
- [0024]** En una realización, las CDR de las secuencias de los armazones aceptores de las VH y VL se seleccionan para parecerse a las secuencias de las CDR de la secuencia de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino), en que el anticuerpo no humano se une a la integrina $\alpha 4$ o a un fragmento de la misma. En otra realización,
30 las secuencias de las CDR se seleccionan para parecerse a las secuencias de las CDR de un anticuerpo no humano que se une al epítipo B1 de la cadena $\alpha 4$ de VLA-4. En una realización, las CDR se seleccionan para parecerse a un anticuerpo monoclonal murino, por ejemplo, HP1/2, HP2/1, HP2/4, L25, P4C2 o 21.6 (Pulido *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 10241-10245, 1991; patente de los EE. UU. n.º 6.033.665). Modificación puede significar, por ejemplo, escisión e inserción o alteración, por ejemplo, por mutagénesis dirigida.
- 35 **[0025]** En otro aspecto, la descripción presenta un anticuerpo o un fragmento de unión antigénica del mismo, que incluye:
- 40 - una cadena VL contra VLA-4 descrita en este documento, por ejemplo, una cadena VL contra VLA-4 que tiene regiones CDR de un anticuerpo contra VLA-4 donante, por ejemplo, un anticuerpo contra VLA-4 descrito en este documento, y un armazón de la VL que tiene las regiones de armazón de LC 1, 2 y 3 de la secuencia de una región variable de la línea germinal para la cadena VL, o que no tiene más de cinco, diez o quince diferencias con respecto a la misma; en una realización, la región variable 4 es una secuencia consenso humana; y
- 45 - una cadena VH contra VLA-4 descrita en este documento, por ejemplo, una cadena VL contra VLA-4 que tiene regiones CDR de un anticuerpo contra VLA-4 donante, por ejemplo, un anticuerpo contra VLA-4 descrito en este documento, y un armazón de la VL que tiene las regiones de armazón de LC 1, 2 y 3 de la secuencia de una región variable de la línea germinal para la cadena VL, o que no tiene más de cinco, diez o quince diferencias con respecto a la misma; en una realización, la región variable 4 es una secuencia consenso humana.
- 50 **[0026]** En una realización, el anticuerpo se une a uno de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ o a los dos.
- [0027]** En otro aspecto, una cadena VL o VH o un anticuerpo o un fragmento de los mismos, descritos en este documento, están marcados de manera detectable.
- 55 **[0028]** En otro aspecto más, la descripción presenta un vector que contiene ADN codificante de la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, descritos en este documento. En algunas realizaciones, el ADN del vector codifica una VH que tiene la secuencia de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.

[0029] En otro aspecto más, la descripción presenta un vector que contiene ADN codificante de la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, descritos en este documento. En algunas realizaciones, el ADN del vector codifica una cadena VL que tiene la secuencia de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11.

[0030] En otro aspecto más, la descripción presenta un vector que contiene ADN codificante de la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, descritos en este documento y de la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, descritos en este documento.

[0031] En otro aspecto, la descripción presenta una célula hospedadora que contiene un vector descrito en este documento, por ejemplo, una célula capaz de expresar la cadena pesada y/o la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento del anticuerpo descritos en este documento.

[0032] En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para preparar un anticuerpo recombinante contra $\alpha 4$, o un fragmento del mismo que se une a $\alpha 4$, proporcionando una célula hospedadora transfectada con (a) una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo descrita en este documento o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$ y (b) una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, y cultivando la célula transfectada para producir la molécula del anticuerpo recombinante contra $\alpha 4$ o un fragmento del mismo que se une a $\alpha 4$. El ADN codificante de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo puede producirse en el mismo vector o en vectores diferentes.

[0033] En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para preparar un anticuerpo recombinante contra $\alpha 4$ o un fragmento del mismo que se une a $\alpha 4$, proporcionando una célula hospedadora transfectada con (a) una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, por ejemplo, en que la secuencia de ADN tiene la secuencia de SEQ ID NO:3, 4 o 5, y (b) una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, por ejemplo, en que la secuencia de ADN tiene la secuencia de SEQ ID NO:8, 9, 10 o 11, y cultivando la línea celular transfectada para producir la molécula del anticuerpo recombinante contra $\alpha 4$ o un fragmento del mismo que se une a $\alpha 4$. El ADN codificante de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo puede producirse en el mismo vector o en vectores diferentes.

[0034] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por una integrina $\alpha 4$, por ejemplo, una integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) o $\alpha 4\beta 7$, mediante la administración de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra $\alpha 4$ descrito en este documento o una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o fragmento a un sujeto que necesita un tratamiento semejante. El sujeto puede tener o correr el riesgo de padecer, por ejemplo, trastornos inflamatorios, inmunitarios o autoinmunitarios (por ejemplo, inflamaciones del sistema nervioso central como esclerosis múltiple, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcoidosis, vasculitis del SNC, encefalitis y mielitis transversa), rechazo de injertos de tejidos u órganos o enfermedad injerto contra huésped, lesiones agudas del SNC como ictus, traumatismo craneoencefálico (TCE) o lesiones medulares (LM); nefropatía crónica; alergias, por ejemplo, asma alérgico; diabetes sacarina de tipo 1; trastornos intestinales inflamatorios como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; miastenia grave; fibromialgia; trastornos artríticos como artritis reumatoide y artritis psoriática; trastornos cutáneos inflamatorios/inmunitarios como psoriasis, vitiligo, dermatitis, liquen plano; lupus sistémico eritematoso; síndrome de Sjogren; cánceres hematológicos como mieloma múltiple, leucemia, linfoma; cánceres sólidos como sarcomas o carcinomas, por ejemplo, de pulmón, mama, próstata, cerebro; y trastornos fibróticos como fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis creciente, nefropatía diabética y fibrosis intersticial renal.

[0035] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento de tratamiento de un paciente mediante la administración al paciente de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a $\alpha 4$. En una realización, el paciente tiene un cáncer, como un tumor sólido o una neoplasia hematológica. Por ejemplo, un paciente tratado con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a $\alpha 4$ puede tener leucemia mielógena aguda (LMA) o mieloma múltiple (MM).

[0036] En otra realización, el paciente tiene un trastorno inflamatorio como esclerosis múltiple, asma (por ejemplo, asma de moderada a grave), artritis reumatoide, diabetes o la enfermedad de Crohn. En otra realización, la composición se administra como un régimen. En otra realización más, el procedimiento incluye además la selección de un paciente para el tratamiento con la composición. Un paciente adecuado para el tratamiento, por ejemplo, ha

mostrado un signo o un síntoma indicativo de la aparición de la enfermedad, como un signo o síntoma indicativo de EM.

5 **[0037]** En otra realización más, el procedimiento incluye además la administración al paciente de un segundo agente terapéutico, como un agente quimioterapéutico, un agente trombolítico, un agente neuroprotector, un agente antiinflamatorio, un esteroide, una citocina o un factor de crecimiento.

[0038] En una realización, al paciente se le administra un anticuerpo contra VLA-4 humanizado, o un fragmento del mismo, descrito en este documento como HuHP1/2, H1L1, H1L2 o H1L3.

10 **[0039]** En una realización, la composición que contiene un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ se administra como un régimen, por ejemplo, a intervalos regulares. Por ejemplo, la composición puede administrarse una vez diaria, semanal o mensualmente; una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana o más; o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o más.

15 **[0040]** En una realización, la dosificación puede ajustarse de acuerdo con la tasa de aclaramiento en el paciente de una administración previa de un anticuerpo contra $\alpha 4$. Por ejemplo, en una realización, al paciente no se le administrará una segunda dosis o dosis de continuación antes de que el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ en el sistema del paciente haya disminuido por debajo de un nivel predeterminado. En una realización, se analiza una muestra de un paciente (por ejemplo, una muestra de plasma, suero, sangre u orina) para determinar la presencia de anticuerpos contra $\alpha 4$ y si el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ está por encima de un nivel predeterminado, al paciente no se le administrará una segunda dosis o dosis de continuación. Si el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ en el sistema del paciente está por debajo de un nivel predeterminado, entonces al paciente se le administrará una segunda dosis o dosis de continuación.

25 **[0041]** En una realización, la composición se administra continuamente, por ejemplo, durante un periodo de más de 30 minutos, pero de menos de 1, 2, 4 o 12 horas. La composición que contiene el anticuerpo y el segundo agente puede administrarse por cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

30 **[0042]** En algunas realizaciones, cada uno de los dos, anticuerpo y segundo agente, se administran en la misma dosis que se prescribe para un monotratamiento. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra en una dosis que es igual o menor que la cantidad requerida para su eficacia si se administra solo. Igualmente, el segundo agente puede administrarse en una dosis que es igual o menor que la cantidad requerida para su eficacia si se administra solo.

[0043] Otro aspecto presentado en la descripción es un procedimiento de evaluación de un paciente mediante la determinación de si el paciente cumple un criterio preseleccionado, y si el paciente cumple el criterio preseleccionado, la aprobación, suministro, prescripción o administración al paciente de una formulación de un anticuerpo que se une a VLA-4 descrito en este documento. En una realización, el criterio preseleccionado es la falta de una respuesta adecuada del paciente a un tratamiento o régimen terapéutico alternativo previo, por ejemplo, para el tratamiento de la EM. En otra realización, el criterio preseleccionado es la ausencia de cualquier signo o síntoma de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) o la ausencia de cualquier diagnóstico de LMP. En algunos casos, la selección se basa en la ausencia de un factor de riesgo para LMP, por ejemplo, el sujeto no resulta positivo para el ADN del virus JC o no resulta positivo para anticuerpos contra el virus JC. En otra realización, el criterio es según se describe en el documento PCT/US 07/75577 (publicado como WO 2008/021954), que describe procedimientos y sistemas para la distribución de fármacos y para el suministro de fármacos a pacientes.

40 **[0044]** En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de distribución de una composición descrita en este documento. La composición contiene un anticuerpo que se une a $\alpha 4$. El procedimiento incluye proporcionar a un destinatario (por ejemplo, un usuario final, paciente, médico, farmacia minorista o mayorista, distribuidor o departamento farmacéutico en un hospital, clínica particular o seguro médico cerrado (HMO)) un envase que contiene suficientes dosis unitarias del fármaco para tratar al paciente durante al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses. En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento de evaluación de la calidad de un envase o lote de envases (por ejemplo, para determinar si han caducado) de una composición descrita en este documento que contiene un anticuerpo que se une a $\alpha 4$. El procedimiento incluye evaluar si el envase ha caducado. La fecha de caducidad es al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses, por ejemplo más de 24 o 36 meses, después de un momento preseleccionado, como la fabricación, ensayado o envasado. En algunas realizaciones, se toma una decisión o medida como resultado del análisis. Por ejemplo, dependiendo del análisis correcto, el anticuerpo en el envase se usa o desecha,

se clasifica, selecciona, libera o retiene, se envía, se traslada a un nuevo lugar, se libera al comercio, se vende o se ofrece a la venta, se retira del comercio o deja de ofrecerse a la venta, dependiendo de si el producto ha caducado.

[0045] En otro aspecto, la descripción presenta un envase que contiene al menos dos dosis unitarias de una composición acuosa que contiene un anticuerpo contra $\alpha 4$. En una realización, todas las dosis unitarias contienen la misma cantidad del anticuerpo y en otras realizaciones hay dosis unitarias de dos o más concentraciones o dos o más formulaciones diferentes, por ejemplo, con distintas concentraciones o propiedades de liberación.

[0046] En otro aspecto, la descripción incluye un procedimiento para instruir al destinatario sobre la administración de una formulación que contiene un anticuerpo que se une a $\alpha 4$. El procedimiento incluye instruir al destinatario (por ejemplo, un usuario final, paciente, médico, farmacia minorista o mayorista, distribuidor o departamento farmacéutico en un hospital, clínica particular o seguro médico cerrado (HMO)) acerca de que el anticuerpo debe administrarse a un paciente de acuerdo con un régimen descrito en este documento. El procedimiento también puede incluir instruir al destinatario acerca de que el anticuerpo debe administrarse antes de la fecha de caducidad. La fecha de caducidad es al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses, por ejemplo más de 24 o 36 meses, después de un momento preseleccionado, como la fabricación, ensayado o envasado. En una realización, el destinatario también recibe un suministro del anticuerpo, por ejemplo, un suministro de dosis unitarias del anticuerpo.

[0047] En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento de preparación de un anticuerpo que incluye regiones CDR de un anticuerpo donante, como un anticuerpo no humano, por ejemplo, murino, y armazones de las regiones variables de una o las dos cadenas, pesada y ligera, derivados de una región o regiones de armazón de las regiones variables de la línea germinal humana. El procedimiento incluye uno o los dos de 1 y 2, en que 1 y 2 son como sigue:

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

a) las posiciones de Kabat de la VH n.º 2, 4, 24, 26, 27, 29, 36, 38, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 69, 71, 78, 93 y 94, las cuales, sin querer limitarse a la teoría, se piensa que son importantes para mantener las conformaciones de las CDR;

b) las posiciones de Kabat de la VH n.º 1, 2, 27, 28, 30, 43, 66, 68, 70, 72, 73, 74 y 75, las cuales, sin querer limitarse a la teoría, se piensa que son capaces de interactuar con el antígeno; y

c) las posiciones de Kabat de la VH n.º 37, 39, 44, 45, 47, 91, 93 y 103, las cuales, sin querer limitarse a la teoría, se piensa que son importantes para la integridad de la interfaz VH/VL;

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

a) las posiciones de Kabat de la VL n.º 2, 4, 38, 43, 44, 48, 58, 64, 71 y 73, las cuales, sin querer limitarse a la teoría, se piensa que son importantes para mantener las conformaciones de las CDR;

b) las posiciones de Kabat de la VL n.º 1, 2, 49, 57, 60, 63, 65, 66, 67, 68, 69 y 70, las cuales, sin querer limitarse a la teoría, se piensa que son capaces de interactuar con el antígeno; y

c) las posiciones de Kabat de la VL n.º 36, 38, 43, 44, 46, 49, 87 y 98, las cuales, sin querer limitarse a la teoría, se piensa que son importantes para la integridad de la interfaz VH/VL;

3. proporcionar una región variable que tiene CDR donantes y el armazón de la línea germinal seleccionado con los restos coincidentes identificados en 1 o 2, por ejemplo, seleccionando una secuencia de la línea germinal y retromutando posteriormente los restos adicionales identificados en 1 o 2 de la línea germinal a la secuencia murina para maximizar así la coincidencia de los restos identificados en 1 y 2; y

4. evaluar cada posición coincidente, por ejemplo por análisis estructural o modelado tridimensional y, si una posición presenta un estándar de riesgo predeterminado, por ejemplo, de interferir con las conformaciones de las CDR, las interacciones con el antígeno o la integridad de la interfaz VH/VL, reintroducir entonces un resto murino equivalente o un resto de un anticuerpo humano común, compatible con la estructura del anticuerpo.

En una realización, al menos tres, cuatro o cinco de los restos identificados en (1.a) son coincidentes. Por ejemplo, en una realización, los restos 24, 29 o 94 son coincidentes.

- [0048]** En una realización, al menos tres, cuatro o cinco de los restos identificados en (1.b) son coincidentes. por ejemplo, en una realización, los restos 1, 73 o 75 son coincidentes.
- [0049]** En una realización, al menos tres, cuatro o cinco de los restos identificados en (1.c) son coincidentes. 5 por ejemplo, en una realización, los restos 37, 93 o 103 son coincidentes.
- [0050]** En una realización, al menos tres, cuatro o cinco de los restos identificados en (2.a) son coincidentes. por ejemplo, en una realización, los restos 2, 71 y 73 son coincidentes.
- 10 **[0051]** En una realización, al menos tres, cuatro o cinco de los restos identificados en (2.b) son coincidentes. por ejemplo, en una realización, los restos 1, 68 o 70 son coincidentes.
- [0052]** En una realización, al menos tres, cuatro o cinco de los restos identificados en (2.c) son coincidentes. por ejemplo, en una realización, los restos 46, 87 o 98 son coincidentes.
- 15 **[0053]** En una realización, el resto 6 en (1.a), el resto 2 en (1.b) y el resto 4 en (1.c) son coincidentes.
- [0054]** En otra realización, el resto 4 en (2.a), el resto 2 en (2.b) y el resto 4 en (2.c) son coincidentes.
- 20 **[0055]** En una realización, la secuencia de la línea germinal para la cadena pesada corresponde a las clases VH3, VH1 y VH5 de la línea germinal. En otra realización, la secuencia de la línea germinal para la cadena ligera es una secuencia de Vk o Vλ.
- [0056]** El término “tratar” se refiere a administrar un tratamiento en una cantidad, manera y/o modo eficaz 25 para mejorar una dolencia, síntoma o parámetro asociado con un trastorno o para prevenir la progresión de un trastorno, bien en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para un experto en la técnica. La cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del sujeto y puede ajustarse al sujeto.
- [0057]** Un “anticuerpo que se une a α4” se refiere a un anticuerpo que se une a la subunidad α4 de la 30 integrina VLA-4 (α4β1) e inhibe al menos parcialmente una actividad de VLA-4, especialmente una actividad de unión de la integrina VLA-4 o una actividad de señalización, por ejemplo, la capacidad de transducir una señal mediada por VLA-4. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a VLA-4 puede inhibir la unión de VLA-4 a un ligando afín de VLA-4, por ejemplo, una proteína de la superficie celular como VCAM-1 (molécula de adhesión a células vasculares 1), o a un componente de la matriz extracelular como fibronectina u osteopontina. Un anticuerpo que se 35 une a α4 puede unirse a las dos α4β1 o α4β7. Típicamente, el anticuerpo se une al epítipo B1 de α4. Un anticuerpo que se une a α4 puede unirse a VLA-4 con una K_d de menos de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o 10^{-11} M.
- [0058]** Tal como se usa en este documento, el término “anticuerpo” se refiere a una proteína que incluye al 40 menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia aminoacídica que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de una cadena pesada (H) (abreviada en este documento como VH) y una región variable de una cadena ligera (L) (abreviada en este documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). 45 Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos κ o λ. En una realización, el anticuerpo está glucosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o citotoxicidad mediada por el complemento o puede no ser funcional para una o ninguna de estas actividades.
- [0059]** Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad 50 denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (“CDR”), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones de armazón” (FR). La extensión de las FR y las CDR ha sido definida con exactitud (véase Kabat E. A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE. UU., publicación del NIH n.º 91-3242; y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). En este documento se usan las definiciones de Kabat. Cada una de las VH y VL 55 se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.
- [0060]** Un “dominio de inmunoglobulina” se refiere a un dominio del dominio variable o constante de moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina contienen típicamente dos láminas β formadas por

aproximadamente siete hebras β y un enlace disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A. F. Williams y A. N. Barclay (1988) *Ann. Rev. Immunol.* 6: 381-405).

[0061] Tal como se usa en este documento, una "secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia aminoacídica que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia aminoacídica de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N o C-terminales, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales o puede incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye la secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con la secuencia de otro dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura diana de unión (o "sitio de unión antigénica"), por ejemplo, una estructura que interacciona con VLA-4.

[0062] Las cadenas VH o VL del anticuerpo pueden incluir además toda o parte de la región constante de una cadena pesada o ligera para así formar una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina pueden estar conectadas por enlaces disulfuro. La región constante de la cadena pesada incluye típicamente tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera incluye típicamente un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos facilitan típicamente la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

[0063] El término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mi, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). La naturaleza de esta cadena es la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente invención. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada una de las cadenas pesadas puede estar unida a una cadena ligera κ o γ .

[0064] El término "fragmento de unión antigénica" de un anticuerpo completo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo completo que retienen la capacidad de unirse específicamente a una diana de interés, por ejemplo, VLA-4. Algunos ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "fragmento de unión antigénica" de un anticuerpo completo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546) que consta de un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que retiene la funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse por procedimientos recombinantes, mediante un conector sintético que permite su síntesis como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv). Véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883.

[0065] En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos anteriormente están pegilados.

[0066] En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos anteriormente o fragmentos de los mismos son multiespecíficos. En otras realizaciones, los anticuerpos descritos anteriormente o fragmentos de los mismos son monovalentes o bispecíficos.

[0067] Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos acompañantes y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención resultarán evidentes de la descripción y los dibujos y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0068]

- La figura 1 muestra las tres variantes de secuencia de la cadena pesada de HP1/2 con respecto a la cadena pesada de IGHV1-f de la línea germinal humana. Las letras minúsculas encima de la secuencia representan inserciones de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.
- La figura 2 muestra las cuatro variantes de secuencia de la cadena ligera de HP1/2 con respecto a la secuencia del anticuerpo IGKV4-1 de la línea germinal (diseños L0, L1 y L2) o la secuencia κ del anticuerpo AAH7033.1 humano genomanipulado en la línea germinal (diseño L3). Las letras minúsculas encima de la secuencia representan inserciones de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.
- 10 La figura 3 es un gráfico que representa los resultados de los ensayos ELISA.
La figura 4 es un gráfico que representa los resultados de los ensayos ELISA.
La figura 5 es la secuencia aminoacídica de un Fc de IgG4 (dominios bisagra + CH2 + CH3). La región bisagra se representa en negrita y el dominio CH3 está subrayado. La "S" en el recuadro es Ser228. La "N" en el círculo es Asn297.
- 15 La figura 6 es un gráfico que representa datos de citometría de flujo de la unión de HuHP1/2 a diversas líneas de células tumorales. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.
Las figuras 7A-7C son paneles de gráficos que representan la inhibición la unión de líneas celulares de LMA a pocillos recubiertos con fibronectina o VCAM1-Ig por HuHP1/2. La figura 7A representa la inhibición de la unión de células HL60 y KG1 a pocillos recubiertos con FN. La figura 7B representa la inhibición de la unión de células KG1 a pocillos recubiertos con VCAM1-Ig. La figura 7C representa la inhibición de la unión de células HL60 a pocillos recubiertos con FN y VCAM1-Ig cuando se incuban con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2 (barras rellenas). Las barras blancas indican el porcentaje de adhesión celular en presencia de un control de isotipo. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.
- 20 Las figuras 8A-8C constituyen un panel de gráficos que representan la inhibición de la unión de líneas celulares de MM a pocillos recubiertos con fibronectina o VCAM1-Ig por HuHP1/2. La figura 8A representa la inhibición de la unión de células U266 y H929 a pocillos recubiertos con FN. La figura 8B representa la inhibición de la unión de células U266 y H929 a pocillos recubiertos con VCAM1-Ig. La figura 8C representa la inhibición de la unión de células U266 a pocillos recubiertos con FN y VCAM1-Ig cuando se incuban con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2 (barras rellenas). Las barras blancas indican el porcentaje de adhesión celular en presencia de un control de isotipo. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.
- 25 se refiere a HP1/2 humanizado.
Las figuras 9A-9C constituyen un panel de gráficos que representan la inhibición de la unión de líneas celulares de LLC a pocillos recubiertos con fibronectina o VCAM1-Ig por HuHP1/2. La figura 9A representa la inhibición de la unión de células Mec1 y JM1 a pocillos recubiertos con FN. La figura 9B representa la inhibición de la unión de células Mec1 y JM1 a pocillos recubiertos con VCAM1-Ig. La figura 9C representa la inhibición de la unión de células Mec1 a pocillos recubiertos con FN y VCAM1-Ig cuando se incuban con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2 (barras rellenas). Las barras blancas indican el porcentaje de adhesión celular en presencia de un control de isotipo. "HP1/2" se refiere a HP1/2 humanizado.
- 30
35
40

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 40 **[0069]** Se ha demostrado que los anticuerpos contra VLA-4 son útiles para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, natalizumab (Tysabri®), un anticuerpo contra VLA-4, se usa para el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente y la enfermedad de Crohn. Sin embargo, para el tratamiento de ciertas dolencias, por ejemplo, dolencias agudas como lesiones medulares (LM) o traumatismos craneoencefálicos (TCE), o tratamientos que se administran en un número finito como el tratamiento del cáncer, puede ser ventajoso tratar con un anticuerpo contra VLA-4 que se una con una afinidad diferente a la de natalizumab, por ejemplo, una mayor afinidad. Además, el tratamiento con anticuerpos contra VLA-4 está asociado con un trastorno raro pero a veces letal, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), por la que una parte del tratamiento requiere la eliminación del anticuerpo del sujeto tratado, por ejemplo, mediante plasmaféresis o inmovinabsorción. Debido a la necesidad de eliminar el anticuerpo, también es deseable equilibrar las ventajas de un anticuerpo que tiene mayor afinidad por VLA-4 con las desventajas de un anticuerpo que se une tan firmemente que hace difícil su eliminación o crea un riesgo asociado con una lenta tasa de renovación. Tales anticuerpos pueden ser útiles también para el tratamiento de dolencias, como la esclerosis múltiple, en las que puede requerirse un tratamiento menos frecuente o la administración por medios distintos de la infusión puede ser más eficiente. Al permitir el tratamiento con dosis más bajas puede reducirse también el riesgo de efectos adversos como LMP. Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos que tienen tales propiedades deseables.
- 45
50
55

[0070] La invención se basa al menos en parte en las características inesperadas de anticuerpos humanizados que se unen a $\alpha 4$ de nuevo diseño, que tiene una afinidad por $\alpha 4$ que es 10 veces mayor que la del

anticuerpo contra $\alpha 4$ natalizumab.

[0071] Se proporcionan anticuerpos que se unen a $\alpha 4$ y fragmentos de los mismos en los que los armazones de la cadena ligera variable (VL) y la cadena pesada variable (VH) tienen secuenciasceptoras construidas a partir de la línea germinal o secuencias de anticuerpos genomanipulados en la línea germinal, como los anticuerpos IGKV4-1, geAAH70335.1 o IGHV1-f. Las secuencias CDR derivan de anticuerpos que se unen a $\alpha 4$ no humanos, como el anticuerpo contra VLA-4 HP1/2. Los anticuerpos descritos en este documento pueden tener un aumento de la afinidad de al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 veces, por ejemplo, en relación con su parental murino. En una realización, el aumento de la afinidad es de al menos 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 veces, pero respectivamente de menos de 25, 20 o 15 veces.

Composiciones farmacéuticas

[0072] Un agente que se une a $\alpha 4$, como un anticuerpo que se une a VLA-4, puede formularse como una composición farmacéutica. Típicamente, una composición farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en este documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles.

[0073] Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M. *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Algunos ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas como *N,N'*-dibenciletilendiamina, *N*-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

[0074] Las composiciones del anticuerpo descritas en este documento pueden formularse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. La formulación farmacéutica en una técnica bien establecida y se describe más detalladamente en Genaro (ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a edición, Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7.^a edición, Lippincott, Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients* American Pharmaceutical Association, 3.^a edición (2000) (ISBN: 091733096X).

[0075] En una realización, el anticuerpo contra $\alpha 4$ puede formularse con materiales excipientes, como cloruro de sodio, fosfato dibásico de sodio heptahidrato, fosfato monobásico de sodio y polisorbato 80. En otra realización, el anticuerpo contra $\alpha 4$ puede formularse en un tampón de citrato, por ejemplo a pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7 o 7,5. En otra realización más, el anticuerpo contra $\alpha 4$ puede formularse en una disolución que contiene el 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 o 15 % de sacarosa. Por ejemplo, puede proporcionarse en una disolución tamponada a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml y puede almacenarse a 2-8 °C.

[0076] Las composiciones farmacéuticas pueden estar también en diversas otras formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones para inyección o infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma puede depender del modo de administración y la aplicación terapéutica que se pretenden. Típicamente, las composiciones de los agentes descritos en este documento están en forma de disoluciones para inyección o infusión.

[0077] Tales composiciones pueden administrarse de modo parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). Las expresiones "administración por vía parenteral" o "administrado por vía parenteral", tal como se usan en este documento, significan modos de administración distintos de la administración por vía entérica o tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

[0078] Típicamente, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Una composición farmacéutica puede probarse también para asegurar que satisface los estándares regulatorios e industriales para su administración.

5 **[0079]** La composición puede formularse como disolución, microemulsión, dispersión, liposomas u otras estructuras ordenadas adecuadas para altas concentraciones de fármacos. Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un agente descrito en este documento en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguida de una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la
10 incorporación de un agente descrito en este documento en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos típicos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo de un agente descrito en este documento más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada por filtración. La fluidez correcta de la
15 disolución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 Administración

[0080] Un anticuerpo contra $\alpha 4$ puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, por diversos procedimientos. Para muchas aplicaciones, la vía de administración es una de entre: inyección o infusión intravenosa, inyección subcutánea o inyección intramuscular. Un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ puede administrarse en
25 una dosis fija o en una dosis de mg/kg. El anticuerpo puede administrarse por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC). Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse en una dosis unitaria fija de entre aproximadamente 50 y 600 mg por vía IV, por ejemplo, cada cuatro semanas, o de entre aproximadamente 50 y 100 mg por vía SC (por ejemplo, 75 mg), por ejemplo, al menos una vez a la semana (por ejemplo, dos veces a la semana). En una realización, el anticuerpo se administra por vía IV a una dosis unitaria fija de 50 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg,
30 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 180 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg o más. La administración de la dosis por vía IV puede ser una, dos o tres veces o más a la semana, o una vez cada dos, tres, cuatro o cinco semanas o con menor frecuencia.

[0081] En una realización, el anticuerpo se administra por vía SC en una dosis unitaria fija de 50 mg, 60 mg,
35 70 mg, 75 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg o más. La administración de la dosis por vía SC puede ser una, dos o tres veces o más a la semana o una vez cada dos, tres, cuatro o cinco semanas o con menor frecuencia.

[0082] Un anticuerpo contra $\alpha 4$ puede administrarse también en un bolo en una dosis de entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 6,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 2,0 mg/kg o 1,0 mg/kg. Los intervalos de dosis modificados incluyen una dosis que es menor de aproximadamente 600 mg/sujeto, aproximadamente 400 mg/sujeto, aproximadamente 300 mg/sujeto, aproximadamente 250 mg/sujeto, aproximadamente 200 mg/sujeto o aproximadamente 150 mg/sujeto, típicamente para administración cada cuatro semanas o una vez al mes. El anticuerpo contra $\alpha 4$ puede administrarse, por ejemplo, cada tres a cinco semanas, por ejemplo, cada cuatro semanas o mensualmente.
45

[0083] La dosificación puede ajustarse en función de la tasa de aclaramiento del paciente de una administración previa del anticuerpo contra $\alpha 4$. Por ejemplo, al paciente puede no administrársele una segunda dosis o dosis de continuación antes de que el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ en el sistema del paciente haya disminuido por debajo de un nivel predeterminado. En una realización, se analiza una muestra de un paciente (por
50 ejemplo, de plasma, suero, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR)) para determinar la presencia de anticuerpos contra $\alpha 4$ y si el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ está por encima de un nivel predeterminado, al paciente no se le administrará una segunda dosis o dosis de continuación. Si el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ en el sistema del paciente está por debajo de un nivel predeterminado, entonces al paciente se le administrará una segunda dosis o dosis de continuación. Un paciente en el que se determina que los niveles de anticuerpos contra $\alpha 4$
55 son demasiado elevados (por encima del nivel predeterminado) puede analizarse de nuevo después de uno o tres días o una semana y si el nivel de los anticuerpos contra $\alpha 4$ en el paciente ha disminuido por debajo del nivel predeterminado, al paciente se le puede administrar una segunda dosis o dosis de continuación del anticuerpo.

[0084] La dosis puede elegirse también para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el

anticuerpo que se une a $\alpha 4$, para conseguir una saturación de la subunidad $\alpha 4$ superior al 40, 50, 70, 75 u 80 %, para conseguir una saturación de la subunidad $\alpha 4$ inferior al 80, 70, 60, 50 o 40 % o para prevenir un aumento del nivel de leucocitos circulantes.

5 **[0085]** En ciertas realizaciones, el agente activo puede prepararse con un vehículo que protegerá al compuesto de una liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables como acetato de vinilo y etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos. Véase, 10 por ejemplo, Controlled Drug Delivery (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), 2.^a edición, J. Robinson y V. H. L. Lee, eds., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987.

[0086] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con un dispositivo médico. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como los 15 dispositivos descritos en las patentes de los EE. UU. n.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Algunos ejemplos de implantes y módulos bien conocidos se analizan, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para la administración de medicamentos con una velocidad controlada; la patente de los EE. UU. n.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; la patente de los EE. UU. n.º 4.447.233, que 20 describe una bomba de infusión de medicamentos para la administración de medicamentos con una velocidad de infusión exacta; la patente de los EE. UU. n.º 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continuada de fármacos; la patente de los EE. UU. n.º 4.439.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos con compartimentos de cámaras múltiples; y la patente de los EE. UU. n.º 4.475.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos. Por supuesto, también se 25 conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos semejantes.

[0087] Esta descripción también presenta un dispositivo para la administración de un primer y un segundo agente. El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más alojamientos para almacenar preparaciones farmacéuticas y puede estar configurado para administrar dosis unitarias del primer y el segundo agente. El primer y 30 el segundo agente pueden almacenarse en el mismo o en distintos compartimentos. Por ejemplo, el dispositivo puede combinar los agentes antes de la administración. También es posible usar diferentes dispositivos para administrar el primer y el segundo agente.

[0088] Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada, como una 35 respuesta terapéutica o un efecto terapéutico combinatorio. Generalmente, puede usarse cualquier combinación de dosis (bien por separado o coformuladas) del agente que se une a VLA-4 y el segundo agente con el fin de proporcionar a un sujeto los dos agentes en cantidades biodisponibles.

[0089] La forma de dosificación unitaria o "dosis fija", tal como se usa en este documento, se refiere a 40 unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que han de tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido y opcionalmente en asociación con el otro agente.

[0090] Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente 45 descrito en este documento. Tales cantidades eficaces pueden determinarse sobre la base del efecto combinatorio del primer y el segundo agente administrados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente puede variar también en función de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad del compuesto de desencadenar una respuesta deseada en el individuo, como la mejoría de al menos un parámetro del trastorno, por ejemplo, un parámetro de la esclerosis múltiple, o la mejoría de al menos un síntoma 50 del trastorno, por ejemplo, un síntoma de la esclerosis múltiple, como atrofia muscular, ataxia y temblores. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición queda compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Dispositivos y kits

55 **[0091]** Las formulaciones que contienen un anticuerpo descrito en este documento pueden administrarse con un dispositivo médico. El dispositivo puede diseñarse con características como portabilidad, almacenamiento a temperatura ambiente y facilidad de uso, de manera que pueda usarse en situaciones de emergencia, por ejemplo, por un sujeto sin entrenamiento o por el personal de emergencia sobre el terreno, trasladado a instalaciones

médicas y otros equipos médicos. El dispositivo puede incluir, por ejemplo uno o más alojamientos para almacenar preparaciones farmacéuticas que incluyen un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y puede configurarse para administrar una o más dosis unitarias del agente.

5 **[0092]** Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse con un dispositivo de administración transcutánea, como una jeringa, incluida una jeringa hipodérmica o de múltiples cámaras. Otros dispositivos de administración adecuados incluyen prótesis intravasculares, catéteres, microagujas y dispositivos implantables de liberación controlada. La composición puede administrarse por vía intravenosa con un equipo IV estándar, incluidos, por ejemplo, tubos IV, con o sin filtros en línea. En ciertas realizaciones, el dispositivo será una jeringa para uso en
10 administración por vía SC o IM.

[0093] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como los dispositivos descritos en las patentes de los EE. UU. n.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880,
15 4.790.824 o 4.596.556. Algunos ejemplos de implantes y módulos bien conocidos se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para la administración de medicamentos con una velocidad controlada; la patente de los EE. UU. n.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; la patente de los EE. UU. n.º 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para la administración de medicamentos con una velocidad de infusión exacta; la patente de los EE. UU. n.º 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continuada de fármacos; la patente de los EE. UU. n.º 4.439.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos con compartimentos de cámaras múltiples; y la patente de los EE. UU. n.º 4.475.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos. La composición terapéutica puede estar también en forma de una formulación biodegradable o no biodegradable de liberación mantenida para
25 administración por vía subcutánea o intramuscular. Los procedimientos para tales composiciones son conocidos en la técnica. La administración continuada también puede conseguirse mediante una bomba implantable o externa. La administración también puede llevarse a cabo de forma intermitente, como mediante una única inyección diaria, o de forma continuada en una dosis baja, como en una formulación de liberación mantenida. El dispositivo de administración puede modificarse para adecuarse óptimamente a la administración de un anticuerpo contra $\alpha 4$. Por
30 ejemplo, una jeringa puede siliconizarse de manera que sea óptima para el almacenamiento y administración del anticuerpo. Por supuesto, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos semejantes.

[0094] Esta descripción también presenta un dispositivo para la administración de un primer y un segundo agente (por ejemplo, un anticuerpo y un segundo agente). El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más alojamientos para almacenar preparaciones farmacéuticas y puede estar configurado para administrar dosis unitarias del primer y el segundo agente. El primer y el segundo agente pueden almacenarse en el mismo o en distintos compartimentos. En una realización, el dispositivo combina los agentes antes de la administración. En algunas realizaciones, el primer y el segundo agente se administran mediante dispositivos diferentes.
40

[0095] Un anticuerpo contra $\alpha 4$ puede proporcionarse en un kit. En una realización, el kit incluye (a) un recipiente que contiene una composición que incluye una alta concentración de un anticuerpo que se une a VLA-4, opcionalmente (b) un recipiente que contiene una composición que incluye un segundo agente y opcionalmente (c) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de comercialización u otro material que se refiera a los procedimientos descritos en este documento y/o el uso de los agentes para su utilidad terapéutica.
45 En una realización, el kit incluye también un segundo agente. Por ejemplo, el kit incluye un primer recipiente que contiene una composición que incluye el anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y un segundo recipiente que incluye el segundo agente.

50 **[0096]** El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En una realización, el material informativo puede incluir información sobre la producción del anticuerpo, su concentración, fecha de caducidad, información sobre el lote o sitio de producción y demás. En una realización, el material informativo se refiere a procedimientos de administración del anticuerpo que se une a $\alpha 4$, por ejemplo, en una dosis, forma de dosificación o modo de administración adecuados (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración
55 descritos en este documento) para tratar un sujeto que tiene un trastorno agudo, como una lesión medular o un traumatismo craneoencefálico, o una enfermedad inflamatoria (por ejemplo EM) o que presenta riesgo de experimentar una crisis asociada con una enfermedad inflamatoria. La información puede proporcionarse de diversas formas, incluido texto impreso, material legible por ordenador, grabaciones de vídeo o de audio o información que proporciona un enlace o dirección para acceder a material sustancial.

[0097] Además del agente, la composición en el kit puede incluir otros ingredientes, como un disolvente o tampón, un estabilizante o un conservante. El agente puede proporcionarse en cualquier forma, por ejemplo, en forma líquida, seca o liofilizada y sustancialmente puro y/o estéril. Cuando los agentes se proporcionan en una disolución líquida, la disolución líquida es típicamente una disolución acuosa. Cuando los agentes se proporcionan en forma seca, generalmente se reconstituyen mediante la adición de un disolvente adecuado. Opcionalmente, el disolvente, por ejemplo, agua o tampón estéril, puede proporcionarse en el kit.

[0098] El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición o composiciones que contienen los agentes. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes diferentes, separadores o compartimentos para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los distintos elementos del kit están contenidos dentro de un recipiente único no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que lleva fijado a los mismos el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en este documento) de los agentes. Los recipientes pueden incluir una dosis unitaria combinada, por ejemplo, una unidad que incluye tanto el anticuerpo que se une a $\alpha 4$ como el segundo agente en una relación deseada. Por ejemplo, el kit puede incluir una pluralidad de jeringas, ampollas, envases en lámina de plástico, envases en blísteres o dispositivos médicos, cada uno de los cuales contiene, por ejemplo, una única dosis unitaria combinada. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos al aire, resistentes al agua (por ejemplo, impermeables a cambios de humedad o evaporación) y/o estar protegidos de la luz.

[0099] Opcionalmente, el kit incluye un dispositivo adecuado para administrar la composición, por ejemplo, una jeringa u otro dispositivo de administración adecuado. El dispositivo puede proporcionarse precargado con uno o los dos agentes o puede estar simplemente vacío pero preparado para su carga.

Oncología

[0100] Los anticuerpos que se unen a $\alpha 4$ y los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para tratar el cáncer, incluidos cánceres sólidos y neoplasias hematológicas. Algunos ejemplos de cánceres sólidos incluyen sarcomas y carcinomas, por ejemplo, de pulmón, mama, páncreas, colon, próstata, vejiga y cerebro. Las neoplasias hematológicas incluyen cánceres como mieloma múltiple, leucemia y linfoma.

[0101] Se proporcionan procedimientos para tratar a un paciente que tiene una neoplasia hematológica con una composición que contiene un anticuerpo que se une a $\alpha 4$, como un anticuerpo contra VLA-4 descrito en este documento. Las neoplasias hematológicas son cánceres de los sistemas hematopoyético e inmunitario del cuerpo. Los cánceres de este tipo afectan a la sangre, la médula ósea y/o los ganglios linfáticos. Las neoplasias hematológicas incluyen leucemias, como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia promielocítica aguda, eritroleucemia aguda y leucemia de células pilosas (LCP); linfomas, como la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no de Hodgkin y el mieloma múltiple; macroglobulinemia de Waldenström; síndrome mielodisplásico (SMD) (que puede culminar en LMA); una enfermedad mieloproliferativa, como policitemia vera (también denominada PV, PCV o policitemia rubra vera (PRV)), trombocitosis esencial (TE), mielofibrosis, enfermedad de la cadena pesada; y amilodosis debida a la enfermedad de la cadena ligera.

[0102] Los pacientes con una neoplasia hematológica pueden identificarse por análisis de recuento de células sanguíneas y frotis de sangre, por ejemplo, mediante microscopía óptica, que es útil para la identificación de células malignas. Una biopsia, por ejemplo de médula ósea, también puede usarse para identificar células malignas y una biopsia de un ganglio linfático puede ser útil para identificar una linfadenopatía.

[0103] Un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ (por ejemplo, un anticuerpo contra VLA-4 humanizado como HuHP1/2, H1L0, H1L1, H1L2 o H1L3) es útil para el tratamiento de una leucemia como LMA. Las leucemias son cánceres que se originan en la médula ósea, en la que las células malignas son glóbulos blancos (leucocitos). La LMA (también denominada leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia granulocítica aguda y leucemia no linfocítica aguda) es una neoplasia que se produce en granulocitos o monocitos. La LMA se caracteriza por el crecimiento exagerado e incontrolado y la acumulación de células denominadas blastos leucémicos, que no pueden funcionar como las células sanguíneas normales y el bloqueo de la producción de células medulares normales, lo que conduce a una deficiencia de glóbulos rojos (anemia), plaquetas (trombocitopenia) y glóbulos blancos normales

(especialmente neutrófilos, es decir, neutropenia) en la sangre.

[0104] Todos los subtipos de LMA son adecuados para el tratamiento con un anticuerpo que se une a VLA-4. Los subtipos de LMA se clasifican en función de la fase de desarrollo alcanzado por los mieloblastos en el momento del diagnóstico. Las categorías y subtipos permiten al médico decidir el tratamiento que funciona mejor para el tipo de células y conocer la rapidez con que la enfermedad puede evolucionar. Los subtipos son: M0, mieloblástico, en análisis especial; M1, mieloblástico, sin maduración; M2, mieloblástico, con maduración; M3, promielocítico; M4, mielomonocítico; M5, monocítico; M6, eritroleucemia; y M7, megacariocítico. Un anticuerpo contra VLA-4 puede administrarse con un agente secundario especialmente adecuado al subtipo de LMA. Por ejemplo, la leucemia promielocítica aguda (LPA) y la leucemia monocítica aguda son subtipos de la LMA que necesitan un tratamiento diferente al de otros subtipos de LMA. Un segundo agente para el tratamiento de la LPA puede incluir ácido transretinoico total (ATRA) o un antimetabolito como citarabina. Un segundo agente para el tratamiento de la leucemia monocítica aguda puede incluir un análogo de desoxiadenosina como 2-cloro-2'-desoxiadenosina (2-CDA).

[0105] Los factores de riesgo de la LMA incluyen la presencia de ciertos trastornos genéticos como el síndrome de Down, la anemia de Fanconi, el síndrome de Shwachman-Diamond y otros. A un paciente que tiene LMA y un trastorno genético puede administrársele un anticuerpo que se une a VLA-4 y un segundo agente para tratar un síntoma del trastorno genético. Por ejemplo, a un paciente con LMA y anemia de Fanconi puede administrársele un anticuerpo contra VLA-4 y un antibiótico.

[0106] Otros factores de riesgo para LMA incluyen la quimioterapia o radioterapia para el tratamiento de un cáncer diferente, el humo del tabaco y la exposición a grandes cantidades de benceno.

[0107] Otros cánceres adecuados para el tratamiento con un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ incluyen tumores sólidos como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, lifangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, carcinoma quístico, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Otros trastornos

[0108] Las formulaciones y procedimientos descritos en este documento pueden usarse también para tratar otros trastornos inflamatorios, inmunitarios o autoinmunitarios, por ejemplo, inflamaciones del sistema nervioso central (por ejemplo, además de esclerosis múltiple, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcooidosis, vasculitis del SNC, encefalitis y mielitis transversa); rechazo de injertos de tejidos u órganos o enfermedad injerto contra huésped; lesiones agudas del SNC, por ejemplo, ictus o lesiones medulares (LM); nefropatía crónica; alergias, por ejemplo, asma alérgico, rinitis alérgica de moderada a grave, alergia ocular; diabetes sacarina de tipo 1; trastornos intestinales inflamatorios, por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (por ejemplo, para tratamiento o mantenimiento de la remisión); gastroenteritis eosinofílica; miastenia grave; fibromialgia; trastornos asociados con reumatología/inmunología como trastornos artríticos, por ejemplo, artritis reumatoide y artritis psoriática; trastornos dermatológicos como trastornos cutáneos inflamatorios/inmunitarios, por ejemplo, psoriasis, vitiligo, dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica), liquen plano, urticaria crónica de moderada a grave; lupus sistémico eritematoso (LSE; por ejemplo, nefritis lúpica); escleroderma (por ejemplo, esclerosis sistémica progresiva (ESP), como ESP de pulmón); neumonía eosinofílica primaria aguda o crónica; síndrome de Sjogren; síndrome coronario agudo (SCA); infarto de miocardio agudo; aterosclerosis; y trastornos fibróticos, por ejemplo, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis de pulmón (por ejemplo, inducida por radioterapia), mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis creciente, nefropatía diabética y fibrosis intersticial renal.

[0109] Las formulaciones y procedimientos descritos en este documento pueden usarse también para tratar trastornos neurológicos como isquemia cerebral, incluida la prevención en pacientes con ataques isquémicos transitorios y/o estenosis arterial. Otros ejemplos de trastornos neurológicos incluyen polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC); síndrome de Guillain-Barre (SGB); enfermedades oculares como la degeneración

macular (por ejemplo, degeneración macular húmeda) y neuropatía óptica isquémica anterior; dolor neuropático (por ejemplo, dolor neuropático sintomático); enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (por ejemplo, modificadores de la enfermedad ELA) y la enfermedad de Parkinson.

- 5 **[0110]** Las formulaciones y procedimientos descritos en este documento pueden usarse también para tratar pacientes que han sufrido un trasplante, como un trasplante de riñón, corazón o de médula ósea.

Esclerosis múltiple

- 10 **[0111]** Las formulaciones que contienen un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ descritas en este documento son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple es una enfermedad del sistema nervioso central que se caracteriza por la inflamación y pérdida de las láminas de mielina.

- 15 **[0112]** Los pacientes con EM pueden identificarse por criterios que establecen un diagnóstico de EM clínicamente definida tal como se define por el taller de diagnóstico de la EM (Poser *et al.*, Ann. Neurol. 13: 227, 1983). Por ejemplo, un individuo con EM clínicamente definida ha tenido dos ataques y presenta pruebas clínicas de dos lesiones o pruebas clínicas de una lesión y pruebas paraclínicas de otra lesión independiente. La EM puede diagnosticarse también por pruebas de dos ataques y bandas oligoclonales de IgG en el líquido cefalorraquídeo o una combinación de un ataque, pruebas clínicas de dos lesiones y una banda oligoclonal de IgG en el líquido cefalorraquídeo. Los criterios de McDonald pueden usarse también para el diagnóstico de la EM (McDonald *et al.* 2001, "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis," Ann. Neurol. 50:121-127). Los criterios de McDonald incluyen el uso de pruebas de IRM de la afectación del SNC con el tiempo para su uso en el diagnóstico de la EM en ausencia de ataques clínicos múltiples. El tratamiento eficaz de la esclerosis múltiple puede evaluarse de varias maneras diferentes. Para calibrar la eficacia del tratamiento pueden usarse los parámetros siguientes. Dos criterios ejemplares incluyen: EDSS (escala del estado de discapacidad ampliada) y la aparición de exacerbaciones en IRM (imágenes por resonancia magnética). La EDSS es un procedimiento para la calificación de la afectación clínica debida a la EM (Kurtzke, Neurology 33: 1444, 1983). Se evalúan ocho sistemas funcionales en cuanto al tipo y la gravedad de la afectación neurológica. Brevemente, antes del tratamiento, los pacientes se evalúan en cuanto a la afectación de los sistemas siguientes: piramidal, cerebeloso, del tronco encefálico, sensorial, intestinal y de la vejiga, visual, cerebral y otros. Se llevan a cabo seguimientos a intervalos definidos. La escala se extiende de 0 (normal) a 10 (muerte debida a EM). Una disminución de un grado completo indica un tratamiento eficaz (Kurtzke, Ann. Neurol. 36: 573-79, 1994). Los pacientes pueden diagnosticarse también usando otros criterios usados por los expertos en la técnica.

- 35 **[0113]** Las exacerbaciones se definen por la aparición de un nuevo síntoma que es atribuible a la EM, acompañado de una nueva anomalía neurológica apropiada (grupo de estudio de la EM con IFNB, cita anterior). Además, la exacerbación puede durar al menos 24 horas y estar precedida de estabilidad o mejoría durante al menos 30 días. Brevemente, los pacientes se someten a un examen neurológico estándar por médicos. Las exacerbaciones son leves, moderadas o graves, en función de los cambios en una escala de clasificación neurológica (Sipe y col, Neurology 34: 1368, 1984). Se determinan una tasa de exacerbación anual y la proporción de pacientes sin exacerbaciones.

- 45 **[0114]** El tratamiento puede considerarse eficaz si hay una diferencia estadísticamente significativa en la tasa o proporción de pacientes sin exacerbaciones o sin recaídas entre el grupo tratado y el grupo del placebo para cada una de estas mediciones. Además, también pueden medirse el tiempo hasta la primera exacerbación y la duración y gravedad de la exacerbación. En este sentido, una medida de la eficacia como tratamiento es una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la primera exacerbación o en la duración y gravedad en el grupo tratado comparado con el grupo de control. Un periodo sin exacerbaciones o sin recaídas mayor de un año, 18 meses o 20 meses es especialmente digno de mención. La eficacia puede evaluarse también usando cualquier procedimiento usado en la técnica, por ejemplo, para evaluar los síntomas de la EM, incluida la mejoría de la movilidad mediante una prueba de caminata cronometrada usada sola o en combinación con otros criterios.

- 50 **[0115]** La eficacia de la administración de un primer agente y, opcionalmente, un segundo agente puede evaluarse también sobre la base de uno o más de los criterios siguientes: frecuencia de linfocitos T reactivos a MBP determinada por dilución limitante, respuesta de proliferación de líneas y clones de linfocitos T reactivos a MBP, perfiles de citocina de líneas y clones de linfocitos T en respuesta a MBP establecidos en pacientes. La eficacia se indica por una disminución de la frecuencia de las células reactivas, una reducción de la incorporación de timidina con péptidos alterados en comparación con los nativos y una reducción de TNF e INF- α .

[0116] Las mediciones clínicas incluyen la tasa de recaída en intervalos de uno y dos años y un cambio en la EDSS, incluido el tiempo hasta la progresión desde el valor inicial de 1,0 unidades en la EDSS que persiste durante seis meses. En una curva de Kaplan-Meier, un retraso en la progresión mantenida de la discapacidad muestra eficacia. Otros criterios incluyen un cambio en el área y volumen de imágenes T2 en IRM y el número y volumen de las lesiones determinados mediante imágenes intensificadas con gadolinio.

[0117] Las IRM pueden usarse para medir las lesiones activas mediante imágenes intensificadas con gadolinio-DTPA (McDonald *et al.*, Ann. Neurol. 36: 14, 1994) o la localización y extensión de las lesiones mediante técnicas ponderadas por T2. Brevemente, se obtienen IMR de referencia. El mismo plano de obtención de la imagen y la misma posición del paciente se usan en los estudios subsiguientes. La posición y las secuencias de obtención de imágenes pueden elegirse para maximizar la detección de las lesiones y facilitar el trazado de las lesiones. La misma posición y las mismas secuencias de obtención de imágenes pueden usarse en los estudios subsiguientes. La presencia, localización y extensión de las lesiones de EM puede ser determinada por los radiólogos. El área de las lesiones puede delimitarse y sumarse corte a corte para obtener el área total de la lesión. Pueden hacerse tres análisis: pruebas de nuevas lesiones, tasa de aparición de lesiones activas y porcentaje de cambio en el área de la lesión (Paty *et al.*, Neurology 43: 665, 1993). Una mejoría debida al tratamiento puede establecerse mediante una mejoría estadísticamente significativa en un paciente individual comparado con el valor de referencia o en un grupo tratado en comparación con un grupo de placebo.

[0118] Algunos ejemplos de síntomas asociados con la esclerosis múltiple que pueden tratarse con los procedimientos descritos en este documento incluyen: neuritis óptica, diplopia, nistagmo, dismetría ocular, oftalmoplejia internuclear, fosfenos de movimiento y sonido, defecto pupilar aferente, paresia, monoparesia, paraparesia, hemiparesia, cuadriparesia, plejia, paraplejia, hemiplejia, tetraplejia, cuadruplejia, espasticidad, disartria, atrofia muscular, espasmos, calambres, hipotonía, clono, mioclono, mioquimia, síndrome de las piernas inquietas, pie caído, reflejos disfuncionales, parestesia, anestesia, neuralgia, dolor neuropático y neurogénico, fenómeno de Lhermitte, disfunción propioceptiva, neuralgia trigeminal, ataxia, temblor intencional, dismetría, ataxia vestibular, vértigo, ataxia del habla, distonía, disdiadococinesia, micción frecuente, espasticidad de la vejiga, vejiga flácida, disinergia detrusoresfinteriana, disfunción eréctil, anorgasmia, frigidez, estreñimiento, urgencia fecal, incontinencia fecal, depresión, disfunción cognitiva, demencia, cambios de humor, debilidad emocional, euforia, síndrome bipolar, ansiedad, afasia, disfasia, fatiga, síntoma de Uhthoff, reflujo gastroesofágico y trastornos del sueño.

[0119] Cada caso de EM muestra uno o varios patrones de presentación y evolución posterior. En el caso más común, la EM se manifiesta primeramente como una serie de ataques seguidos de remisiones totales o parciales al disminuir los síntomas misteriosamente para reaparecer más tarde después de un periodo de estabilidad. Es lo que se denomina EM de recaída y remisión (RR). La EM primariamente progresiva (PP) se caracteriza por un empeoramiento clínico gradual sin remisiones perceptibles, aunque puede haber periodos de estabilidad temporal o pequeños alivios de los síntomas. La EM secundariamente progresiva (SP) comienza con una evolución de recaída y remisión seguida más tarde por una evolución primaria progresiva. En raras ocasiones, los pacientes pueden tener una evolución de recaídas progresivas (RP) en la que la enfermedad sigue una ruta progresiva puntualizada por ataques agudos. A veces, las formas PP, SP y RP se agrupan conjuntamente bajo el nombre de EM progresiva crónica.

[0120] Algunos pacientes padecen EM maligna, definida como un empeoramiento rápido y persistente que resulta en una discapacidad significativa o incluso en la muerte al poco tiempo de la aparición de la enfermedad. Este empeoramiento puede detenerse o desacelerarse mediante la administración de un tratamiento combinado descrito en este documento.

[0121] La administración de un anticuerpo contra $\alpha 4$ presentado en este documento puede ser eficaz para aliviar uno o más síntomas de la EM, como uno o más de los síntomas descritos anteriormente. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo contra $\alpha 4$ descrito en este documento puede usarse para tratar la esclerosis múltiple primaria o secundariamente progresiva (EMPP o EMSP, respectivamente) y el tratamiento con un anticuerpo contra $\alpha 4$ puede ser eficaz para prevenir la recaída.

[0122] Además o antes de los estudios en humanos, puede usarse un modelo animal para evaluar la eficacia del uso de los dos agentes. Un ejemplo de modelo animal para la esclerosis múltiple es el modelo de ratón de encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE), por ejemplo, tal como se describe en Tuohy *et al.* (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel *et al.* (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401) y Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129). A los ratones puede administrárseles un primer y un segundo agente descritos en este documento antes de la

inducción de la EAE. Después, los ratones se evalúan en cuanto a criterios característicos para determinar la eficacia del uso de los dos agentes en el modelo.

Generación de anticuerpos

5

[0123] Los anticuerpos recombinantes que se unen a $\alpha 4$ pueden generarse por procedimientos *in vivo* o *in vitro* como el despliegue en fagos. Los procedimientos pueden usarse para suministrar las CDR contra $\alpha 4$ para uso en los anticuerpos con CDR injertadas descritos en este documento. Además, los procedimientos como el despliegue en fagos pueden usarse para seleccionar tales CDR en el contexto de los armazones de la línea germinal descritos en este documento, como mediante el uso de un banco en el que el armazón es un armazón de la línea germinal.

10

[0124] El documento EP 239400 (Winter *et al.*) describe la alteración de anticuerpos por sustitución (dentro de una región variable dada) de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie por las de otra especie. Puede ser menos probable que los anticuerpos con CDR sustituidas desencadenen una respuesta inmunitaria en humanos en comparación con anticuerpos realmente quiméricos, ya que los anticuerpos con CDR sustituidas contienen considerablemente menos componentes no humanos. (Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534-1536). Típicamente, se sustituyen las CDR de un anticuerpo murino en las regiones correspondientes de un anticuerpo humano mediante tecnología de ácidos nucleicos recombinantes para producir secuencias codificantes del anticuerpo sustituido deseado. Pueden añadirse segmentos génicos de las regiones constantes del isotipo deseado (normalmente γ -I para CH y κ para CL) y los genes de las cadenas pesada y ligera pueden coexpresarse en células de mamíferos para producir un anticuerpo soluble. También pueden usarse extensos bancos de despliegue en fagos para aislar anticuerpos de alta afinidad que pueden desarrollarse como agentes terapéuticos para humanos mediante la tecnología estándar de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* (1998) Immunotechnology 4: 1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) Immunol. Today 2: 371-8; y el documento U.S. 2003-0232333).

15

20

25

[0125] Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra $\alpha 4$ descrito en este documento puede reconocer epítopos de la subunidad $\alpha 4$ que están implicados en la unión a un ligando afín, por ejemplo, VCAM-1 o fibronectina. Los anticuerpos descritos en este documento pueden inhibir la unión a uno o más de los ligandos afines (por ejemplo, VCAM-1 y fibronectina).

30

[0126] En algunas realizaciones, los anticuerpos presentados en este documento pueden interactuar con VLA-4 en células, por ejemplo linfocitos, pero no causar agregación celular.

35

[0127] Un ejemplo de anticuerpo que se une a $\alpha 4$ tiene una o más CDR, por ejemplo, las tres CDR de la cadena pesada (HC) y/o las tres CDR de la cadena ligera (LC) de un anticuerpo concreto descrito en este documento, o CDR que son, en conjunto, idénticas en al menos el 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % a las de un anticuerpo semejante. En una realización, los bucles hipervariables H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en este documento. En una realización, los bucles hipervariables L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en este documento.

40

[0128] En una realización, la secuencia aminoacídica de la secuencia del dominio variable de la HC y/o LC es idéntica en al menos el 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o el 100 % a la secuencia aminoacídica del dominio variable de la HC y/o LC de un anticuerpo descrito en este documento. La secuencia aminoacídica de la secuencia del dominio variable de la HC y/o LC puede diferir en al menos un aminoácido, pero no más de diez, ocho, seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos de la secuencia correspondiente de un anticuerpo descrito en este documento. Por ejemplo, las diferencias pueden corresponder primaria o totalmente a las regiones de armazón.

45

[0129] Las secuencias aminoacídicas de las secuencias de los dominios variables de las HC y LC pueden estar codificadas por una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones de alta astringencia con una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento o una secuencia que codifica un dominio variable o una secuencia aminoacídica descrita en este documento. En una realización, las secuencias aminoacídicas de una o más regiones de armazón (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) del dominio variable de la HC y/o LC son idénticas en al menos el 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o el 100 % a las regiones de armazón correspondientes de los dominios variables de las HC y LC de un anticuerpo descrito en este documento. En una realización, una o más de las regiones de armazón de la cadena pesada o ligera (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 de la HC) son idénticas en al menos el 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o el 100 % a la secuencia de las regiones de armazón correspondientes de un anticuerpo de la línea germinal humana.

50

55

[0130] Los cálculos de "homología" o de "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan de forma intercambiable en este documento) se realizan de la manera siguiente. Las secuencias se alinean con el fin de una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o las dos de una primera y una segunda secuencia aminoacídica o secuencia de ácido nucleico para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para la comparación). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación obtenida usando el programa GAP del paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 y una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco por desfase del marco de lectura de 5. Entonces se comparan los restos aminoacídicos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto aminoacídico o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en este documento, "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas que comparten las secuencias.

[0131] Tal como se usa en este documento, la expresión "hibrida en condiciones de alta astringencia" describe las condiciones de hibridación y lavado. Una orientación para llevar a cabo las reacciones de hibridación puede encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1989), 6.3.1-6.3.6. En dicha referencia se describen procedimientos acuosos y no acuosos, ambos de los cuales pueden usarse. La hibridación en condiciones de alta astringencia incluye la hibridación en 6x SSC a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C o condiciones sustancialmente similares.

Producción de anticuerpos

[0132] Los anticuerpos pueden producirse en células procariontes y eucariotas. En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, scFV) se expresan en una célula de levadura como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers *et al.* (2001) J. Immunol. Methods 251: 123-35), *Hansenula* o *Saccharomyces*.

[0133] En una realización, los anticuerpos, especialmente anticuerpos completos, por ejemplo, IgG, se producen en células de mamíferos. Algunos ejemplos de células hospedadoras de mamíferos para expresión recombinante incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células CHO *dhfr*-, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562 y células de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

[0134] Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinante pueden contener secuencias de ácido nucleico adicionales, como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores seleccionables. Los genes de marcadores seleccionables facilitan la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Algunos ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato-reductasa (DHFR) (para usar en células hospedadoras *dhfr* con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

[0135] En un sistema ejemplar de expresión recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo completo o una porción de unión antigénica del mismo), un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO *dhfr*- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están ligados operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformadas seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo completo se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos pueden aislarse por cromatografía de afinidad con proteína A o proteína

G. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a $\alpha 4$ purificados pueden concentrarse a de aproximadamente 100 mg/ml a 200 mg/ml usando técnicas de concentración de proteínas conocidas en la técnica.

- [0136]** Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función del Fc, por ejemplo, para reducir o eliminar la interacción con un receptor del Fc, con C1q o con los dos. Por ejemplo, la región constante de la IgG4 humana puede tener una mutación de Ser a Pro en el resto 228 para fijar la región bisagra. La secuencia aminoacídica de un Fc de IgG4 (dominios bisagra + CH2 + CH3) se proporciona en la figura 5.
- 10 **[0137]** En otro ejemplo, la región constante de la IgG1 humana puede estar mutada en uno o más restos, por ejemplo, uno o más de los restos 234 y 237, por ejemplo, según la numeración en la patente de los EE. UU. n.º 5.648.260. Otros ejemplos de modificaciones incluyen aquellos descritos en la patente de los EE. UU. n.º 5.648.260.
- 15 **[0138]** Para algunos anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos puede diseñarse para sintetizar anticuerpos en los que la región Fc esté glucosilada. En otro ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glucosilado en la asparragina 297 del dominio CH2 (véase la figura 5). Esta asparragina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. La glucosilación participa en las funciones efectoras mediadas por los receptores del Fc γ y el complemento C1q (Burton y Woof (1992) *Adv. Immunol.* 51: 1-84; Jefferis *et al.* (1998) *Immunol. Rev.* 163: 59-76). El dominio Fc puede producirse en un sistema de expresión de mamíferos que glucosile adecuadamente el resto correspondiente a la asparragina 297. El dominio Fc puede incluir también otras modificaciones postranslacionales eucarióticas.
- 20 **[0139]** Otras modificaciones adecuadas del dominio Fc incluyen aquellas descritas en el documento WO 2004/029207. Por ejemplo, el dominio Fc puede ser un Fc XmAb® (Xencor, Monrovia, CA, EE. UU.). El dominio Fc, o un fragmento del mismo, puede tener una sustitución en la región de unión a un receptor del Fc γ (Fc γ R), como los dominios y fragmentos descritos en el documento WO 05/063815. En algunas realizaciones, el dominio Fc, o un fragmento del mismo, tiene una sustitución en la región de unión al receptor del Fc neonatal (FcRn), como los dominios y fragmentos descritos en el documento WO 05047327. En otras realizaciones, el dominio Fc es una sola cadena o un fragmento de la misma, o una versión modificada de la misma como las descritas en el documento WO 30 2008143954. Otras modificaciones adecuadas del Fc son conocidas y están descritas en la técnica.
- [0140]** Los anticuerpos también pueden producirse en un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.849.992 describe un procedimiento para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un animal transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de la leche y secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo descrito en este documento y una secuencia señal para secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretado en la misma, el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo descrito en este documento. El anticuerpo puede purificarse de la leche o, para algunas aplicaciones, usarse directamente.
- 35 **[0141]** Los anticuerpos pueden modificarse, por ejemplo, con una fracción que mejora su estabilización y/o retención en la circulación, por ejemplo, en la sangre, suero, linfa, lavado broncoalveolar u otros tejidos, por ejemplo, al menos 1,5, 2, 5, 10 o 50 veces.
- [0142]** Por ejemplo, un anticuerpo que se une a VLA-4 puede asociarse con un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, como un óxido de polialquileno o un óxido de polietileno. Los polímeros adecuados pueden variar sustancialmente en peso. Pueden usarse polímeros con pesos moleculares promedio en número en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 Da (o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000 y de 2.000 a aproximadamente 12.500).
- 40 **[0143]** Por ejemplo, un anticuerpo que se une a VLA-4 puede conjugarse con un polímero soluble en agua, por ejemplo, un polímero hidrófilo de polivinilo, por ejemplo, alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de tales polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno) como polietilenglicol (PEG) o propilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloques de los mismos, siempre que la solubilidad en agua de los copolímeros de bloques se mantenga. Otros polímeros útiles adicionales incluyen polioxialquilenos como polioxietileno, polioxipropileno, y copolímeros de bloques de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o sin ramificar que comprenden los monómeros sacáridos D-manosa, D y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico (por ejemplo, ácido polimanurónico o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico, incluidos homopolisacáridos y heteropolisacáridos
- 55

como lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietilalmidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glucógeno o la subunidad de polisacárido de mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcares como polisorbitol y polimanitol; heparina o heparona.

5 Ejemplos de segundos agentes

[0144] En algunos casos, las formulaciones descritas en este documento, por ejemplo, formulaciones que contienen un anticuerpo que se une a $\alpha 4$, incluyen un segundo agente o se administran en combinación con una formulación que contiene un segundo agente.

10

[0145] En una implementación, el anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y el segundo agente se proporcionan como coformulación y la coformulación se administra al sujeto. Además, es posible, por ejemplo, al menos 24 horas antes o después de administrar la coformulación, administrar por separado una dosis de la formulación del anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y después una dosis de una formulación que contiene el segundo agente. En otra implementación, el anticuerpo y el segundo agente se proporcionan como formulaciones separadas y la etapa de administración incluye administrar secuencialmente el anticuerpo y el segundo agente. Las administraciones secuenciales pueden proporcionarse el mismo día (por ejemplo, con una hora de diferencia entre sí o con al menos 3, 6 o 12 horas de diferencia) o en días diferentes.

15

[0146] Generalmente, el anticuerpo y el segundo agente se administran cada uno como una pluralidad de dosis separadas en el tiempo. El anticuerpo y el segundo agente se administran generalmente de acuerdo con un régimen. El régimen para uno o los dos puede tener una periodicidad regular. El régimen para el anticuerpo puede tener una periodicidad diferente a la del régimen para el segundo agente, por ejemplo, uno puede administrarse con mayor frecuencia que el otro. En una implementación, uno de los dos, anticuerpo y segundo agente, se administra una vez a la semana y el otro una vez al mes. En otra implementación, uno de los dos, anticuerpo y segundo agente, se administra de forma continuada, por ejemplo, durante un periodo de más de 30 minutos, pero de menos de 1, 2, 4 o 12 horas y el otro se administra como un bolo. El anticuerpo y el segundo agente pueden administrarse por cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

20

25

[0147] En algunas realizaciones, cada uno los dos, anticuerpo y segundo agente, se administra en la misma dosis que se prescribe para un monoterapia. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra en una dosis que es igual o menor que la cantidad requerida para su eficacia si se administra solo. Igualmente, el segundo agente puede administrarse en una dosis que es igual o menor que la cantidad requerida para su eficacia si se administra solo.

30

35

[0148] Algunos ejemplos no limitantes de segundos agentes para el tratamiento de la esclerosis múltiple en combinación con un anticuerpo que se une a $\alpha 4$ incluyen:

40

- interferones, por ejemplo, interferón β -1a humano (por ejemplo, AVONEX® o Rebif®) e interferón β -1b (BETASERON™, interferón β humano sustituido en la posición 17; Berlex/Chiron);

- acetato de glatirámico (denominado también copolímero 1, Cop-1, COPAXONE™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);

45

- Rituxan® (rituximab) u otros anticuerpos contra CD20, por ejemplo, uno que compite con rituximab o se une a un epítipo solapante con el mismo;

- mitoxantrona (NOVANTRONE®, Lederle);

50

- un agente quimioterapéutico, por ejemplo, cladribina (LEUSTATIN®), azatioprina (IMURAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®), ciclosporina A, metotrexato, 4-aminopiridina y tizanidina;

- un corticosteroide, por ejemplo, metilprednisolona (MEDRONE®, Pfizer), prednisona;

55

- una inmunoglobulina, por ejemplo, Rituxan® (rituximab); CTLA4-Ig; alemtuzumab (MabCAMPATH®) o daclizumab (un anticuerpo que se une a CD25);

- estatinas; y

- antagonistas de TNF.

[0149] El acetato de glatirámero es una proteína formada por una cadena aleatoria de los aminoácidos: ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina (de ahí el nombre GLATirámero). El acetato de glatirámero puede sintetizarse en disolución a partir de estos aminoácidos, en una relación de aproximadamente 5 partes de alanina por 3 partes de lisina, 1,5 partes de ácido glutámico y 1 parte de tirosina, usando anhídridos de *N*-carboxiaminoácidos.

[0150] Otros segundos agentes adicionales incluyen anticuerpos o antagonistas de otras citocinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF y PDGF. Otros ejemplos más de segundos agentes incluyen anticuerpos contra moléculas de la superficie celular como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86 y CD90 o sus ligandos. por ejemplo, daclizumab es un anticuerpo contra CD25 que puede mejorar la esclerosis múltiple.

[0151] Otros anticuerpos ejemplares adicionales incluyen anticuerpos que proporcionan una actividad de un agente descrito en este documento, como un anticuerpo que se une a un receptor de interferón, por ejemplo, un receptor de interferón β . Típicamente, en implementaciones en las que el segundo agente incluye un anticuerpo, este se une a una proteína diana diferente de VLA-4 o diferente de la integrina $\alpha 4$, o al menos a un epítipo de VLA-4 diferente del reconocido por el primer agente.

[0152] Aún otros ejemplos adicionales de segundos agentes incluyen: FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por las citocinas proinflamatorias según se describen en este documento, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (por ejemplo, Vx740), anticuerpos contra P7, PSGL, inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de los linfocitos T como inhibidores de cinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalacina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina solubles y derivados de los mismos, según se describen en este documento, y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF).

[0153] En algunas realizaciones puede usarse un segundo agente para tratar uno o más síntomas o efectos secundarios de la EM. Tales agentes incluyen, por ejemplo, amantadina, baclofeno, papaverina, medicina, hidroxicina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, docusato, pemolina, dantroleno, desmopresina, dexametasona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, bisacodilo, venlafaxina, amitriptilina, metenamina, clonacepán, isoniácida, vardenafilo, nitrofurantoína, muciloide hidrófilo de *Psyllium*, alprostadilo, gabapentina, nortriptilina, paroxetina, bromuro de propantelina, modafinilo, fluoxetina, fenazopiridina, metilprednisolona, carbamacepina, imipramina, diacepán, sildenafil, bupropión y sertralina. Muchos segundos agentes que son pequeñas moléculas tienen un peso molecular entre 150 y 5.000 Da.

[0154] Algunos ejemplos de antagonistas de TNF incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos antigénicos de los mismos) contra TNF (por ejemplo, TNF α humano) como D2E7 (anticuerpo humano contra TNF α , patente de los EE. UU. n.º 6.258.562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo humanizado contra TNF α ; Celltech/Farmacía), cA2 (anticuerpo quimérico contra TNF α , REMICADE™; Centocor); fragmentos de anticuerpos contra TNF (por ejemplo, CPD870); fragmentos solubles de los receptores de TNF, por ejemplo los receptores p55 o p75 de TNF humano o derivados de los mismos, por ejemplo, 75kdTNFR-IgG (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kDa e IgG, ENBRELE™; Immunex; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) vol. 37, pág. 295; *J. Invest. Med.* (1996) vol. 44, 235 A), p55kdTNFR-IgG (proteína de fusión del receptor de TNF de 55 kDa e IgG (LENERCEPT™)); antagonistas enzimáticos, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE) (por ejemplo, un derivado del ácido α -sulfonilhidroxámico, documento WO 01155112, y el inhibidor de TACE de *N*-hidroxiformamida GW 3333, -005 o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína soluble que se une a TNF; véase, por ejemplo *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, n.º 9 (suplemento), pág. 284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) vol. 268, págs. 37-42).

[0155] Además de un segundo agente, también es posible administrar otros agentes al sujeto. Sin embargo, en algunas realizaciones no se administra como composición farmacéutica al sujeto ninguna otra proteína ni ningún otro producto biológico distintos del anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y el segundo agente. El anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y el segundo agente pueden ser los únicos agentes que se administran por inyección. En realizaciones en las que el segundo agente es una proteína recombinante, el anticuerpo que se une a $\alpha 4$ y el segundo agente pueden ser los únicos agentes recombinantes administrados al sujeto o al menos los únicos agentes recombinantes que modulan las respuestas inmunitaria e inflamatoria. En otras realizaciones más, el anticuerpo que se une a $\alpha 4$ solo es el único

agente recombinante o el único producto biológico administrado al sujeto.

[0156] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o en las pruebas de la invención pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

10

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

[0157] Los anticuerpos contra VLA-4 se construyeron usando el armazón de IGKV4-1 de la línea germinal (diseños L1 y L2) o de AAH7033.1 genomanipulado en la línea germinal (diseño L3) para la cadena VL y el armazón de IGHV1-f de la línea germinal para la VH. Estos anticuerpos tenían menos retromutaciones que el anticuerpo humanizado HP1/2 descrito en la patente de los EE. UU. n.º 6.602.503.

Variaciones de la cadena pesada

[0158] Las secuencias de tres variaciones de la cadena pesada se muestran en la figura 1 como diseño H0, diseño H1 y diseño H2. Cada diseño tiene las CDR de HP1/2 murino injertadas en el armazón de IGHV1-f. El diseño H0 no incluye retromutaciones de las regiones de armazón, mientras que los diseños H1 y H2 tienen varios grados de retromutaciones en las secuencias de las regiones de armazón para optimizar la afinidad del anticuerpo humanizado.

25

Variaciones de la cadena ligera

[0159] Las secuencias de cuatro variaciones de la cadena ligera se muestran en la figura 2 como diseño L0, diseño L1, diseño L2 y diseño L3 (también denominadas L0, L1, L2 y L3). Cada diseño tiene las CDR de HP1/2 murino injertadas en el armazón de la línea germinal. Para los diseños L0, L1 y L2 se usó el armazón de IGKV4-1 de la línea germinal y para el diseño L3 se usó el armazón de AAH70335 genomanipulado en la línea germinal. El diseño L0 no incluye retromutaciones en las regiones de armazón, mientras que los diseños L1, L2 y L3 tienen varios grados de retromutaciones en las regiones de armazón para optimizar la afinidad del anticuerpo humanizado.

[0160] Los resultados de ensayos ELISA de competición se muestran en la tabla 1 y la figura 3. En este experimento, se preincubó $\alpha 4\beta 1$ con el mAb de ensayo y después se usó HP1/2 murino como reactivo competitivo. Los resultados de este experimento indicaron que los anticuerpos con las cadenas ligeras L2 o L3 eran más potentes que el anticuerpo humanizado HuHP1/2 descrito en la patente de los EE. UU. n.º 6.602.503. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación y en la figura 3. La cadena pesada (H1) en los anticuerpos de este ensayo tenía la secuencia del "diseño H1" mostrada en la figura 1, mientras que L1 se refiere al diseño L1 de la figura 2.

40

Tabla 1. Ensayo de competición mediante ELISA

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

[0161] En la tabla 1, el mAb quimérico es un anticuerpo HP1/2 quimerizado, en el que las cadenas variables murinas pesada y ligera están fusionadas genéticamente a regiones constantes de IgG1 humana. Este anticuerpo es esencialmente idéntico en cuanto a afinidad de unión al anticuerpo HP1/2 murino original (Sánchez-Madrid *et al.*, Eur. J. Immunol. 16: 1343-1349, 1996). Los resultados del experimento indican que es posible mejorar la afinidad del anticuerpo monoclonal con respecto a la secuencia parental murina a través de la humanización en un armazón aceptor genomanipulado en la línea germinal.

50

[0162] Otro ensayo de competición compara la afinidad de unión de los nuevos anticuerpos con el anticuerpo humanizado contra $\alpha 4$ 21.6 (Tysabri® (natalizumab)), descrito en el documento U.S. 5.840.299. En este experimento

se ensayó la unión a $\alpha\beta 1$ de una mezcla de HP1/2 de ratón con los mAb de ensayo. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 4 y en la tabla 2 a continuación e indican que los anticuerpos de nuevo diseño son aproximadamente 10 veces más potentes que natalizumab.

5

Tabla 2. Ensayo de competición mediante ELISA

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

Ejemplo 2. El anticuerpo HP1/2 humanizado (HuHP1/2) se une VLA-4 en líneas celulares tumorales.

[0163] La unión del anticuerpo contra VLA-4 HuHP1/2 a diversas líneas celulares se analizó mediante citometría de flujo. La unión se analizó en las líneas celulares de LLC (leucemia linfocítica crónica) Mec1 y JM1, en las líneas celulares de MM (mieloma múltiple) U266 y H929 y en las líneas celulares de LMA (leucemia mielógena aguda) HL60 y KG1. HuHP1/2 se unió a todas las líneas celulares tumorales probadas (figura 6). Los datos de citometría de flujo se usaron para calcular los valores de la CE50 para la unión del anticuerpo a cada una de las diferentes líneas celulares. La información se muestra a continuación en la tabla 3.

15

[0164] También se encontró que HuHP1/2 bloqueaba la adhesión de las líneas celulares de LMA a fibronectina (FN) y a la proteína de fusión VCAM-1-Ig. Para analizar si el anticuerpo podría bloquear la adhesión, se permitió la adhesión de las líneas celulares de LMA HL60 y KG1 a pocillos recubiertos con FN (figura 7A) o pocillos recubiertos con VCAM1-Ig (figura 7B) en presencia de concentraciones crecientes de HP1/2 o del anticuerpo de control de isotipo. HuHP1/2 bloqueó la adhesión de los dos tipos de células a los pocillos recubiertos con FN y a los pocillos recubiertos con VCAM1-Ig. La máxima inhibición de la unión de las células HL60 a los dos ligandos se alcanzó con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2 (figura 7C).

[0165] También se encontró que HuHP1/2 bloqueaba la adhesión de las líneas celulares de MM a FN y a la proteína de fusión VCAM-1-Ig. Se permitió la adhesión de las líneas celulares de MM U266 y H929 a pocillos recubiertos con FN (figura 8A) o pocillos recubiertos con VCAM1-Ig (figura 8B) en presencia de concentraciones crecientes de HP1/2 o del anticuerpo de control de isotipo. HuHP1/2 bloqueó la adhesión de los dos tipos de líneas celulares a los pocillos recubiertos con FN y con VCAM1-Ig. La máxima inhibición de la unión de las células U266 a los dos ligandos se alcanzó con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2 (figura 8C).

30

[0166] También se encontró que HuHP1/2 bloqueaba la adhesión de las líneas celulares de LLC a FN y a la proteína de fusión VCAM-1-Ig. Se permitió la adhesión de las líneas celulares de LLC Mec1 y JM1 a pocillos recubiertos con FN (figura 9A) o pocillos recubiertos con VCAM1-Ig (figura 9B) en presencia de concentraciones crecientes de HP1/2 o del anticuerpo de control de isotipo. HuHP1/2 bloqueó la adhesión de los dos tipos de líneas celulares a los pocillos recubiertos con FN y con VCAM1-Ig. La máxima inhibición de la unión de las células Mec1 a los dos ligandos se alcanzó con 20 $\mu\text{g/ml}$ de HuHP1/2 (figura 9C).

[0167] Los valores de la CI50 para la unión de HuHP1/2 a las líneas celulares tumorales se calcularon a partir de los datos mostrados en las figuras 7-9. Estos datos se muestran en la tabla 3.

40

Tabla 3. Cuantificación de HuHP1/2 en líneas celulares tumorales

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

[0168] Otras realizaciones se encuentran en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo recombinante o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$ que comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, en la que:
- 5
- (a) la cadena pesada variable comprende la secuencia del armazón de la cadena pesada variable de IGHV1-f y las CDR de la cadena VH del anticuerpo murino HP1/2, en la que CDR1 comprende la secuencia GFNIKDTYM, CDR2 comprende la secuencia RIDPASGDTKYDPKFQV y CDR3 comprende la secuencia GMWVSTGYALDF; y
- (b) la cadena ligera variable comprende la secuencia del armazón de la cadena ligera variable de IGKV4-1 y las CDR de la cadena VL del anticuerpo murino HP1/2, en la que CDR1 comprende la secuencia KASQSVTNDVA, CDR2 comprende la secuencia YASNRYT y CDR3 comprende la secuencia QQDYSSPYT, en la que:
- 10
- (i) los restos aminoacídicos en las posiciones 1, 67 y 87 del armazón de la cadena ligera variable según el esquema de numeración de Kabat están sustituidos con restos no humanos, en los que el resto no humano en la posición 1 del armazón es serina (S), el resto no humano en la posición 67 del armazón es tirosina (Y) y el resto no humano en la posición 87 del armazón es fenilalanina (F); y
- 15
- (ii) los restos aminoacídicos en las posiciones 24 y 94 del armazón de la cadena pesada variable según el esquema de numeración de Kabat están sustituidos con restos no humanos, en los que el resto no humano en la posición 24 del armazón es alanina (A) y el resto no humano en la posición 94 del armazón es ácido aspártico (D);
- 20
- y en la que la molécula de anticuerpo recombinante o el fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$ se une a VLA-4.
2. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo recombinante contra $\alpha 4$, o un fragmento del mismo que se une a $\alpha 4$, que comprende
- 25
- (a) proporcionar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN que codifica la molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, de la reivindicación 1 y
- (b) cultivar la célula para producir la molécula de anticuerpo recombinante contra $\alpha 4$ o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$.
- 30
3. La molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, de la reivindicación 1 para uso como medicamento en el tratamiento de un paciente.
4. La molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, para uso según la reivindicación 3, en el que el paciente tiene un cáncer.
- 35
5. La molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, para uso según la reivindicación 4, en el que el paciente tiene un tumor sólido, una neoplasia hematológica, un mieloma múltiple o leucemia mielógena aguda (LMA).
- 40
6. La molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, para uso según la reivindicación 3, en el que el paciente tiene un trastorno inflamatorio, esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide, diabetes, neuritis óptica, enfermedad de Crohn, un trastorno agudo, una lesión medular o un traumatismo craneoencefálico.
- 45
7. La molécula de anticuerpo recombinante, o un fragmento de la misma que se une a $\alpha 4$, para uso según la reivindicación 3, en el que el tratamiento comprende además la administración al paciente de un segundo agente terapéutico, seleccionado opcionalmente de entre un agente trombolítico, un agente quimioterapéutico, un agente neuroprotector, un agente antiinflamatorio, un esteroide, una citocina o un factor de crecimiento.
- 50

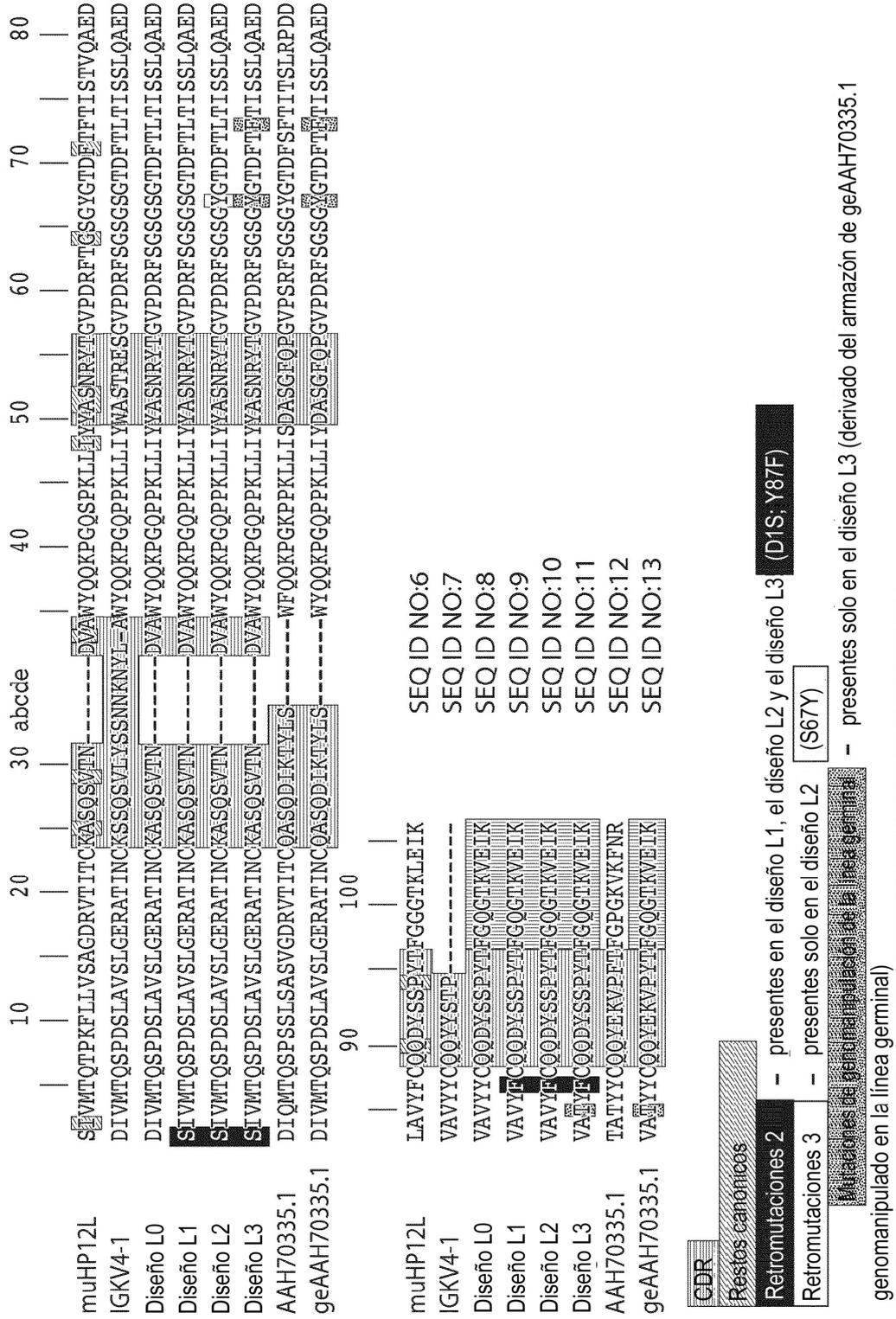


FIG. 2

FIG. 3

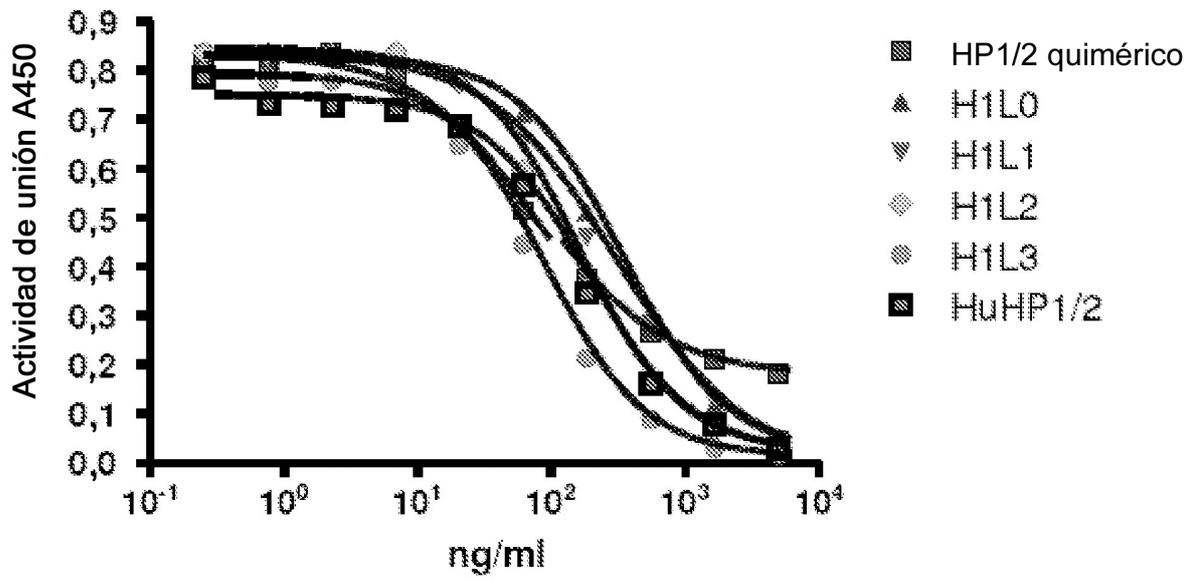


FIG. 4

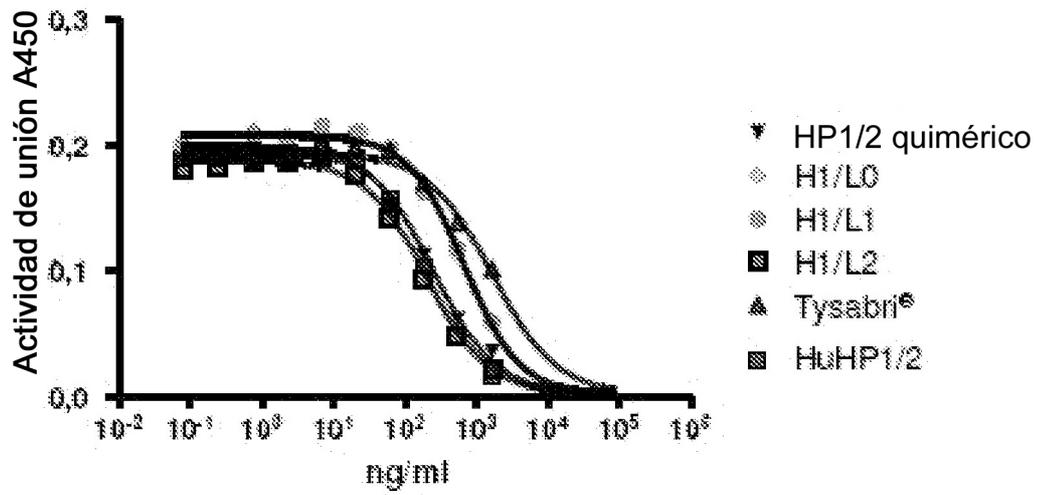


FIG. 5

ESKYGPPCPS**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD**
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKLSLSLGLG

FIG. 6

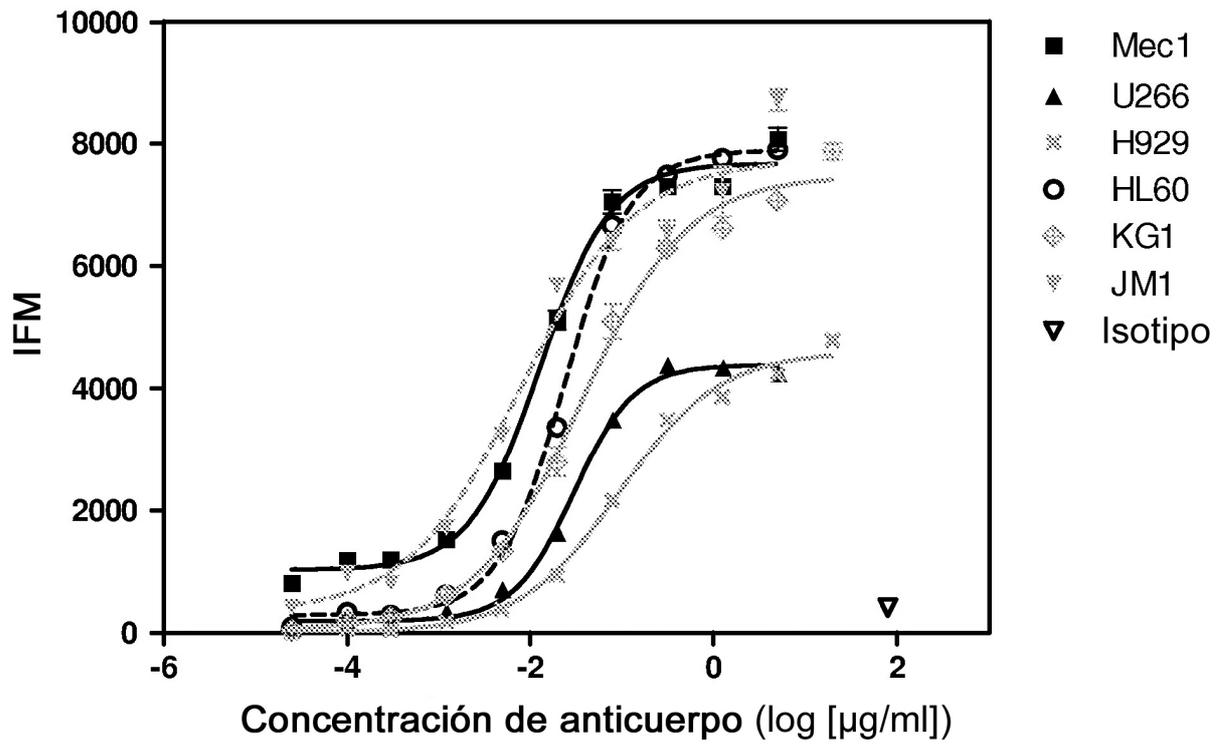


FIG. 7A

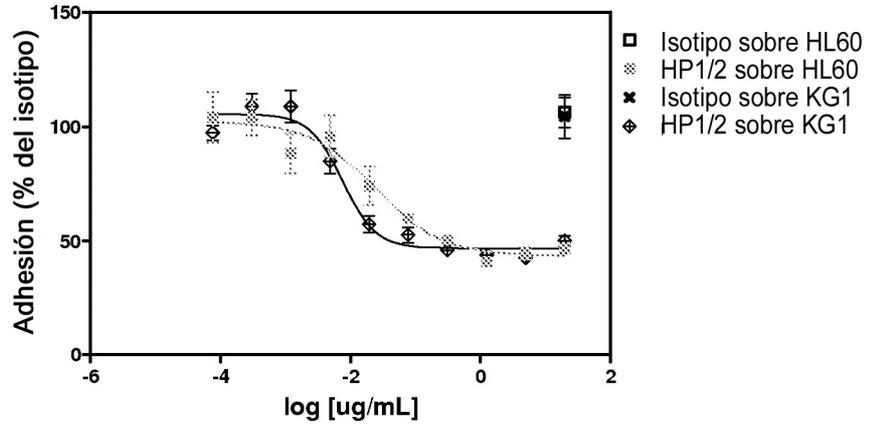


FIG. 7B

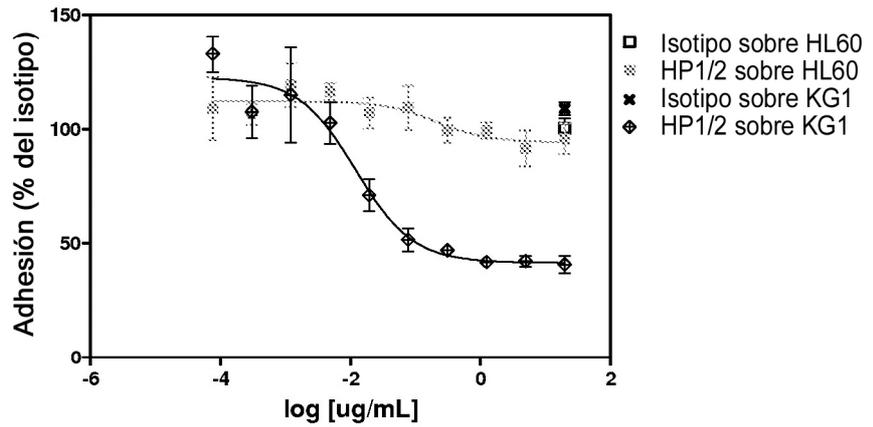


FIG. 7C

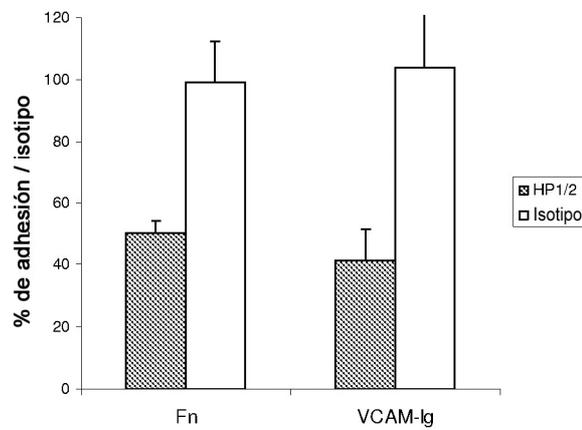


FIG. 8A

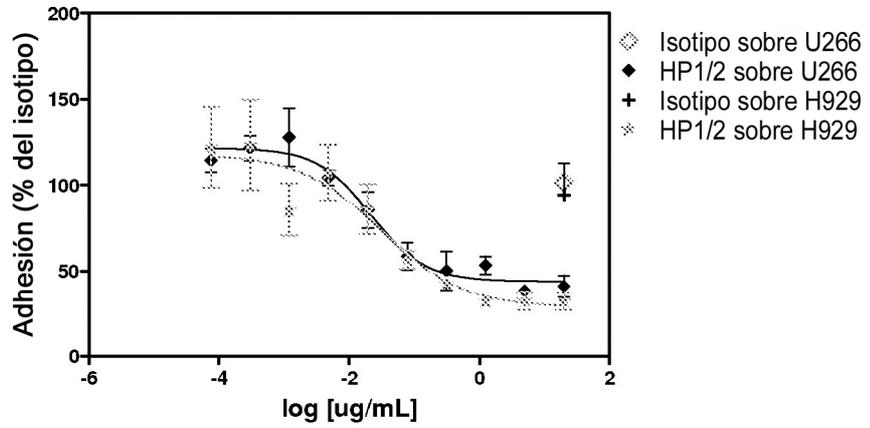


FIG. 8B

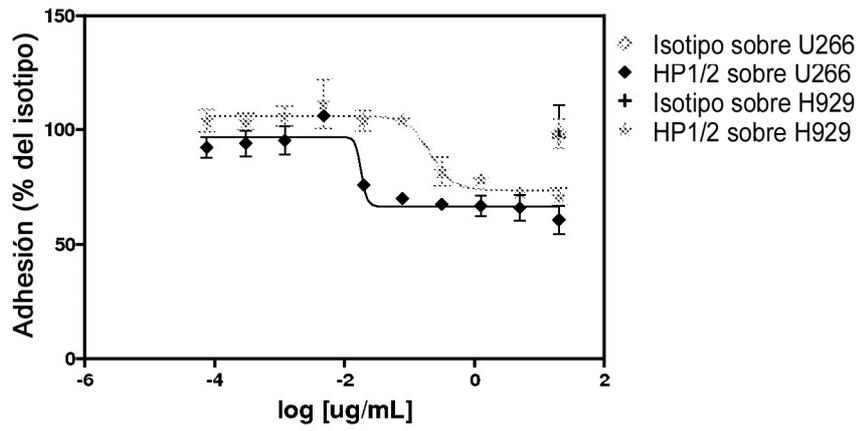


FIG. 8C

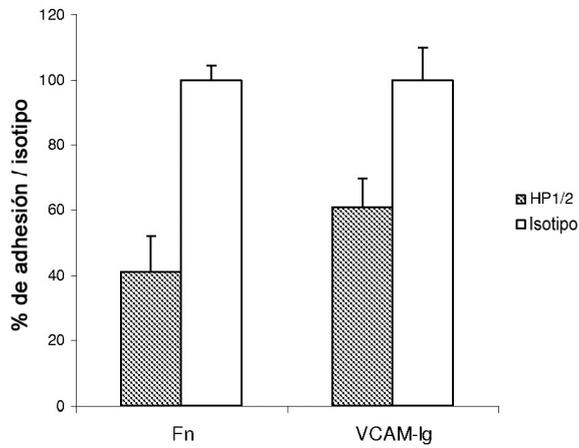


FIG. 9A

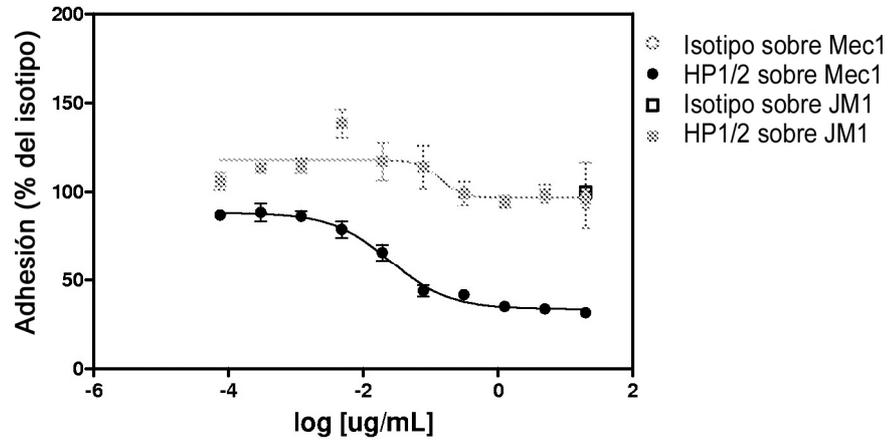


FIG. 9B

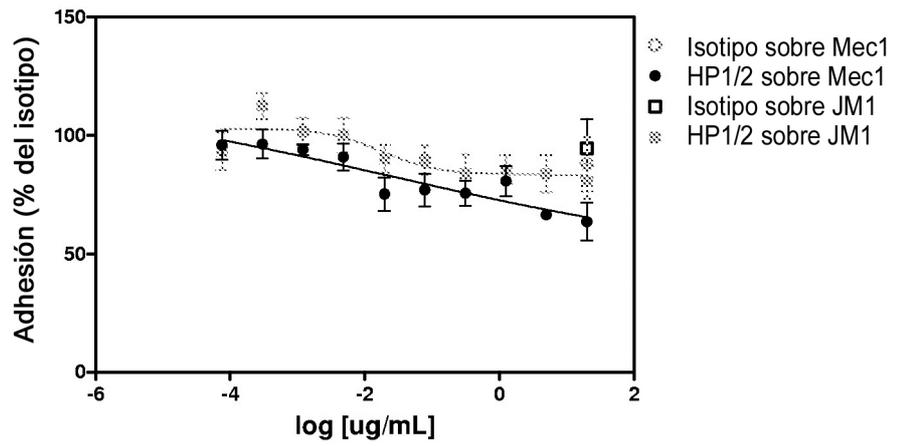


FIG. 9C

