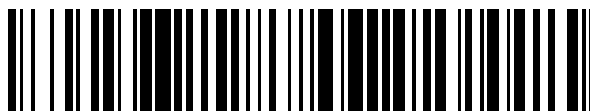


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 815**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2008** **PCT/US2008/066928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008** **WO08157356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008** **E 08771026 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2170390**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpo natalizumab**

30 Prioridad:

14.06.2007 US 944076 P

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

05.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MALONEY, KEVIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 707 815 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

Formulaciones de anticuerpo natalizumab

5 ANTECEDENTES

La esclerosis múltiple (EM) es una de las enfermedades más comunes del sistema nervioso central. Hoy en día, más de 2.500.000 personas en todo el mundo tienen EM.

10 RESUMEN

La invención se basa, en parte, en el desarrollo de formulaciones que contienen altas concentraciones de natalizumab. Algunas realizaciones son adecuadas para la administración a un sujeto, tal como un ser humano, por ejemplo, un paciente humano, mediante administración subcutánea (SC) o intramuscular (IM). Las formulaciones también son adecuadas para administración intravenosa (IV), por ejemplo, cuando se diluyen en una matriz de infusión aceptable (tal como solución salina normal). El anticuerpo de unión a VLA-4 es natalizumab, y la concentración de anticuerpo varía de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml. Las formulaciones proporcionan un efecto terapéutico para un trastorno inflamatorio, inmune o autoinmune. Por ejemplo, la formulación puede proporcionar un efecto terapéutico para un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), tal como esclerosis múltiple (EM).

Basándose en la descripción que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una composición farmacéutica acuosa estable para administración subcutánea o intramuscular a un sujeto, donde la composición comprende natalizumab a una concentración de 120 a 190 mg/ml, un tampón fosfato a una concentración de 5 mM a 30 mM, cloruro de sodio a una concentración entre 100 mM y 200 mM, y polisorbato 80 en una cantidad del 0,01 % al 0,1 % (p/v), y donde la composición tiene un pH 5,5 a pH 6,5, y donde natalizumab comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la descripción presenta una composición farmacéutica acuosa, tal como una composición farmacéutica acuosa estable, que contiene un anticuerpo de unión a VLA-4 a una concentración de aproximadamente 120 a aproximadamente 190 mg/ml (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 135 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml o aproximadamente 165 mg/ml), y un tampón fosfato que tiene aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5.

En algunos casos, la concentración de anticuerpo contra VLA-4 es de aproximadamente 130 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml o aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml. En un caso, la concentración de anticuerpo contra VLA-4 es mayor que aproximadamente 150 mg/ml, por ejemplo, está en un intervalo mayor de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml. En un caso, la concentración de anticuerpo contra VLA-4 es de aproximadamente 150 mg/ml.

En un caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 es un anticuerpo monoclonal humanizado, tal como natalizumab. En otro caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 es una variante de natalizumab. Por ejemplo, en algunos casos, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de natalizumab, y/o la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de natalizumab. En algunos casos, algunas o todas las diferencias son cambios conservadores.

En otro caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 tiene una o ambas de una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 en la Patente de Estados Unidos N.º 5.840.299, y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 en la Patente de Estados Unidos N.º 5.840.299. En otros casos, el anticuerpo contra VLA-4 es una variante de uno de estos anticuerpos. Por ejemplo, en algunos casos, la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos de la secuencia en la SEQ ID NO:7 en la Patente de Estados Unidos N.º 5.840.299, y/o la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos como se define por la SEQ ID NO:11 en la Patente de Estados Unidos N.º 5.840.299.

En aún otro caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 tiene una o ambas de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO:1 en la Tabla 1-1, y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:2 en la

Tabla 1-2. En otros casos, el anticuerpo contra VLA-4 es una variante de uno de estos anticuerpos. Por ejemplo, en algunos casos, la cadena ligera del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO:1, y/o la cadena pesada del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO:2.

Una "diferencia" en la secuencia de aminoácidos, como se usa en este contexto, significa una diferencia en la identidad de un aminoácido (por ejemplo, una sustitución de un aminoácido diferente por un aminoácido en la SEQ ID NO:7 u 11 mencionado anteriormente) o una eliminación o inserción. Una diferencia puede ser, por ejemplo, en una región marco, una CDR, una bisagra o una región constante. Una diferencia puede ser interna o al final de una secuencia de proteína. En algunos casos, algunas o todas las diferencias son cambios conservadores en comparación con la secuencia mencionada.

En ciertas realizaciones, el pH de la composición es de aproximadamente $6,0 \pm 0,5$ (por ejemplo, aproximadamente $5,0 \pm 0,5$, aproximadamente $6,0 \pm 0,5$, aproximadamente $7,0 \pm 0,5$), y la composición del tampón fosfato está entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 30 mM (por ejemplo, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM). En otra realización, la composición comprende además cloruro de sodio; a una concentración de entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM (por ejemplo, aproximadamente 120 mM, 140 mM, 160 mM, 180 mM). En otra realización, la composición comprende clorhidrato de L-arginina, o glicerol. En otra realización, la composición contiene un aminoácido, tal como glicina, a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM (por ejemplo, aproximadamente 220 mM, 240 mM, 260 mM, 280 mM). En otro caso, la composición contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tensioactivo, tal como polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2,0 %, de aproximadamente el 0,004 % a aproximadamente el 0,4 %, de aproximadamente el 0,008 a aproximadamente el 0,2 %, de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 0,08 % (p/v) (por ejemplo, aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,02 %, aproximadamente el 0,03 %, aproximadamente el 0,04 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,06 %, aproximadamente el 0,07 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,5 %).

En ciertos casos, la composición incluye glicerol, y no contiene sustancialmente clorhidrato de L-arginina o cloruro de sodio. En otros casos, la composición incluye clorhidrato de L-arginina, pero sustancialmente nada de glicerol o cloruro de sodio (aparte del tampón fosfato y el clorhidrato de L-arginina). En otras realizaciones, la composición incluye cloruro de sodio, pero sustancialmente nada de glicerol o clorhidrato de L-arginina.

En algunos casos, la formulación del anticuerpo incluye un tampón de histidina, por ejemplo, en lugar de un tampón fosfato, y el tampón de histidina tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente pH 7 (por ejemplo, aproximadamente pH $5,5 \pm 0,5$, pH $6 \pm 0,5$, o pH $6,5 \pm 0,5$). La composición del tampón de histidina está entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM (por ejemplo, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM). La formulación del tampón de histidina también incluye glicerol de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM (por ejemplo, glicerol a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 260 mM, aproximadamente 270 mM, aproximadamente 280 mM) y polisorbato 80 de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2,0 % (p/v) (por ejemplo, aproximadamente el 0,02 %, aproximadamente el 0,03 %, aproximadamente el 0,04 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,06 %, aproximadamente el 0,07 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,5 %). La formulación de histidina incluye opcionalmente L-metionina de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM (por ejemplo, L-metionina a aproximadamente 10 mM).

En una realización, una composición presentada en el presente documento contiene de 140 mg/ml a 160 mg/ml de natalizumab, tampón fosfato de sodio 5 mM a 15 mM, cloruro de sodio 130 mM a 150 mM, y polisorbato 80 del 0,01 % al 0,1 % (p/v), a pH $6 \pm 0,5$. En otro caso, la composición contiene 140 mg/ml a 160 mg/ml de natalizumab, tampón fosfato de sodio de 5 mM a 15 mM, glicerol de 250 mM a 300 mM, y polisorbato 80 del 0,01 % al 0,1 % (p/v), a pH $6 \pm 0,5$. En aún otro caso, la composición contiene 140 mg/ml a 160 mg/ml de natalizumab, tampón fosfato de sodio de 5 mM a 15 mM, clorhidrato de L-arginina de 150 mM a 170 mM, y polisorbato 80 del 0,01 % al 0,1 % (p/v), a pH $6 \pm 0,5$.

En una realización, la composición presentada en el presente documento es un líquido.

En otra realización, la composición es estable durante al menos 12 meses (por ejemplo, al menos 24, 30, 36 meses), a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C (por ejemplo, aproximadamente 5 °C). En otra realización, la composición es estable durante al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días (por ejemplo, al menos una

semana o 12 o 14 días) a temperatura ambiente (aproximadamente 20-30 °C, tal como aproximadamente 25 °C).

En aún otra realización, la composición es adecuada para la administración SC o IM. Incluso en otro caso, la composición es adecuada para administración IV.

5

En otro aspecto, la descripción presenta un método para preparar una composición acuosa, tal como una composición acuosa estable, que incluye de aproximadamente 120 a aproximadamente 190 mg/ml de anticuerpo de unión a VLA-4 y polisorbato en un tampón fosfato. El método incluye expresar el anticuerpo en cultivo celular, pasar el anticuerpo a través de al menos una etapa de purificación por cromatografía, pasar el anticuerpo a través de al menos dos etapas de ultrafiltración/diafiltración en tampón fosfato, pasar el anticuerpo a través de al menos una etapa de ultrafiltración en tampón fosfato, y ajustar la concentración del anticuerpo, por ejemplo, descendente, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, añadiendo polisorbato y/o tampón fosfato. En un caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 es natalizumab, y en otro caso el polisorbato es polisorbato 80. La concentración del anticuerpo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 135 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 150 mg/ml. En algunos casos, el tampón fosfato incluye otros excipientes tales como glicerol, clorhidrato de L-arginina o cloruro de sodio. La formulación final tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, por ejemplo, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.

En otro aspecto, la invención presenta un dispositivo de administración diseñado para, o adecuado para, la administración SC o IM, donde el dispositivo de administración se envasa con o contiene una dosis unitaria de una composición de la invención. En un caso, la dosis unitaria es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 450 mg (por ejemplo, de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 350 mg; aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg). En un caso, la dosis unitaria varía de más de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 450 mg. En otro caso, la dosis unitaria se administrará entre aproximadamente 1,4 mg/kg y aproximadamente 3,0 mg/kg de anticuerpo de unión a VLA-4 o fragmento del mismo, por kg de peso corporal para el ser humano. En otra realización, la dosis unitaria es de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,5 ml (por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 1,0 ml).

En un caso, una dosis unitaria es de aproximadamente 300 mg de natalizumab, y en otro caso, la dosis unitaria se divide en fracciones, tal como en dos mitades, conteniendo cada una aproximadamente 150 mg de un anticuerpo de unión a VLA-4. En aún otro caso, a un paciente se le administra natalizumab como un régimen. En un caso, al paciente se le administran aproximadamente 300 mg de natalizumab una vez al mes, por ejemplo, mediante la administración de dos dosis secuenciales de 150 mg de natalizumab. En un caso alternativo, al paciente se le administran aproximadamente 300 mg de natalizumab al mes, se le administra mediante una primera dosis de 150 mg de natalizumab, y después una segunda dosis de 150 mg de natalizumab aproximadamente dos semanas después.

La descripción presenta métodos que optimizan la provisión de una formulación líquida altamente concentrada de un anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, natalizumab, a un paciente.

En un caso, el método permite un aumento gradual en la concentración del anticuerpo proporcionado. Esto permite el aumento de la concentración de anticuerpos y puede permitir el control del paciente para determinar la tolerancia, las reacciones y similares, a medida que aumenta la concentración. Por ejemplo, el método puede comenzar proporcionando natalizumab al paciente en una o más concentraciones iniciales o relativamente bajas, seguido de proporcionar natalizumab al paciente a una concentración final más alta. Las formulaciones ejemplares para la concentración inicial tendrán típicamente una concentración de anticuerpo de menos del 80 %, 70 %, 50 %, 30 %, 20 % o el 10 % de la concentración final más alta. Las concentraciones iniciales típicas pueden ser, por ejemplo, 20 mg/ml, 30 mg/ml o 40 mg/ml. Las concentraciones finales típicas serán, por ejemplo, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 135 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml o aproximadamente 165 mg/ml). En algunos casos, el paciente recibirá una o una pluralidad de administraciones en una o una pluralidad de concentraciones iniciales. Por ejemplo, en una instancia, el paciente recibirá concentraciones crecientes en varias administraciones. En algunos casos, el paciente recibirá 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 administraciones a una o más concentraciones iniciales antes de alcanzar la concentración final. Por ejemplo, el paciente recibirá una o más administraciones a una primera concentración inicial, y una o más administraciones a una segunda concentración más alta. En algunos casos, se evalúa al paciente después de una o más administraciones para determinar los síntomas, incluidos los síntomas adversos. En algunos casos, al paciente se le administra una formulación que tiene una concentración aumentada de natalizumab solo después de determinar que el paciente no tiene una reacción adversa inaceptable a la administración anterior.

- En un caso, el método permite un aumento gradual en la dosificación de anticuerpo proporcionada (la dosificación que se usa aquí se refiere a la cantidad de anticuerpo proporcionado en una o en cada una de un número pequeño definido, por ejemplo, 2, administraciones). Esto permite un aumento de la dosificación y puede permitir que el
- 5 paciente controle la tolerancia, las reacciones adversas y similares a medida que aumenta la dosificación. Por ejemplo, el método puede comenzar proporcionando natalizumab al paciente en una o más dosis iniciales o relativamente bajas, seguido de proporcionar natalizumab al paciente a una dosis final más alta. Las dosis iniciales típicas pueden ser, por ejemplo, el 80 %, 70 %, 50 %, 30 %, 20 % o el 10 % o menos de la dosis final más alta. Las dosis finales típicas variarán basándose en la frecuencia de administración una vez que se haya logrado la
- 10 administración en estado estable. Por ejemplo, algunos casos incluyen dosis finales de entre 75 mg y 500 mg (por ejemplo, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg) (estas dosis pueden ser típicas de aproximadamente la administración mensual). Otros casos incluyen dosis finales de entre 50 mg y 250 mg (por ejemplo, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg) (estas dosis son típicas de la administración cada dos semanas). Otros casos incluyen dosis finales de entre 25 mg y 150 mg (por ejemplo, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg) (estas dosis son
- 15 típicas de la administración semanal). En algunos casos, el paciente recibirá una o una pluralidad de administraciones en una o una pluralidad de dosificaciones iniciales. Por ejemplo, en una instancia, el paciente recibirá dosificaciones crecientes en varias administraciones. En algunos casos, el paciente recibirá 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 administraciones a una o más dosificaciones iniciales antes de alcanzar la dosificación final. Por ejemplo, el paciente recibirá una o más administraciones a una primera dosificación inicial, y una o más administraciones a una
- 20 segunda dosificación inicial más alta. En algunos casos, se evalúa al paciente después de una o más administraciones para determinar los síntomas, incluidos los síntomas adversos. En algunos casos, al paciente se le administra una dosis aumentada de natalizumab solo después de determinar que el paciente no tiene una reacción adversa inaceptable a la dosis anterior.
- 25 La divulgación también incluye kits, por ejemplo, paquetes de inicio, para implementar un aumento de la concentración o dosificación. En un caso, el paciente, o un proveedor de atención médica, recibe un kit o "paquete de inicio" de formulaciones de natalizumab, incluidos paquetes de concentraciones crecientes o dosis de natalizumab. El paciente o el proveedor de atención médica provisto de un paquete de inicio reciben instrucciones para autoadministrarse o administrar una primera, por ejemplo, una dosis o concentración baja o más baja de
- 30 natalizumab, y esperar un periodo de tiempo designado. Si el paciente no experimenta, o experimenta un nivel menor de síntomas adversos, se le indica al paciente o al proveedor de atención médica que se autoadministre o administre una segunda formulación, por ejemplo, una mayor concentración o dosificación, por ejemplo, la siguiente más alta. Se le indica al paciente o al proveedor de atención médica que continúe el aumento gradual de las dosis o concentraciones hasta que se logre la dosis o concentración deseada. El paciente o el proveedor de atención
- 35 médica pueden recibir instrucciones para mantener la autoadministración o la administración de la formulación final a intervalos regulares durante un periodo de tiempo específico.

En una realización, la composición altamente concentrada de la invención se proporciona a un paciente preenvasada en una jeringa.

- 40 En otro aspecto, la descripción presenta un método, por ejemplo, un método para indicar a un paciente que necesita una terapia de anticuerpos de unión a VLA-4, cómo administrar una formulación descrita en el presente documento. El método incluye (i) proporcionar al paciente al menos una dosis unitaria de una formulación altamente concentrada de anticuerpo de unión a VLA-4 descrita en el presente documento; e (ii) indicar al paciente para que se
- 45 autoadministre al menos una dosis unitaria por vía intramuscular o subcutánea. Otro método, por ejemplo, un método de tratamiento, incluye (i) proporcionar al paciente al menos dos dosis unitarias de una formulación altamente concentrada de anticuerpo de unión a VLA-4; e (ii) indicar al paciente para que se autoadministre las dosis unitarias por vía subcutánea o intramuscular, por ejemplo, una dosis a la vez.

- 50 En una realización, el paciente tiene un trastorno inflamatorio, tal como esclerosis múltiple. En otras realizaciones, el paciente tiene, por ejemplo, asma (por ejemplo, asma alérgica), un trastorno artrítico (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), diabetes (por ejemplo, diabetes tipo I), un trastorno fibrótico (por ejemplo, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis crescénica, nefropatía diabética, fibrosis intersticial renal), o un trastorno inflamatorio del intestino (por ejemplo, enfermedad de
- 55 Crohn, colitis ulcerosa).

- Otro aspecto, la invención presenta una dosis unitaria de la composición de la invención, donde la dosis unitaria es de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,5 ml (por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,75 ml o aproximadamente 1,0 ml). En un caso, una dosis unitaria es de aproximadamente 100 mg a
- 60 aproximadamente 450 mg (por ejemplo, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente

180 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg o aproximadamente 350 mg).

En otro aspecto, la descripción presenta una dosis unitaria de una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4, donde la administración de la dosis unitaria a un ser humano administrará entre aproximadamente 1,4 mg y aproximadamente 3,0 mg de anticuerpo de unión a VLA-4 o fragmento del mismo por kg de peso corporal al ser humano.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para tratar a un paciente administrando al paciente una composición que contiene un anticuerpo de unión a VLA-4 en una formulación adecuada para la administración SC o IM. En un caso, el paciente tiene un trastorno inflamatorio, tal como esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide, diabetes o enfermedad de Crohn. En otro caso, la composición se administra como un régimen. En otro caso, el método incluye además seleccionar un paciente adecuado para el tratamiento con la composición. Un paciente adecuado para el tratamiento, por ejemplo, ha demostrado un signo o síntoma indicativo de inicio de la enfermedad, tal como un signo o síntoma indicativo de EM. En aún otro caso, el método incluye además administrar al paciente un segundo agente terapéutico, tal como un agente trombolítico, un agente neuroprotector, un agente antiinflamatorio, un esteroide, una citocina o un factor de crecimiento.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para evaluar a un paciente determinando si el paciente cumple un criterio preseleccionado, y si el paciente cumple el criterio preseleccionado aprobando, proporcionando, prescribiendo o administrando una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4 descrita en el presente documento al paciente. En un caso, el criterio preseleccionado es el fracaso del paciente para responder adecuadamente a un tratamiento o régimen terapéutico alternativo anterior, por ejemplo, para el tratamiento de la EM. En otro caso, el criterio preseleccionado es la ausencia de signos o síntomas de leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), o la ausencia de cualquier diagnóstico de PML.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para indicar a un receptor sobre la administración de una formulación altamente concentrada de natalizumab. El método incluye indicar al receptor (por ejemplo, un usuario final, paciente, médico, farmacia minorista o mayorista, distribuidor o departamento de farmacia en un hospital, centro de rehabilitación o HMO) que el medicamento debe administrarse a un paciente por vía subcutánea o intramuscular.

En otro aspecto, se proporciona un método para distribuir una composición descrita en el presente documento. La composición contiene una formulación altamente concentrada de natalizumab y es adecuada para administración subcutánea o intramuscular o intravenosa. El método incluye proporcionar a un receptor (por ejemplo, un usuario final, paciente, médico, farmacia minorista o mayorista, distribuidor o departamento de farmacia en un hospital, clínica de rehabilitación o HMO) un paquete que contenga dosis unitarias suficientes del fármaco para tratar a un paciente durante al menos 6, 12, 24 o 36 meses.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para evaluar la calidad de un paquete o lote de paquetes (por ejemplo, para determinar si ha caducado) de una composición descrita en el presente documento que contiene una cantidad altamente concentrada de anticuerpo de unión a VLA-4. El método incluye evaluar si el paquete ha caducado. La fecha de vencimiento es de al menos 6, 12, 24, 36 o 48 meses, por ejemplo, más de 24 o 36 meses, a partir de un evento preseleccionado, tal como la fabricación, análisis o envasado. En algunos casos, se toma una decisión o etapa como resultado del análisis, por ejemplo, el anticuerpo en el paquete se usa, se desecha, se clasifica, se selecciona, se libera o se conserva, se envía, se mueve a una nueva ubicación, se comercializa, se vende, o se ofrece para la venta, se retira del mercado o ya no se ofrece para la venta, dependiendo de si el producto ha caducado.

En otro aspecto, la descripción presenta un paquete que contiene al menos 2 dosis unitarias de una composición acuosa que contiene una cantidad altamente concentrada de anticuerpo de unión a VLA-4. En un caso, todas las dosis unitarias contienen la misma cantidad de anticuerpo, y en otros casos, hay dosis unitarias de dos o más potencias, o dos o más formulaciones diferentes, por ejemplo, que tienen diferentes potencias o propiedades de liberación). En un caso, al menos una dosis contiene de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 450 mg de anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, o aproximadamente 400 mg de anticuerpo de unión a VLA-4.

En otro aspecto, la descripción incluye un método para indicar a un receptor sobre la administración de una formulación acuosa que contiene el anticuerpo de unión a VLA-4. El método incluye indicar al receptor (por ejemplo,

un usuario final, paciente, médico, farmacia minorista o mayorista, distribuidor o departamento de farmacia en un hospital, clínica de rehabilitación o HMO) que el anticuerpo debe administrarse a un paciente antes de la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento es de al menos 6, 12, 18, 24, 36 o 48 meses, por ejemplo, más de 18, 24 o 36 meses, a partir de un evento preseleccionado, por ejemplo, la fabricación, análisis o envasado. En un caso, el receptor también recibe un suministro del anticuerpo, por ejemplo, un suministro de dosis unitarias.

En otro aspecto, la descripción presenta el uso de un método o sistema descrito en el documento PCT/US2007/075577 (publicado como WO/2008/021954) con una formulación descrita en el presente documento. Los ejemplos incluyen un método para distribuir una formulación descrita en el presente documento, supervisar o rastrear el suministro de una formulación descrita en el presente documento a una farmacia, centro de infusión o paciente, controlar uno o más pacientes, seleccionar pacientes o compilar o notificar datos sobre el uso de una formulación descrita en el presente documento.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para seleccionar a un paciente para el tratamiento con una formulación descrita en el presente documento para un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, esclerosis múltiple. El método incluye:

seleccionar o proporcionar a un paciente que ha sido tratado mediante administración intravenosa de un anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, natalizumab; y proporcionar o administrar una formulación descrita en el presente documento al paciente, tratando de este modo al paciente.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para analizar un producto o un proceso, por ejemplo, un proceso de fabricación. El método incluye proporcionar una formulación acuosa de una composición de anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrada, por ejemplo, una fabricada por un proceso descrito en el presente documento, y proporcionar una evaluación de la formulación mediante la evaluación de un parámetro de solución, tal como el color (por ejemplo, incolora a ligeramente amarilla, o incolora a amarilla), claridad (por ejemplo, clara a ligeramente opalescente o clara a opalescente), o viscosidad (por ejemplo, entre aproximadamente 5 cP y 30 cP (por ejemplo, 10 cP, 20 cP) cuando se mide a temperatura ambiente, como a 20 °C-30 °C, por ejemplo, 25 °C). La evaluación puede incluir una evaluación de uno o más parámetros de solución. Opcionalmente, se determina la determinación de si el parámetro de la solución cumple un criterio preseleccionado, por ejemplo, se determina si el criterio preseleccionado está presente, o está presente en un intervalo preseleccionado, analizando de este modo el proceso.

En un caso, la evaluación del proceso incluye una medición de la estabilidad de la formulación del anticuerpo anti-VLA-4. La estabilidad de la formulación del anticuerpo se puede medir, por ejemplo, mediante la formación de agregados, que se ensaya, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de exclusión por tamaño, por color, claridad o viscosidad como se describe en el presente documento. Se puede determinar que una formulación es estable y, por lo tanto, aceptable para procesamiento o distribución adicional, si el cambio en un parámetro de ensayo es menor de aproximadamente el 10 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,05 %, o el 0,005 % o menos, durante un periodo de tiempo preestablecido, y opcionalmente a una temperatura dada. En un caso, una formulación líquida altamente concentrada de anticuerpos anti-VLA-4 es estable durante 1, 2, 3, 4 o 5 días o más a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, o 25 °C).

En un caso, el método incluye además comparar el valor determinado con un valor de referencia, para analizar de este modo el proceso de fabricación.

En un caso, el método incluye además mantener el proceso de fabricación basado, al menos en parte, en el análisis. En una instancia, el método incluye además alterar el proceso de fabricación basándose en el análisis.

En otro caso, el método incluye evaluar un proceso, por ejemplo, el proceso de fabricación, de una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrado fabricado por un proceso seleccionado, que incluye hacer una determinación sobre el proceso basándose en un método o análisis descrito en el presente documento. En un caso, el método incluye además mantener o alterar el proceso de fabricación basado, al menos en parte, en el método o análisis. Por lo tanto, en otro caso, la parte que realiza la evaluación no pone en práctica el método o análisis descrito en el presente documento, sino que simplemente se basa en los resultados que se obtienen mediante un método o análisis descrito en el presente documento.

En otro caso, el método incluye comparar dos o más preparaciones en un método para supervisar o controlar una variación de lote a lote o para comparar una preparación con un estándar de referencia.

En aún otro caso, el método puede incluir además tomar una decisión, por ejemplo, clasificar, seleccionar, aceptar o descartar, liberar o retener, procesar en un producto farmacéutico, enviar, mover a una ubicación diferente, formular, etiquetar, envasar, sacar a la venta, vender u ofrecer para la venta la preparación, basándose, al menos en parte, en la determinación.

5

En otro aspecto, la descripción presenta un método para almacenar, distribuir o usar una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, una formulación de natalizumab, descrita en el presente documento. El método incluye:

- 10 almacenar la formulación durante un primer periodo a una primera temperatura baja, por ejemplo, menos de 18 °C, por ejemplo, de la congelación anterior pero a o por debajo de 15 °C, 10 °C o 4 °C;
- almacenar la formulación durante un segundo periodo a una segunda, temperatura más alta, por ejemplo, sin refrigeración o a temperatura ambiente, por ejemplo, entre 18 °C y 25 °C, donde dicho segundo periodo no es más de 24, 48, 72 o 96 horas, y cuando en algunos casos, el segundo periodo finaliza tras la administración al paciente o
- 15 el descarte de la formulación.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para almacenar, distribuir o utilizar una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, una formulación de natalizumab, descrita en el presente documento. El método incluye:

20

almacenar la formulación a una primera temperatura baja, por ejemplo, menos de 18 °C, por ejemplo, de la congelación anterior pero a o por debajo de 15 °C, 10 °C o 4 °C;

proporcionar la formulación a un receptor, por ejemplo, un usuario final, por ejemplo, un paciente o un proveedor de atención médica;

- 25 opcionalmente, indicar al usuario final que la formulación puede almacenarse a una segunda temperatura más alta, por ejemplo, sin refrigeración o a temperatura ambiente, por ejemplo, entre 18 °C y 25 °C; y
- después de recibirse por el receptor, almacenar la formulación hasta 24, 48, 72 o 96 horas a la segunda temperatura.

- 30 En otro aspecto, la descripción presenta un método para indicar a una entidad, por ejemplo, una farmacia, distribuidor o usuario final, por ejemplo, un paciente o proveedor de atención médica, cómo almacenar, distribuir o usar una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, una formulación de natalizumab, descrita en el presente documento. El método incluye:

- 35 indicar a la entidad que la formulación debe almacenarse a una primera temperatura baja, por ejemplo, a menos de 18 °C, por ejemplo, por encima de la congelación pero por debajo de 15 °C, 10 °C o 4 °C, durante un primer periodo, donde dicho primer periodo se extiende hasta que la formulación se proporciona a un usuario final o hasta 24, 48, 72 o 96 horas antes de la administración a un paciente; y
- indicar a la entidad que la formulación se puede almacenar a una segunda temperatura más alta, por ejemplo, sin refrigeración o a temperatura ambiente, por ejemplo, entre 18 °C y 25 °C durante un segundo periodo, donde dicho
- 40 segundo periodo no exceda de 24, 48, 72, o 96 horas,
- instruyendo de este modo a una entidad.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para almacenar, distribuir o usar una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, una formulación de natalizumab, descrita en el presente documento. El método incluye:

45

almacenar la formulación a una primera temperatura baja, por ejemplo, menos de 18 °C, por ejemplo, de la congelación anterior pero a o por debajo de 15 °C, 10 °C o 4 °C; y

- 50 almacenar la formulación a una segunda temperatura más alta, por ejemplo, sin refrigeración o a temperatura ambiente, por ejemplo, entre 18 °C y 25 °C durante no más de 24, 48, 72 o 96 horas.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para evaluar, tal como evaluar la calidad de una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrado, por ejemplo, en un control de calidad o análisis de especificación de liberación. El método incluye proporcionar una evaluación de una formulación de anticuerpo para un parámetro de solución, tal como color (por ejemplo, de incolora a ligeramente amarilla o de incolora a amarilla), claridad (por ejemplo, de clara a ligeramente opalescente o de clara a opalescente), o viscosidad (por ejemplo, entre aproximadamente 5 cP y 30 cP cuando se mide a temperatura ambiente, tal como a 20 °C-30 °C, por ejemplo, 25 °C). La evaluación puede incluir una evaluación de uno o más de los parámetros anteriores. El método también

- 60 incluye, opcionalmente, determinar si el parámetro de la solución cumple con un criterio preseleccionado, por

ejemplo, si el criterio preseleccionado está presente, o está presente en un intervalo preseleccionado. Si el parámetro de la solución observado está dentro de un intervalo de valores preseleccionado, o cumple los criterios estándar preseleccionados, entonces se selecciona la preparación, tal como para envasar, usar, vender, lanzar al mercado, desechar, etc.

5

En otro aspecto, la descripción presenta un método para cumplir un requisito reglamentario, por ejemplo, un requisito posterior a la aprobación de una agencia reguladora, por ejemplo, la FDA. El método incluye proporcionar una evaluación de una formulación de anticuerpo para un parámetro de solución, tal como color (por ejemplo, de incolora a ligeramente amarilla o de incolora a amarilla), claridad (por ejemplo, de clara a ligeramente opalescente o de clara a opalescente), o viscosidad (por ejemplo, entre aproximadamente 5 cP y 30 cP cuando se mide a temperatura ambiente, tal como a 20 °C-30 °C). El requisito de aprobación posterior puede incluir una medición de uno de los parámetros anteriores. El método también incluye, opcionalmente, determinar si el parámetro de solución observado cumple un criterio preseleccionado o si el parámetro está dentro de un intervalo preseleccionado; opcionalmente, memorizar el valor o el resultado del análisis, o comunicarse con la agencia, por ejemplo, transmitiendo el valor o resultado a la agencia reguladora.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para hacer un lote de una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4 que tiene una propiedad preseleccionada, por ejemplo, que cumple una especificación de liberación, requisito de etiquetado, o requisito de compendio, por ejemplo, una propiedad descrita en el presente documento. El método incluye proporcionar una preparación de anticuerpos de ensayo; analizar la preparación del anticuerpo de ensayo de acuerdo con un método descrito en el presente documento; determinar si la preparación de anticuerpo de ensayo satisface un criterio preseleccionado, por ejemplo, que tiene una relación preseleccionada con un valor de referencia, por ejemplo, uno o más valores de referencia descritos en el presente documento, y seleccionar la preparación de anticuerpo de ensayo para fabricar un lote de producto.

25

En otro aspecto, la descripción presenta múltiples lotes de una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4, donde uno o más parámetros de solución (por ejemplo, un valor o parámetro de solución determinado por un método descrito en el presente documento), para cada lote varía menos de un intervalo preseleccionado de un valor o criterio de referencia deseado preseleccionado, por ejemplo, un intervalo o criterios descritos en el presente documento. En algunos casos, se determinan uno o más parámetros para uno o más lotes de una formulación de anticuerpo, y se selecciona un lote o lotes como resultado de la determinación. Algunos casos incluyen la comparación de los resultados de la determinación con un valor o criterio preseleccionado, por ejemplo, un estándar de referencia. Otros casos incluyen ajustar la dosis del lote a administrar, por ejemplo, en función del resultado de la determinación del valor o parámetro.

35

En otro aspecto, la descripción presenta un método de uno o más de: proporcionar un informe a una entidad receptora de informes, evaluar una muestra de una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4 para cumplir un estándar de referencia, por ejemplo, un requisito de la FDA, buscar la indicación de otra parte de que una preparación del anticuerpo de unión a VLA-4 cumple algún requisito predefinido, o enviar información sobre la preparación de un anticuerpo de unión a VLA-4 a otra parte. Las entidades receptoras ejemplares u otras partes incluyen un gobierno, por ejemplo, el gobierno federal de EE. UU., por ejemplo, una agencia gubernamental, por ejemplo, la FDA. El método incluye una o más (o todas) de las siguientes etapas para fabricar y/o probar una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4 en un primer país, por ejemplo, Estados Unidos; enviar al menos una alícuota de la muestra fuera del primer país, por ejemplo, enviarla fuera de Estados Unidos, a un segundo país; preparar, o recibir, un informe que incluye datos sobre la estructura de la preparación del anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, datos relacionados con una estructura y/o cadena descrita en el presente documento, por ejemplo, datos generados por uno o más de los métodos descritos en el presente documento; y proporcionar dicho informe a una entidad receptora de informes.

En un caso, la entidad receptora de informes puede determinar si los datos cumplen un requisito predeterminado o un valor de referencia y, opcionalmente, se recibe una respuesta de la entidad receptora de informes, por ejemplo, por un fabricante, distribuidor o vendedor de una formulación acuosa de un anticuerpo de unión a VLA-4. En un caso, tras recibir la aprobación de la entidad receptora de informes, la preparación del anticuerpo de unión a VLA-4 se selecciona, se envasa o se pone en venta.

55

En otro aspecto, la descripción presenta un método para evaluar una formulación acuosa de anticuerpo de unión a VLA-4. El método incluye recibir datos con respecto a la presencia o nivel de anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, donde los datos se prepararon mediante uno o más métodos descritos en el presente documento; proporcionar un registro que incluye dichos datos y opcionalmente incluye un identificador para un lote de anticuerpo de unión a VLA-4; enviar dicho registro a un responsable de la toma de decisiones, por ejemplo, una agencia

60

gubernamental, por ejemplo, la FDA; opcionalmente, recibir una comunicación de dicho responsable de toma de decisiones; opcionalmente, decidir si comercializar el lote de anticuerpo de unión a VLA-4 basándose en la comunicación del responsable de la toma de decisiones. En una instancia, el método incluye además liberar la muestra.

5

Las formulaciones ejemplares incluyen lo siguiente:

1. Natalizumab a 125-175 mg/ml, o 140-160 mg/ml, por ejemplo, 150 mg/ml;
 tampón fosfato sódico a 1-100 mM, 5-20 mM, o 5-50 mM, por ejemplo, 10 mM;
 10 cloruro sódico a 50-200 mM, 100-180 mM, o 120-160 mM, por ejemplo, 140 mM;
 polisorbato 80 al 0,01-0,12 %, 0,02-0,08 %, o al 0,02-0,06 %, por ejemplo, al 0,04 % (p/v), y
 pH 6,0 ± 1,0, por ejemplo, 6,0 ± 0,5;

2. Natalizumab a 125-175 mg/ml o 140-160 mg/ml, por ejemplo, 150 mg/ml;
 15 tampón fosfato sódico 10 mM;
 cloruro sódico 140 mM;
 polisorbato 80 al 0,04 % (p/v) y
 pH 6,0 ± 0,5;

20 3. 150 mg/ml de Natalizumab;
 tampón fosfato sódico a 1-100 mM, 5-20 mM, o 5-50, por ejemplo, 10 mM;
 cloruro sódico 140 mM;
 polisorbato 80 al 0,04 % (p/v); y
 pH 6,0 ± 0,5;

25

4. 150 mg/ml de Natalizumab;
 tampón fosfato sódico 10 mM;
 cloruro sódico a 50-200 mM, 100-180 mM, o 120-160 mM, por ejemplo, 140 mM;
 polisorbato 80 al 0,04 % (p/v) y
 30 pH 6,0 ± 0,5;

5. 150 mg/ml de Natalizumab;
 tampón fosfato sódico 10 mM;
 cloruro sódico 140 mM;
 35 polisorbato 80 al 0,01-0,12 %, 0,02-0,08 %, o al 0,02-0,06 %, por ejemplo, al 0,04 % (p/v), y
 pH 6,0 ± 0,5;

6. 150 mg/ml de Natalizumab;
 tampón fosfato sódico 10 mM;
 40 cloruro sódico 140 mM;
 polisorbato 80 al 0,04 % (p/v) y
 pH 6,0 ± 1,0, por ejemplo, pH 6,0 ± 0,5;
 y

45 7. 150 mg/ml de Natalizumab;
 tampón fosfato sódico 10 mM;
 cloruro sódico 140 mM;
 polisorbato 80 al 0,04 % (p/v); y
 pH 6,0 ± 0,5.

50

En algunos casos, cualquiera de las formulaciones anteriores 1-7 puede estar esencialmente libre de un aminoácido, por ejemplo, arginina o glicina, o glicerol.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse cuando la presencia, distribución
 55 o cantidad de una o más estructuras en la mezcla puede poseer o afectar a la actividad biológica. Los métodos
 también son útiles desde una perspectiva de estructura-actividad, para evaluar o asegurar la equivalencia biológica.

Una "formulación de anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrada", como se usa en el presente documento,
 se refiere a una formulación acuosa estable que contiene entre aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente
 60 190 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml,

180 mg/ml, 190 mg/ml) de anticuerpo de unión a VLA-4, tal como natalizumab.

"Adecuado para administración SC o IM" significa que la administración de la composición a un sujeto, tal como un ser humano, tendrá un efecto terapéutico, tal como mejorar uno o más síntomas en el sujeto.

5

El término "tratar" se refiere a administrar una terapia en una cantidad, manera y/o modo eficaz para mejorar una afección, síntoma o parámetro asociado con un trastorno o para prevenir la progresión de un trastorno, ya sea a un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para un experto en la técnica. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del sujeto y puede adaptarse al sujeto.

10

Una formulación "estable" del anticuerpo de unión a VLA-4 presenta poca o ninguna señal de uno cualquiera o más de agregación, fragmentación, desamidación, oxidación o cambio en la actividad biológica durante un periodo prolongado de tiempo, por ejemplo, 12 meses, 24 meses, 36 meses o más. Por ejemplo, en una realización, menos del 10 % de la composición está agregada, fragmentada u oxidada. La agregación, la precipitación y/o la desnaturalización pueden evaluarse mediante métodos conocidos, tal como el examen visual del color y/o la claridad, o mediante dispersión de luz UV o cromatografía de exclusión por tamaño. La capacidad de la proteína para conservar su actividad biológica se puede evaluar mediante la detección y cuantificación de formas del anticuerpo alteradas químicamente. La modificación de tamaño (por ejemplo, recorte), que se puede evaluar mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas de ionización de desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), o mapeo de péptidos de anticuerpo tratado con endoproteinasa, por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga (por ejemplo, que se produce como resultado de la desamidación), que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo. Un anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado se encuentra dentro de aproximadamente el 10 % de la actividad biológica mostrada en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica según se determina en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo.

15

20

25

Un "anticuerpo de unión a VLA-4" se refiere a un anticuerpo que se une a una integrina VLA-4, tal como a la subunidad $\alpha 4$ de la integrina VLA-4, y al menos parcialmente inhibe una actividad de VLA-4, particularmente una actividad de unión de una integrina VLA-4 o una actividad de señalización, por ejemplo, la capacidad de transducir una señal mediada por VLA-4. Por ejemplo, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede inhibir la unión de VLA-4 a un ligando análogo de VLA-4, por ejemplo, una proteína de superficie celular tal como VCAM-1, o a un componente de matriz extracelular, tal como fibronectina u osteopontina. Un anticuerpo de unión a VLA-4 puede unirse a la subunidad $\alpha 4$ o la subunidad $\beta 1$, o a ambas. En una realización, el anticuerpo se une al epítipo B1 de $\alpha 4$. Un anticuerpo de unión a VLA-4 puede unirse a VLA-4 con una K_d de menos de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , o 10^{-10} M. VLA-4 también se conoce como alfa4/betal y CD29/CD49b.

30

35

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VH), y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término "anticuerpo" incluye los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb), así como anticuerpos completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo está glucosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente del anticuerpo y/o la citotoxicidad mediada por el complemento, o puede ser no funcional para una o ambas de estas actividades.

50

Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de las FR y las CDR se ha definido con precisión (véanse, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242; y Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). En el presente documento se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

55

60

Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio del dominio variable o constante de las moléculas de

inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina típicamente contienen dos láminas β formadas por aproximadamente siete cadenas β y un enlace disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A. F. Williams y A. N. Barclay 1988 Ann. Rev Immunol. 6:381-405).

- 5 Como se usa en el presente documento, una "secuencia de dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N o C-terminales, los aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión a diana (o "sitio de unión a antígeno"), por ejemplo, una estructura que interactúa con VLA-4.

- La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además la totalidad o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de este modo 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 de inmunoglobulina pesadas y ligeras se pueden conectar por enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada típicamente incluye tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera típicamente incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

- 25 Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas, eficazmente humanas o humanizadas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o eficazmente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR, por ejemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, pueden ser humanas (HC, cadena pesada; LC, cadena ligera). Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. HC CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones marco pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de HC o LC. En una realización, todas las regiones marco son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas, eficazmente humanas o humanizadas. En otra realización, al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 o el 98 % de las regiones marco (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3, colectivamente, o FR1, FR2, FR3 y FR4, colectivamente), o el anticuerpo completo, pueden ser humanos, eficazmente humanos o humanizados. Por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 pueden ser colectivamente al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 99 % idéntica a una secuencia humana codificada por un segmento de línea germinal humana.

- 40 Una región variable de inmunoglobulina "eficazmente humana" es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos del marco humano de manera que la región variable de inmunoglobulina no provoca una respuesta inmunogénica en un humano normal. Un anticuerpo "eficazmente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos de manera que el anticuerpo no provoca una respuesta inmunogénica en un humano normal.

- 45 Una región variable de inmunoglobulina "humanizada" es una región variable de inmunoglobulina que se modifica de tal manera que la forma modificada provoca menos de una respuesta inmune en un ser humano que la forma no modificada, por ejemplo, se modifica para incluir un número suficiente de las posiciones de aminoácidos de marco humano de tal forma que la región variable de la inmunoglobulina no provoca una respuesta inmunogénica en un humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" incluyen, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 6.407.213 y Pat. de Estados Unidos N.º 5.693.762. En algunos casos, las inmunoglobulinas humanizadas pueden incluir un aminoácido no humano en una o más posiciones de aminoácidos de marco.

- Todo o parte de un anticuerpo puede estar codificado por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Los genes de inmunoglobulina humana ejemplares incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, así como los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de región variable en el extremo NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) están codificadas de manera

similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante mencionados anteriormente, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 amino ácidos).

El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse específicamente a una diana de interés, por ejemplo, VLA-4. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en 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 consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en 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 consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) que conserva la funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, mediante métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv monocatenario (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.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a dentro del 0,1 % al 5 % del valor dado (por ejemplo, dentro del 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % por encima o por debajo del valor dado). Cuando se proporcionan en el presente documento las cantidades y otros valores designados, la desviación permisible se encuentra dentro de los estándares farmacéuticamente aceptables.

Se proporcionan ciertas ventajas mediante ejemplos de la divulgación, que incluyen realizaciones de la invención. En algunos casos, es difícil hacer formulaciones de proteínas de alta concentración, por ejemplo, anticuerpos, para su uso en composiciones farmacéuticas. Los métodos para preparar tales formulaciones se presentan en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas que contienen altas concentraciones de proteína, por ejemplo, de anticuerpo anti-VLA-4, pueden ser útiles para la administración en un marco de tiempo más corto. Una formulación de alta concentración, por ejemplo, de anticuerpo anti-VLA-4, también se puede administrar por métodos simplificados (por ejemplo, por vía subcutánea).

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la descripción, incluida la invención, serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones. La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el nivel de agregados solubles antes y después de la agitación de un natalizumab a una concentración de 150 mg/ml en diversas formulaciones. HCN = histidina 20 mM, glicina 240 mM, polisorbato 80 al 0,04 % (p/v), pH 6. HOL = histidina 20 mM, glicerol 240 mM, polisorbato 80 al 0,04 % (p/v), pH 6. PCN = fosfato 20 mM, glicina 240 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), pH 6. PST = fosfato 20 mM, NaCl 140 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), pH 6.

La Figura 2 muestra la absorbancia UV en solución a 340 nm antes y después de la agitación del natalizumab a una concentración de 150 mg/ml en formulaciones como se describe en la Figura 1.

La Figura 3 muestra la relación entre la agregación y diversos niveles de polisorbato 80 para natalizumab (150 mg/ml) en la formulación de HOL (HOL = histidina 20 mM, glicerol 240 mM, pH 6; el polisorbato 80 es una variable del experimento).

La Figura 4 muestra el porcentaje de agregación a lo largo del tiempo para natalizumab (150 mg/ml) almacenado a 40 °C en diversas formulaciones como se describe en la Figura 1.

La Figura 5 muestra el porcentaje de agregación a lo largo del tiempo para natalizumab (150 mg/ml) almacenado en viales entre 2-8 °C en diversas formulaciones como se describe en la Figura 1.

La Figura 6 muestra el porcentaje de oxidación de metionina a lo largo del tiempo para natalizumab (150 mg/ml) almacenado entre 2-8 °C y a 40 °C en diversas formulaciones como se describe en la Figura 1.

La Figura 7 muestra el porcentaje de oxidación de metionina en función del excipiente antioxidante libre de natalizumab (150 mg/ml) durante 6 meses.

La Figura 8 muestra las tasas de fragmentación para natalizumab en diversas concentraciones y en diversas formulaciones frente al tiempo (8 semanas).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las formulaciones estables de anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrado, son útiles para la administración subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intravenosa (IV). Las formulaciones presentadas en la invención contienen de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml de natalizumab.

5

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en el presente documento se formulan como composiciones farmacéuticas. El anticuerpo de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab) puede proporcionarse, por ejemplo, en una solución tamponada a una concentración entre aproximadamente 120 mg/ml y 190 mg/ml (por ejemplo, entre aproximadamente 120 mg/ml y aproximadamente 180 mg/ml, entre aproximadamente 140 mg/ml y aproximadamente 160 mg/ml, entre aproximadamente 135 mg/ml y aproximadamente 165 mg/ml; por ejemplo, aproximadamente 120 mg/ml, 130 mg/ml, 135 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 165 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml). En una realización, el natalizumab se proporciona en una solución tamponada a una concentración mayor de 150 mg/ml y menor de aproximadamente 190 mg/ml. En otra realización, la formulación se prepara a una concentración más alta (por ejemplo, 170 mg/ml a 190 mg/ml) y luego se diluye de nuevo a la concentración deseada (por ejemplo, 135 mg/ml a 165 mg/ml). Por ejemplo, la formulación se puede preparar con una concentración de anticuerpo, por ejemplo, 175 mg/ml, 180 mg/ml o 185 mg/ml, y luego se diluye hasta la concentración deseada para la administración, por ejemplo, 140 mg/ml, 145 mg/ml, 150 mg/ml, 155 mg/ml o 160 mg/ml. La composición se puede almacenar a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C).

En un caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 puede formularse con materiales excipientes, tal como clorhidrato de L-arginina 160 mM ($\pm 10\%$), un tampón fosfato (por ejemplo, fosfato sódico dibásico heptahidrato y fosfato sódico monobásico), y polisorbato 80, donde el contenido total de sodio no supera los 60 mM. En otro caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 puede formularse con glicerol 275 mM ($\pm 10\%$), un tampón de fosfato (por ejemplo, fosfato dibásico de sodio heptahidrato y fosfato monobásico de sodio u otras sales de fosfato), y polisorbato 80, y está sustancialmente libre de cloruro de sodio. En otro caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 se puede formular con cloruro de sodio 140 mM ($\pm 10\%$), un tampón de fosfato y polisorbato 80. A continuación se proporcionan formulaciones ejemplares que incluyen tampones de fosfato, por ejemplo, en los ejemplos 8, 9, 10, 11 y 12.

30

En un caso, el anticuerpo de unión a VLA-4 puede formularse con materiales excipientes, tales como glicerol 240 mM ($\pm 10\%$), un tampón de histidina, polisorbato 80 y opcionalmente L-metionina. Las formulaciones ejemplares que incluyen tampones de histidina se proporcionan a continuación, por ejemplo, en los ejemplos 13 y 14.

Los tampones de fosfato son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas de fosfato de sodio dibásico (anhidro), fosfato de sodio dibásico heptahidrato, fosfato de sodio dibásico dihidrato, fosfato de sodio monobásico anhidro, fosfato de sodio monobásico monohidrato, fosfato de sodio monobásico monobásico dihidrato, fosfato de sodio tribásico anhidro, o fosfato de sodio tribásico dodecahidrato, llevadas al pH adecuado. Los tampones de fosfato también incluyen, por ejemplo, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico anhidro o fosfato de potasio tribásico, llevados al pH apropiado.

40

Los tampones de histidina son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas de D-histidina, monoclóruo de D-histidina monohidrato, DL-histidina, monoclóruo de DL-histidina monohidrato, L-histidina, o monoclóruo de L-histidina monohidrato, al pH apropiado con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, u otro ácido o base que se conoce en la técnica.

45

Típicamente, una composición farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, que son fisiológicamente compatibles.

50

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del anticuerpo y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, aminoácidos libres, y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina,

60

dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Típicamente, los agentes fisiológicamente compatibles, tales como los aminoácidos libres, las sales clorhidrato, sales de sodio o sales de potasio de los aminoácidos libres se usan como excipientes en formulaciones farmacéuticas para promover la estabilidad del anticuerpo. Las formulaciones en el presente documento pueden incluir aditivos tales como glicerol, manitol, sorbitol y otros polioles, así como azúcares (por ejemplo, sacarosa), para promover la estabilidad.

Las formulaciones presentadas en el presente documento pueden incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, monoestearato de glicerina, estearato de polioxilo, laurmacrogol u oleato de sorbitán. En una realización, las formulaciones presentadas en el presente documento incluyen del aproximadamente el 0,01 % (p/v) a aproximadamente el 0,1 % (p/v) de polisorbato 80, por ejemplo, aproximadamente el 0,2 % o el 0,04 % de polisorbato 80.

Las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos de unión a VLA-4 altamente concentrados están en forma de una solución líquida (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles). Dichas composiciones se pueden administrar por un modo parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen la administración subcutánea o intramuscular, así como inyección e infusión intravenosa, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. En un caso, las formulaciones descritas en el presente documento se administran por vía subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. También se puede probar una composición farmacéutica para asegurar que cumple con los estándares reglamentarios y de la industria para su administración.

Una composición farmacéutica que contiene una cantidad altamente concentrada de anticuerpo de unión a VLA-4 puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de anticuerpo. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un agente descrito en el presente documento en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando un agente descrito en el presente documento en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal 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 llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En algunas realizaciones, se caracterizan los parámetros que describen las formulaciones, por ejemplo, los parámetros que pueden aparecer en la etiqueta del producto. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, color (típicamente incoloro a ligeramente amarillo o incoloro a amarillo), claridad (típicamente claro a ligeramente opalescente, o claro a opalescente) y viscosidad (típicamente entre aproximadamente 5 cP y 30 cP cuando se mide a temperatura ambiente, tal como a 20 °C a 30 °C). Dichos parámetros pueden medirse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la claridad se puede medir utilizando estándares de opalescencia disponibles comercialmente (disponibles en, por ejemplo, HunterLab Associates, Inc. (Reston, VA)).

En algunas realizaciones, se ensaya la estabilidad de las formulaciones de anticuerpos. Los métodos ejemplares incluyen, por ejemplo, estudios de agregación, estudios de oxidación, estudios de fragmentación, estudios de sialilación, estudios de puntos isoeléctricos, estudios de semianticuerpos, estudios de paridad de cadenas pesadas y ligeras, y análisis de estructura secundaria (por ejemplo, por dicroísmo circular), desnaturalización térmica (por ejemplo, por dicroísmo circular de calorimetría diferencial de barrido), entorno de triptófano (por ejemplo, por fluorescencia), pliegue de IgG (por ejemplo, por dicroísmo circular UV lejano), y entorno de residuos aromáticos (por ejemplo, por espectrofotometría UV-Vis).

Métodos para fabricar formulaciones de anticuerpos

Las formulaciones que contienen formulaciones de anticuerpos de unión a VLA-4 se pueden fabricar como se

describe en la Solicitud Publicada de Estados Unidos 2005/0053598, modificada para alojar altas concentraciones de anticuerpo (por ejemplo, concentraciones de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, de 100 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml, de 135 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml). El proceso puede alterarse como se conocerá por el experto en la técnica,

5 pero generalmente seguirá un procedimiento como el siguiente. Obtener una ampolla de un banco de células de trabajo que contenga células que produzcan el anticuerpo o la proteína de interés. Preparar un inóculo. Cultivar o fermentar las células del inóculo con alimentaciones adicionales según sea necesario. Recolectar/clarificar las células mediante centrifugación y/o filtración. Esto se puede hacer, por ejemplo, concentrando las células 10 veces mediante, por ejemplo, filtración en espiral. La filtración intermedia, tal como a través de un filtro de 0,2 µm, va

10 seguida, por ejemplo, de cromatografía de afinidad, tal como por una proteína A Sepharose Fast Flow®, y después por elución inversa. La composición que contiene el anticuerpo recibe entonces un tratamiento a un pH bajo, tal como a un pH de 3,6-3,7. La mezcla recibe entonces una filtración viral seguida de una etapa de concentración/diafiltración. La composición se purifica adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico, tal como por DEAE Sepharose Fast Flow®. Esta etapa se puede realizar múltiples veces.

15 Desde este punto, la composición se concentra adicionalmente y después se purifica, por ejemplo, mediante cromatografía de filtración en gel, tal como a través de un sistema Sephacryl S300HR®. La composición que contiene anticuerpo puede concentrarse adicionalmente si se desea. La formulación final se produce añadiendo tampón y polisorbato, y concentrando el anticuerpo de nuevo a través de un proceso de ultrafiltración. La formulación de anticuerpos resultante se puede probar con control de calidad y se libera la garantía de calidad (QA). Se puede

20 producir una formulación de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los métodos ilustrados en la Tabla 1 a continuación. Por ejemplo, la formulación que contiene un anticuerpo de unión a VLA-4, tal como natalizumab, puede producirse mediante el siguiente proceso. Se inocula un lote grande de cultivo celular, tal como de 5.000 a 20.000 litros (por ejemplo, 5.000; 10.000; 15.000; 20.000 litros), se cultiva, se alimenta, se cosecha y se clarifica como se conoce en la técnica. El material clarificado se purifica, por ejemplo, mediante cromatografía, inactivación viral y

25 filtración viral. La ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) del material clarificado da como resultado un intermedio del proceso de fosfato. El intermedio del proceso de fosfato se puede almacenar a 2-8 °C, por ejemplo, para un procesamiento futuro, tal como por ejemplo, por métodos para concentrar adicionalmente la proteína. Para fabricar la formulación final, se añaden polisorbato y tampón (como se describe en el presente documento) al intermedio del proceso de fosfato para lograr la concentración de anticuerpo final deseada. En una alternativa, la formulación final

30 se crea al diluir de nuevo el intermedio del proceso de fosfato en un tampón a una concentración final deseada, por ejemplo, una concentración baja tal como 20 mg/ml. El polisorbato se añade típicamente durante la etapa de dilución final.

En un caso, la formulación del anticuerpo de unión a VLA-4 se produce en una formulación de histidina, como se ha

35 descrito anteriormente, excepto que el intermedio del proceso de fosfato experimenta al menos un segundo proceso UF/DF, y opcionalmente, al menos un proceso UF adicional, en un tampón de formulación de histidina como se describe en el presente documento, a una concentración final deseada, tal como entre aproximadamente 75 mg/ml y 190 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, por ejemplo, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 135 mg/ml, 150 mg/ml, 165 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml. En una alternativa, la formulación de

40 anticuerpos en el tampón de histidina se lleva a una concentración final mayor que la concentración deseada. Después, la formulación final se crea al volver a diluir en el tampón de formulación de histidina a una concentración de proteína deseada. El polisorbato se añade típicamente durante la etapa de dilución final.

En otro caso, la formulación del anticuerpo se produce en una formulación de fosfato, como se ha descrito

45 anteriormente, excepto que el intermedio del proceso de fosfato experimenta al menos un segundo proceso de UF/DF, y opcionalmente, al menos un proceso de UF adicional, en un tampón de formulación de fosfato como se describe en el presente documento, hasta una concentración final deseada, tal como entre aproximadamente 75 mg/ml y 190 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, por ejemplo, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 135 mg/ml, 150 mg/ml, 165 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml. En una alternativa, la

50 formulación de anticuerpos en tampón fosfato se lleva a una concentración final mayor que la concentración deseada, y la formulación final se crea por dilución de nuevo en tampón fosfato hasta la concentración deseada. El polisorbato se añade típicamente durante la etapa de dilución final.

En otro caso, la formulación del anticuerpo de unión a VLA-4 se produce en una formulación de fosfato, como se ha

55 descrito anteriormente, excepto que se sigue un proceso UF/DF comercial para la formulación de fosfato, y se añade polisorbato, para producir una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4 a una concentración final deseada, tal como entre aproximadamente 75 mg/ml y 190 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, por ejemplo, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 135 mg/ml, 150 mg/ml, 165 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml. En una alternativa, la formulación de anticuerpos en tampón fosfato se lleva a una concentración

60 final mayor que la concentración deseada, y después la formulación final se crea por dilución de nuevo en tampón de

formulación de fosfato hasta la concentración de proteínas deseada. El polisorbato se añade típicamente durante el proceso de dilución final.

Tabla 1. Métodos para fabricar formulaciones de anticuerpos.

Proceso de formulación IV	Proceso clínico de alta concentración (Formulación de histidina)	Proceso clínico de alta concentración (Formulación de fosfato)	Proceso de fosfato comercial de alta concentración
15.000 l de cultivo celular	15.000 l de cultivo celular	15.000 l de cultivo celular	15.000 l de cultivo celular
↓	↓	↓	↓
Cosecha y clarificación	Cosecha y clarificación	Cosecha y clarificación	Cosecha y clarificación
↓	↓	↓	↓
Purificación (cromatografía, inactivación viral y filtración viral)	Purificación (cromatografía, inactivación viral y filtración viral)	Purificación (cromatografía, inactivación viral y filtración viral)	Purificación (cromatografía, inactivación viral y filtración viral)
↓	↓	↓	↓
UF/DF en intermedio del proceso de fosfato	UF/DF #1 en intermedio del proceso de fosfato. Si es necesario, almacenamiento a 2-8 °C.	UF/DF #1 en intermedio del proceso de fosfato. Si es necesario, almacenamiento a 2-8 °C.	Proceso UF/DF comercial para formulación de fosfato a 150 mg/ml
N/A	UF/DF #2, y UF#3 en el tampón de histidina a 150 mg/ml	UF/DF #2, y UF #3 en el tampón de formulación de fosfato a 150 mg/ml	N/A
Formulación final (adición de polisorbato) y llenado de la sustancia farmacológica	Formulación final (adición de polisorbato) y llenado de la sustancia farmacológica	Formulación final (adición de polisorbato) y llenado de la sustancia farmacológica	Formulación final (adición de polisorbato) y llenado de la sustancia farmacológica

5

Los procesos UF/DF de la Tabla 1 (por ejemplo, UF/DF #1, UF/DF#2) son típicamente procesos de flujo tangencial que utilizan, por ejemplo, casetes de ultrafiltración de lámina plana o en espiral (con, por ejemplo, tamaños de poro de 10 kD o 30 kD) para concentrar y diafiltrar el anticuerpo. Dichos procesos son adecuados para concentrar el producto de 0 a 100 g/l, por ejemplo, 30 g/l, 50 g/l, 80 g/l. Los procesos de UF de la Tabla 1 (por ejemplo, UF # 3) típicamente usan casetes de lámina plana de canal abierto, que son adecuados para concentrar el producto a, por ejemplo, de 0 a 300 g/l o más, tal como a 150 g/l, 200 g/l, 210 g/l, 220 g/l, 230 g/l, o 240 g/l.

10

El proceso UF/DF comercial de la Tabla 1 usa típicamente una primera operación UF/DF para diafiltrar el producto en un tampón de formulación y concentrar el producto de aproximadamente 5 g/l a 40 g/l (por ejemplo, aproximadamente 10 g/l, aproximadamente 20 g/l, aproximadamente 30 g/l). Una segunda operación de UF se realiza típicamente para concentrar adicionalmente el producto de aproximadamente 135 g/l a aproximadamente 185 g/l (por ejemplo, aproximadamente 140 g/l, 150 g/l, 165 g/l).

15

Cualquiera de las formulaciones de anticuerpos de unión a VLA-4 descritas en el presente documento se pueden envasar en viales asépticos como se describe en, por ejemplo, la Solicitud Publicada de Estados Unidos 2005/0053598. Por ejemplo, las formulaciones se pueden envasar, por ejemplo, en viales de llenado de 3,0, 5,0 o 20 ml. El producto farmacéutico lleno se almacena bajo refrigeración a aproximadamente 2-8 °C.

20

En un caso, la formulación final se envasa como un líquido en un vial de llenado de 3,0 ml con un volumen mínimo extraíble de 1 ml. Por ejemplo, el vial de llenado puede incluir de aproximadamente 1,1 ml a aproximadamente 1,5 ml (por ejemplo, aproximadamente 1,1 ml, aproximadamente 1,2 ml, aproximadamente 1,3 ml, aproximadamente 1,4 ml) de formulación de anticuerpo. En otro caso, la formulación del anticuerpo se envasa en una jeringa precargada, en una cantidad tal que se inyecta 1 ml de solución en un paciente durante el uso, y la solución de 1 ml administra la cantidad deseada de anticuerpo, por ejemplo, de 135 mg a 165 mg de natalizumab, por ejemplo, 150 mg de

25

natalizumab.

Natalizumab y otros anticuerpos de unión a VLA-4

- 5 Los anticuerpos adecuados para una formulación de anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrada descrita en el presente documento incluyen natalizumab, un anticuerpo de unión a integrina $\alpha 4$. Natalizumab (nombre USAN) tiene el número de código de anticuerpo AN 100226, y también se llama "TYSABRI™". La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de natalizumab antes de cualquier modificación *in vivo* (por ejemplo, recorte de aminoácidos) se muestra en la Tabla 1-1 y la Tabla 1-2.

10

Tabla 1-1: Secuencia de cadena ligera de natalizumab (SEQ ID NO:1)

	10	20	30	40	50
1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKTSQDIN	KYMAWYQQTP	GKAPRLLIHY
51	TSALQPGIPS	RFSGSGSGRD	YTFTISSLQP	EDIATYYCLQ	YDNLWTFGQG
101	TKVEIKRTVA	APSVFIFPPS	DEQLKSGTAS	VVCLLNNFYP	REAKVQWKVD
151	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLTL	SKADYEKHKV	YACEVTHQGL
201	SSPVTKSFNR	GEC			

Tabla 1-2: Secuencia de cadena pesada de natalizumab (SEQ ID NO:2)

	10	20	30	40	50
Q ¹ VQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGQRLEWMGR	
IDPANGYTKY	DPKFQGRVTI	TADTSASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCAREG	
YYGNYGVYAM	DYWGQGT	VSSASTKGPS	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	
LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL	QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	
TKTYTCNV	KPSNTKVDKR	VESKYGPPCP	SCPAPFLGG	PSVFLFPPKP	
KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	QEDPEVQFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQFN	
STYRVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKG	LPSSIIEKTIS	KAKGQPREPQ	
VYTLPPSQEE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	
LDSDGSFFLY	SRLTVDKSRW	QEGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSLGG ²	

15

¹Glutamina ciclada en ácido piroglutámico

²La lisina se elimina postraduccionalmente

- 20 El natalizumab inhibe la migración de los leucocitos de la sangre al sistema nervioso central. El natalizumab se une al VLA-4 (también llamado $\alpha 4 \beta 1$) en la superficie de los linfocitos T activados y otros leucocitos mononucleares. Puede interrumpir la adhesión entre los linfocitos T y las células endoteliales, y así evitar la migración de leucocitos mononucleares a través del endotelio y hacia el parénquima. Como resultado, los niveles de citocinas proinflamatorias también pueden reducirse.

- 25 El natalizumab puede disminuir el número de lesiones cerebrales y las recaídas clínicas en pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente y esclerosis múltiple secundaria progresiva recurrente.

- 30 Se describen natalizumab y anticuerpos de unión a VLA-4 relacionados, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.840.299. Los anticuerpos monoclonales 21.6 y HP1/2 son anticuerpos monoclonales murinos ejemplares que se unen a VLA-4. El natalizumab es una versión humanizada del anticuerpo monoclonal murino 21.6 (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.840.299). También se ha descrito una versión humanizada de HP1/2 (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 6.602.503). Se describen varios anticuerpos monoclonales de unión a VLA-4 adicionales, tales como HP2/1, HP2/4, L25 y P4C2, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos N.º 6.602.503; Sanchez-Madrid et al., 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349; Hemler et al., 1987 J. Biol. Chem. 262:11478-11485; Issekutz y Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147: 109 (TA-2 mab); Pulido et al., 1991 J. Biol. Chem., 266:10241-10245; y la Pat. de Estados Unidos N.º 5.888.507.

- 40 Algunos anticuerpos de unión a VLA-4 reconocen epítomos de la subunidad $\alpha 4$ que están implicados en la unión a un ligando análogo, por ejemplo, VCAM-1 o fibronectina. Muchos de estos anticuerpos inhiben la unión de VLA-4 a ligandos análogos (por ejemplo, VCAM-1 y fibronectina).

Algunos anticuerpos de unión a VLA-4 útiles pueden interactuar con VLA-4 en las células, por ejemplo, linfocitos,

pero no causan agregación celular. Sin embargo, se ha observado que otros anticuerpos de unión a VLA-4 causan tal agregación. HP 1/2 no causa agregación celular. El anticuerpo monoclonal HP1/2 (Sanchez-Madrid et al., 1986) tiene una potencia extremadamente alta, bloquea la interacción de VLA-4 tanto con VCAM1 como con fibronectina, y tiene la especificidad para el epítipo B en VLA-4. Este anticuerpo y otros anticuerpos específicos de epítipo B (tal como los anticuerpos de unión a epítipo B1 o B2; Pulido et al., 1991, anteriormente) representan una clase de anticuerpos de unión a VLA-4 que se pueden usar en las formulaciones y métodos descritos en el presente documento.

Un anticuerpo de unión a VLA-4 ilustrativo tiene una o más CDR, por ejemplo, las tres CDR de HC y/o las tres CDR de LC de un anticuerpo particular descrito en el presente documento, o CDR que son, en suma, al menos un 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idénticas a un anticuerpo de este tipo, por ejemplo, natalizumab. En un caso, los bucles hipervariables H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en el presente documento. En un caso, los bucles hipervariables L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en el presente documento.

En un caso, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable HC y/o LC es al menos un 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable HC y/o LC de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, natalizumab. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable 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 el presente documento, por ejemplo, natalizumab. Por ejemplo, las diferencias pueden estar principal o totalmente en las regiones marco.

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio variable HC y LC pueden ser codificados por una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta astringencia a una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento o una que codifica un dominio variable o una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento. En un caso, las secuencias de aminoácidos de una o más regiones marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) del dominio variable HC y/o LC son al menos un 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o un 100 % idénticas a las regiones marco correspondientes de los dominios variables HC y LC de un anticuerpo descrito en el presente documento. En un caso, una o más regiones marco de cadena pesada o ligera (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 de HC) son al menos un 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 100 % idénticas a la secuencia de regiones marco correspondientes de un anticuerpo de la línea germinal humana.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (las expresiones se utilizan indistintamente en el presente documento) se realizan como se indica a continuación. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para fines comparativos). La alineación óptima se determina como la mejor puntuación utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de 5. Luego se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se utiliza en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se hibrida bajo condiciones de alta astringencia" describe condiciones para hibridación y lavado. Una orientación para la realización de las reacciones de hibridación puede encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3. Se describen y se pueden utilizar métodos acuosos y no acuosos en esa referencia. Las condiciones de hibridación de alta astringencia incluyen hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C o condiciones sustancialmente similares.

55 Administración

Las formulaciones de anticuerpos de unión a VLA-4 altamente concentradas descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, mediante una diversidad de métodos, incluyendo administración subcutánea, intramuscular e intravenosa. Típicamente, la administración es por inyección subcutánea o intramuscular.

La formulación puede administrarse como una dosis fija, o en una dosis de mg/kg. Típicamente la administración es en una dosis fija. Por ejemplo, la formulación se administra a una dosis unitaria fija de entre 75 mg y 500 mg (por ejemplo, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg) cada 4 semanas (por ejemplo, mensualmente), o entre 50 mg y 250 mg (por ejemplo, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg) cada dos semanas, o entre 25 mg y 150 mg (por ejemplo, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg) una vez a la semana. La formulación también se puede administrar en un bolo a una dosis de entre 1 y 8 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 6,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1,0 mg/kg. Los intervalos de dosis modificados incluyen una dosis que es menor de 500, 400, 300, 250, 200, 150 o 100 mg/sujeto, típicamente para administración cada cuatro semanas o una vez al mes. El anticuerpo de unión a VLA-4 se puede administrar, por ejemplo, cada tres a cinco semanas, por ejemplo, cada cuatro semanas, o mensualmente.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica. La dosis también se puede elegir para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el anticuerpo de unión a VLA-4, para lograr una saturación mayor del 40, 50, 70, 75 u 80 % de la subunidad $\alpha 4$, para alcanzar menos del 80 %, 70 %, 60 %, 50 % o 40 % de saturación de la subunidad $\alpha 4$, o para prevenir un aumento del nivel de glóbulos blancos circulantes.

En ciertas realizaciones, el agente activo puede prepararse con un vehículo que protegerá al anticuerpo contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica. Una "respuesta terapéutica" es una mejora en una afección, síntoma o parámetro asociado con un trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para un experto en la técnica.

La forma unitaria de dosificación o "dosis fija" como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de anticuerpo activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido y, opcionalmente, en asociación con el otro agente.

Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo de unión a VLA-4, por ejemplo, natalizumab, descrito en el presente documento. Dichas cantidades eficaces pueden determinarse en función del efecto del agente administrado, o del efecto combinatorio de un agente y agente secundario si se usa más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente también puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, la mejora de al menos un parámetro de trastorno, por ejemplo, un parámetro de esclerosis múltiple, o la mejora de al menos un síntoma del trastorno, por ejemplo, esclerosis múltiple. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Dispositivos y kits

Las formulaciones que tienen una alta concentración de un anticuerpo de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab) se pueden administrar con un dispositivo médico. El dispositivo puede diseñarse con, o tener características tales como portabilidad, almacenamiento a temperatura ambiente y facilidad de uso para que pueda ser utilizado en situaciones de emergencia, por ejemplo, por un sujeto no capacitado o por personal de emergencia en el campo, 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 de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab), y puede configurarse para administrar una o más dosis unitarias del agente.

Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar con un dispositivo de administración transcutánea, tal como una jeringa, incluyendo una jeringa hipodérmica o de múltiples cámaras. En una realización, el dispositivo es una jeringa precargada con aguja adjunta o integral. En otras realizaciones, el dispositivo es una jeringa precargada que no tiene una aguja adjunta. La aguja se puede envasar con la jeringa precargada. En una realización, el dispositivo es un dispositivo de autoinyección, por ejemplo, una jeringa con autoinyector. En otra

realización, el dispositivo de inyección es un inyector de pluma. En otra realización más, la jeringa es una jeringa de aguja apilada, una jeringa luer lock o una jeringa luer slip. Otros dispositivos de administración adecuados incluyen endoprótesis, catéteres, microagujas y dispositivos implantables de liberación controlada. La composición se puede administrar por vía intravenosa con un equipo estándar de IV, incluyendo, por ejemplo, tubos de IV, con o sin filtros en línea. En ciertas realizaciones, el dispositivo será una jeringa para su uso en administración SC o IM.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, o 10 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos incluyen: Pat. de Estados Unidos N.º 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; Pat. de Estados Unidos N.º 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Pat. de Estados Unidos N.º 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; Pat. de Estados Unidos N.º 4.447.224, que describe un 15 aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; Pat. de Estados Unidos N.º 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y Pat. de Estados Unidos N.º 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico. La composición terapéutica también puede estar en forma de una formulación de liberación sostenida biodegradable o no biodegradable para administración subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, la Pat. de 20 Estados Unidos N.º 3.773.919 y 4.767.628 y la Solicitud PCT N.º WO 94/15587. La administración continua también se puede lograr utilizando una bomba implantable o externa. La administración también se puede realizar de forma intermitente, por ejemplo, inyección diaria única, o continuamente a una dosis baja, por ejemplo, formulación de liberación sostenida. El dispositivo de administración puede modificarse para adaptarse de manera óptima a la administración del anticuerpo de unión a VLA-4. Por ejemplo, una jeringa se puede siliconizar en una medida que 25 sea óptima para el almacenamiento y la administración de anticuerpos anti-VLA-4. Por supuesto, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos similares.

La descripción también presenta un dispositivo para administrar un primer y segundo agente. El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más alojamientos para almacenar preparaciones farmacéuticas, y puede configurarse 30 para administrar dosis unitarias del primer y segundo agente. El primer y el segundo agente se pueden almacenar en compartimientos iguales o separados. Por ejemplo, el dispositivo puede combinar los agentes antes de la administración. También es posible utilizar diferentes dispositivos para administrar el primer y segundo agente.

Se puede proporcionar un anticuerpo de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab) en un kit. En un caso, el kit 35 incluye (a) un recipiente que contiene una composición que incluye una alta concentración de anticuerpo de unión 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 está relacionado con los métodos descritos en el presente documento y/o el uso de los agentes para beneficio terapéutico. En un caso, el kit también incluye un segundo agente. Por ejemplo, el kit incluye un 40 primer recipiente que contiene una composición que incluye el anticuerpo de unión a VLA-4, y un segundo recipiente que incluye el segundo agente. En un caso, el kit incluye una o más jeringas de un solo uso precargadas con una formulación de anticuerpo líquido de alta concentración descrita en el presente documento.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En un caso, el material informativo puede incluir 45 información sobre la producción del anticuerpo, la concentración, la fecha de caducidad, la información del lote o del sitio de producción, etc. En un caso, el material informativo se refiere a los métodos de administración del anticuerpo de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab), por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración descrito en el presente documento), para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, EM), o que está en riesgo 50 de experimentar un episodio asociado con una enfermedad inflamatoria. La información se puede proporcionar en una diversidad de formatos, incluyendo texto impreso, material legible por ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio, o información que proporciona un enlace o dirección al material sustantivo.

Además del agente, la composición en el kit puede incluir otros ingredientes, tal como un disolvente o tampón, un 55 estabilizante o un conservante. El agente se puede proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, en forma líquida, seca o liofilizada, y en forma sustancialmente pura y/o estéril. Cuando los agentes se proporcionan en una solución líquida, la solución líquida es, por ejemplo, una solución acuosa. Cuando los agentes se proporcionan en forma seca, la reconstitución generalmente se realiza mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, puede proporcionarse opcionalmente en el kit.

60

El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición o composiciones que contienen los agentes. En algunos casos, el kit contiene recipientes, divisores o compartimientos separados 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 de plástico o paquete. En otros casos, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un recipiente único, no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene adjunta a la misma material informativo en forma de una etiqueta. En algunos casos, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, conteniendo cada uno una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en el presente documento) de los agentes. Los recipientes pueden incluir una dosis unitaria combinada, por ejemplo, una unidad que incluye tanto el anticuerpo de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab) como el segundo agente, por ejemplo, en una relación deseada. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de papel de aluminio, paquetes de ampollas o dispositivos médicos, por ejemplo, conteniendo cada uno una dosis unitaria de combinación única. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos, impermeables (por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación) y/o herméticos a la luz.

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa u otro dispositivo de administración adecuado. El dispositivo se puede proporcionar precargado con uno o ambos agentes o puede estar vacío, pero es adecuado para la carga.

20 *Esclerosis múltiple*

Las formulaciones que tienen un anticuerpo de unión a VLA-4 altamente concentrado adecuado para la administración SC o IM son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como la esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple es una enfermedad del sistema nervioso central que se caracteriza por la inflamación y la pérdida de vainas de mielina.

Los pacientes que tienen EM pueden identificarse mediante criterios que establecen un diagnóstico de EM clínicamente definida según lo definido por el taller sobre el diagnóstico de EM (Poser et al., Ann. Neurol. 13:227, 1983). En resumen, un individuo con EM clínicamente definida ha tenido dos ataques y evidencia clínica de dos lesiones o evidencia clínica de una lesión y evidencia paraclínica de otra lesión separada. La EM definitiva también se puede diagnosticar mediante evidencia de dos ataques y bandas oligoclonales de IgG en el líquido cefalorraquídeo o por combinación de un ataque, evidencia clínica de dos lesiones y banda oligoclonal de IgG en el líquido cefalorraquídeo. Los criterios de McDonald también se pueden utilizar para diagnosticar 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 evidencia de MRI de deterioro del SNC a lo largo del tiempo a usar en el diagnóstico de EM, en ausencia de ataques clínicos múltiples. El tratamiento eficaz de la esclerosis múltiple se puede evaluar de varias maneras diferentes. Los siguientes parámetros se pueden usar para medir la eficacia del tratamiento. Dos criterios ejemplares incluyen: EDSS (escala de estado de discapacidad extendida) y aparición de exacerbaciones en MRI (resonancia magnética). La EDSS es un medio para calificar el deterioro clínico debido a la EM (Kurtzke, Neurology 33:1444, 1983). Se evalúan ocho sistemas funcionales según el tipo y la gravedad del deterioro neurológico. Brevemente, antes del tratamiento, se evalúa a los pacientes para detectar deterioro en los siguientes sistemas: piramidal, cerebelo, tronco cerebral, sensorial, intestinal y vesical, visual, cerebral y otros. Los seguimientos se realizan a intervalos definidos. La escala varía de 0 (normal) a 10 (muerte por EM). Una disminución de una etapa completa indica un tratamiento eficaz (Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79, 1994).

Las exacerbaciones se definen como la aparición de un nuevo síntoma que se puede atribuir a la EM y que se acompaña de una nueva anomalía neurológica apropiada (grupo de estudio de la EM con IFNB, anteriormente). Además, la exacerbación debe durar al menos 24 horas y debe ir precedida de estabilidad o mejora durante al menos 30 días. Brevemente, los médicos realizan un examen neurológico estándar en los pacientes. Las exacerbaciones son leves, moderadas o graves según los cambios en una Escala de Clasificación Neurológica (Sipe et al., Neurology 34:1368, 1984). Se determina una tasa de exacerbación anual y una proporción de pacientes sin exacerbaciones.

La terapia puede considerarse eficaz si existe una diferencia estadísticamente significativa en la tasa o proporción de pacientes sin exacerbaciones o sin recaídas entre el grupo tratado y el grupo de placebo para cualquiera de estas mediciones. Además, también se puede medir el tiempo hasta la primera exacerbación y la duración y la gravedad de la exacerbación. Una medida de la eficacia como terapia en este sentido es una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la primera exacerbación o la duración y la gravedad en el grupo tratado en comparación con el grupo control. Un periodo sin exacerbaciones o sin recaídas de más de un año, 18 meses o 20

meses es particularmente notable.

- La eficacia de administrar un primer agente y, opcionalmente, un segundo agente, también se puede evaluar en función de uno o más de los siguientes criterios: frecuencia de linfocitos T reactivos a MBP determinada por dilución limitante, respuesta de proliferación de líneas de linfocitos T reactivos a MBP y clones, perfiles de citocinas de líneas de linfocitos T y clones a MBP establecidos de pacientes. La eficacia está indicada por la disminución en la frecuencia de las células reactivas, una reducción en la incorporación de timidina con un péptido alterado en comparación con el nativo, y una reducción en el TNF e IFN- α .
- 10 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, una demora en la progresión sostenida de la discapacidad muestra la eficacia. Otros criterios incluyen un cambio en el área y el volumen de las imágenes T2 en la MRI, y el número y el volumen de las lesiones determinadas por las imágenes potenciadas con gadolinio.
- 15 La MRI se puede usar para medir lesiones activas usando imágenes potenciadas con gadolinio-DTPA (McDonald et al. Ann. Neurol. 36:14, 1994) o la ubicación y extensión de las lesiones usando técnicas ponderadas en T₂. En resumen, se obtienen MRI iniciales. El mismo plano de imagen y la posición del paciente se utilizan para cada estudio posterior. Se pueden elegir las secuencias de posicionamiento e imagen para maximizar la detección de lesiones y facilitar el seguimiento de las lesiones. Las mismas secuencias de posicionamiento e imagen pueden usarse en estudios posteriores. La presencia, ubicación y extensión de las lesiones de EM pueden determinarse por los radiólogos. Las áreas de las lesiones se pueden delinear y sumar corte por corte para determinar el área total de la lesión. Se pueden hacer tres análisis: evidencia de nuevas lesiones, tasa de aparición de lesiones activas, porcentaje de cambio en el área de la lesión (Paty et al., Neurology 43:665, 1993). La mejora debida a la terapia se puede establecer mediante una mejora estadísticamente significativa en un paciente individual en comparación con el valor inicial o en un grupo tratado frente a un grupo de placebo.
- 20 Los síntomas ejemplares asociados con la esclerosis múltiple, que pueden tratarse con los métodos descritos en el presente documento, incluyen: neuritis óptica, diplopía, nistagmo, dismetría ocular, oftalmoplejía internuclear, fosfenos de movimiento y sonido, defecto de pupila aferente, paresia, monoparesia, paraparesia, hemiparesia, cuadriparesia, plegia, paraplejia, hemiplejia, tetraplejia, cuadriplegia, espasticidad, disartria, atrofia muscular, espasmos, calambres, hipotonía, clono, mioclonos, mioquimia, síndrome de las piernas inquietas, pie caído, reflejos disfuncionales, parestesia, anestesia, neuralgia, dolor neuropático y neurogénico, l'hermitte, disfunción propioceptiva, neuralgia del trigémino, ataxia, temblor de intención, dismetría, ataxia vestibular, vértigo, ataxia del habla, distonía, disdiadococinesia, micciones frecuentes, espasticidad vesical, vejiga flácida, disinergia detrusor-esfínter, disfunción eréctil, anorgasmia, frigidez, estreñimiento, urgencia fecal, incontinencia fecal, depresión, disfunción cognitiva, demencia, cambios de humor, labilidad emocional, euforia, síndrome bipolar, ansiedad, afasia, disfasia, fatiga, síntomas de uhthoff, reflujo gastroesofágico y trastornos del sueño.
- 30 Cada caso de EM muestra uno de varios patrones de presentación y curso posterior. Más comúnmente, la EM primero se manifiesta como una serie de ataques seguidos por remisiones completas o parciales a medida que los síntomas disminuyen misteriosamente, y luego regresan después de un periodo de estabilidad. Esto se denomina EM recurrente-remitente (RR). La EM primaria-progresiva (PP) se caracteriza por un declive clínico gradual sin remisiones distintas, aunque puede haber mesetas temporales o un alivio menor de los síntomas. La EM secundaria-progresiva (SP) comienza con un curso de recaídas-remisiones seguido de un curso posterior progresivo primario. En raras ocasiones, los pacientes pueden tener un curso de recaída progresiva (PR) en el que la enfermedad toma un camino progresivo con ataques agudos puntuales. PP, SP, y PR a veces se agrupan y se denominan EM progresiva crónica.
- 40 Algunos pacientes experimentan EM maligna, definida como un declive rápido e implacable que da como resultado una discapacidad significativa o incluso la muerte poco después del inicio de la enfermedad. Esta disminución puede detenerse o desacelerarse mediante la administración de una terapia de combinación descrita en el presente documento.
- 50 Además de o antes de los estudios en seres humanos, se puede usar un modelo animal para evaluar la eficacia del uso de los dos agentes. Un modelo animal ejemplar para la esclerosis múltiple es el modelo de ratón experimental de encefalitis autoinmune (EAE), por ejemplo, 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 se les puede administrar un primer y segundo agente descritos en el presente documento antes de la inducción de EAE. Luego, se evalúa a los ratones con criterios característicos para determinar la eficacia del uso de

los dos agentes en el modelo.

Otros trastornos

- 5 Las formulaciones y los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para tratar otros trastornos inflamatorios, inmunes o autoinmunes, por ejemplo, inflamación del sistema nervioso central (por ejemplo, además de esclerosis múltiple, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcoidosis, vasculitis del SNC), encefalitis y mielitis transversa), rechazo de injertos de tejidos u órganos o enfermedad de injerto contra huésped, lesión aguda del SNC, por ejemplo, ictus o lesión de la médula espinal; enfermedad renal crónica; alergia, por ejemplo, asma
- 10 alérgica; diabetes tipo 1; trastornos inflamatorios del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; miastenia gravis; fibromialgia; trastornos artríticos, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica; trastornos inflamatorios/inmunitarios de la piel, por ejemplo, psoriasis, vitiligo, dermatitis, liquen plano; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; cánceres hematológicos, por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, linfoma; cánceres sólidos, por ejemplo, sarcomas o carcinomas, por ejemplo, de pulmón, mama, próstata, cerebro; y
- 15 trastornos fibróticos, por ejemplo, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis mesangial proliferativa, glomerulonefritis crescética, nefropatía diabética y fibrosis intersticial renal.

Por ejemplo, una formulación que contiene una alta concentración de anticuerpo de unión a VLA-4 (por ejemplo, natalizumab) puede administrarse por vía subcutánea o intramuscular para tratar estos y otros trastornos

20 inflamatorios, inmunes o autoinmunes.

Generación de anticuerpos

- Los anticuerpos que se unen a VLA-4 pueden generarse por inmunización, por ejemplo, usando un animal, o por
- 25 métodos *in vitro* como la presentación de fagos. Todo o parte de VLA-4 se puede utilizar como un inmunógeno. Por ejemplo, la región extracelular de la subunidad $\alpha 4$ se puede usar como un inmunógeno. En una realización, el animal inmunizado contiene células productoras de inmunoglobulinas con loci de inmunoglobulinas naturales, humanas o parcialmente humanas. En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de
- 30 anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Utilizando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para antígenos derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XenoMouse™, Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994), documento U.S. 2003-0070185, Pat. de Estados Unidos N.º 5.789.650, y el documento WO 96/34096.
- 35 También se pueden producir anticuerpos no humanos contra VLA-4, por ejemplo, en un roedor. El anticuerpo no humano puede humanizarse, por ejemplo, como se describe en la Pat. de Estados Unidos N.º 6.602.503, documento EP 239 400, Pat. de Estados Unidos N.º 5.693.761, y Pat. de Estados Unidos N.º 6.407.213.

El documento EP 239 400 (Winter et al.) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (dentro de una región variable dada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para una especie con los de otra. Los anticuerpos sustituidos con CDR es menos probable que provoquen una respuesta inmune en los seres humanos en comparación con anticuerpos quiméricos verdaderos porque los anticuerpos sustituidos con CDR contienen considerablemente menos componentes no humanos. (Riechmann et al., 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239, 1534-1536). Típicamente, las CDR de un anticuerpo murino son sustituidas en

45 las regiones correspondientes en un anticuerpo humano utilizando tecnología de ácido nucleico recombinante para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Se pueden añadir segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (habitualmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de la cadena pesada y ligera humanizados pueden co-expresarse en células de mamífero para producir un anticuerpo humanizado soluble.

- 50 Queen et al., 1989 y el documento WO 90/07861 han descrito un procedimiento que incluye la elección de regiones de marco V humanas mediante análisis por ordenador en cuanto a la óptima homología de secuencia de la proteína con la región de marco V del anticuerpo murino original, y el modelado de la estructura terciaria de la región V murina para visualizar los residuos de aminoácido marco que es probable que interactúen con las CDR murinas.
- 55 Estos residuos de aminoácidos murinos se superponen entonces sobre el marco humano homólogo. Véanse también las Pat. de Estados Unidos N.º 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101. Tempest et al., 1991, Biotechnology 9, 266-271, utilizan, como patrón, los marcos de la región V derivados de las cadenas pesadas y ligeras NEWM y REI, respectivamente, para el injerto de CDR sin la introducción en los radicales de residuos de ratón. Una ventaja de utilizar el enfoque de Tempest et al., para construir anticuerpos humanizados basados en
- 60 NEWM y REI es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables de NEWM y REI son conocidas de la

cristalografía de rayos X y, de este modo, se pueden modelar las interacciones específicas entre las CDR y residuos de marco de la región V.

Los anticuerpos no humanos pueden ser modificados para incluir sustituciones que insertan secuencias humanas de inmunoglobulina, por ejemplo, residuos de aminoácidos consenso humanos en posiciones particulares, por ejemplo, en una o más de las siguientes posiciones (tal como al menos cinco, diez, doce, o todas): (en el FR del dominio variable de la cadena ligera) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, y/o (en el FR del dominio variable de la cadena pesada) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, y/o 103H (de acuerdo con la numeración de Kabat). Véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 6.407.213.

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a VLA-4 pueden ser producidos, por ejemplo, utilizando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, como se describe por Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147, 86-95. Se pueden preparar por clonación del repertorio según como describe por Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 2432-2436 o por Huang and Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236; también la Pat. de Estados Unidos N.º 5.798.230. También se pueden utilizar grandes bancos de presentación de fagos humanos no inmunizados para aislar anticuerpos de alta afinidad que se pueden desarrollar como agentes terapéuticos humanos utilizando una tecnología de fagos estándar (véase, por ejemplo, Vaughan et al., 1996; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20; y Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8; U.S. 2003-0232333).

Producción de Anticuerpos

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

En una realización, los anticuerpos, en particular anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, se producen en células de mamífero. Las células huésped de mamífero ilustrativas para la expresión recombinante incluyen células ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562 y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias de ácidos nucleicos adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Los genes marcadores seleccionables ilustrativos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped *dhfr* con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

En un sistema ilustrativo para la expresión recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o una porción de unión a antígeno 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 la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente enlazados a elementos reguladores de potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares tales como un elemento regulador de potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador de potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando la selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan técnicas de biología molecular estándares para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped, y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos pueden aislarse mediante cromatografía de afinidad con una Proteína A o Proteína G. Por ejemplo, los anticuerpos purificados de unión a VLA-4, por ejemplo, natalizumab, pueden concentrarse de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml usando técnicas estándar de concentración de proteínas.

Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función de Fc, por ejemplo, para disminuir o eliminar la interacción con un receptor de Fc o con C1q, o ambos. Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana se puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237, por ejemplo, de acuerdo con la numeración en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.648.260. Otras modificaciones
5 ejemplares incluyen las descritas en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.648.260.

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 está glucosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glucosilado en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con
10 oligosacáridos de tipo biantenarico. Esta glucosilación participa en funciones efectoras mediadas por receptores Fcγ y complemento C1q (Burton y Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis et al. (1998) Immunol. Rev. 163:59-76). El dominio Fc puede ser producido en un sistema de expresión de mamífero que glucosila adecuadamente el residuo correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.

15 Los anticuerpos también pueden ser producidos por un animal transgénico. Por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.849.992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico para la leche y secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, y una secuencia
20 señal para la secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretado en su interior, el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento. El anticuerpo puede ser purificado de la leche, o para algunas aplicaciones, se puede utilizar directamente.

Los anticuerpos pueden modificarse, por ejemplo, con un resto que mejora su estabilización y/o retención en
25 circulación, por ejemplo, en sangre, suero, linfa, lavado broncoalveolar u otros tejidos, por ejemplo, en al menos 1,5, 2, 5, 10 o 50 veces.

Por ejemplo, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede estar asociado con un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, tal como un óxido de polialquileno o un óxido de polietileno. Los polímeros
30 adecuados variarán sustancialmente en peso. Se pueden usar polímeros que tengan un peso molecular promedio en número que varíe de aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 daltons (o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, y de 2.000 a aproximadamente 12.500).

Por ejemplo, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede conjugarse con un polímero soluble en agua, por ejemplo, un
35 polímero de polivinilo hidrófilo, por ejemplo, alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque. Los polímeros útiles adicionales incluyen
40 polioxilalquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros de sacárido 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 tales como lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietil almidón, amilosa, dextrano sulfato,
45 dextrano, dextrinas, glucógeno, o la subunidad polisacárida de los mucopolisacáridos de ácido, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polmannitol; heparina o heparan.

Segundos agentes ejemplares

50 En algunos casos, las formulaciones descritas en el presente documento, por ejemplo, formulaciones que contienen una alta concentración de anticuerpo de unión a VLA-4 adecuada para la administración SC o IM, incluyen un segundo agente, o se administran en combinación con una formulación que contiene un segundo agente.

En una implementación, el anticuerpo de unión a VLA-4 y el segundo agente se proporcionan como una
55 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 de anticuerpo altamente concentrada y después una dosis de una formulación que contenga el segundo agente. En otra implementación, el anticuerpo y el segundo agente se proporcionan como formulaciones separadas, y la etapa de administración incluye la administración secuencial del anticuerpo y el segundo agente. Las administraciones
60 secuenciales se pueden proporcionar el mismo día (por ejemplo, en una hora entre sí o con al menos 3, 6 o 12 horas

de diferencia) o en días diferentes.

En general, 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 generalmente se administran cada uno de acuerdo con un régimen. El régimen para uno o ambos puede tener una periodicidad regular. El régimen para el anticuerpo puede tener una periodicidad diferente del régimen para el segundo agente, por ejemplo, uno puede administrarse con más frecuencia que el otro. En una implementación, uno del anticuerpo y el segundo agente se administran una vez a la semana y el otro una vez al mes. En otra implementación, uno del anticuerpo y el segundo agente se administran continuamente, por ejemplo, durante un periodo de más de 30 minutos, pero 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 método apropiado, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

En algunos casos, cada uno del anticuerpo y el segundo agente se administran en la misma dosis que se prescribe para la monoterapia. En otros casos, el anticuerpo se administra en una dosis que es igual o menor que una cantidad requerida para la eficacia si se administra en solitario. Del mismo modo, el segundo agente puede administrarse en una dosis que sea igual o menor que una cantidad requerida para la eficacia si se administra solo.

Los ejemplos no limitantes de segundos agentes para tratar la esclerosis múltiple en combinación con un anticuerpo de unión a VLA-4 incluyen:

- interferones, por ejemplo, interferón beta-1a humano (por ejemplo, AVONEX® o Rebif®) y interferón beta-lb (BETASERON™; interferón beta humano sustituido en la posición 17; Berlex/Chiron);
- acetato de glatiramer (también denominado Copolímero 1, Cop-1; COPAXONE™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);
- Rituxan® (rituximab) u otro anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, uno que compita o se une a un epítipo superpuesto con rituximab;
- mixtoxantrona (NOVANTRONE®, Lederle);
- un producto quimioterapéutico, por ejemplo, clabribina (LEUSTATIN®), azatioprina (IMURAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®), ciclosporina-A, metotrexato, 4-aminopiridina y tizanidina;
- un corticosteroide, por ejemplo, metilprednisolona (MEDRONE®, Pfizer), prednisona;
- una inmunoglobulina, por ejemplo, Rituxan® (rituximab); CTLA4 Ig; alemtuzumab (MabCAMPATH®) o daclizumab (un anticuerpo que se une a CD25);
- estatinas;
- antagonistas del TNF.

El acetato de glatiramer es una proteína formada por una cadena aleatoria de aminoácidos: ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina (por lo tanto, GLATiramer). Se puede sintetizar en solución a partir de estos aminoácidos una relación de aproximadamente 5 partes de alanina con respecto a 3 de lisina, 1,5 de ácido glutámico y 1 de tirosina usando anhídridos de N-carboxiaminoácido.

Los segundos agentes adicionales incluyen anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, 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. Aún otros segundos agentes ejemplares incluyen anticuerpos contra moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Por ejemplo, daclizumab es un anticuerpo anti-CD25 que puede mejorar la esclerosis múltiple.

Aún otros anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos que proporcionan una actividad de un agente descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo que se acopla a un receptor de interferón, por ejemplo, un receptor de interferón beta. Típicamente, en implementaciones en las que el segundo agente incluye un anticuerpo, se une a una proteína diana distinta de VLA-4 o distinta de la integrina $\alpha 4$, o al menos un epítipo en VLA-4 distinto del reconocido por el primer agente.

Aún otros segundos agentes adicionales incluyen: FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización de las citocinas proinflamatorias como se describe en el presente documento, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (por ejemplo, Vx740), anti-P7, PSGL, inhibidores de TACE, inhibidores de señalización de linfocitos T tales como inhibidores de cinasa, inhibidores de la metaloproteínasa, sulfasalazina, azatoprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos, como se describe en el presente documento, citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4,

IL-10, IL-13 y TGF).

En algunos casos, se puede usar un segundo agente para tratar uno o más síntomas o efectos secundarios de la EM. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, amantadina, baclofeno, papaverina, meclizina, hidroxizina, sulfametoxazol, ciprofloxacino, docusato, pemolina, dantroleno, desmopresina, dexametasona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, bisacodilo, venlafaxina, amitriptilina, metenamina, clonazepam, isoniazida, vardenafilo, nitrofurantoína, mucilo hidrófilo de psilio, alprostadil, gabapentina, nortriptilina, paroxetina, bromuro de propantelina, modafinilo, fluoxetina, fenazopiridina, metilprednisolona, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropión y sertralina. Muchos segundos agentes que son moléculas pequeñas tienen un peso molecular entre 150 y 5000 Daltons.

Los ejemplos de antagonistas de TNF incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) contra TNF (por ejemplo, TNF α humano), tal como D2E7, (anticuerpo TNF α humano, Pat. de Estados Unidos N.º 6.258.562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Pharmacia), cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; REMICADE™, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, CPD870); fragmentos solubles de los receptores de TNF, por ejemplo, receptores de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, por ejemplo, 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusión de IgG del receptor TNF 75 kD, ENBREL™; Immunex; véase, por ejemplo, Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A), p55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión de IgG del receptor TNF 55 kD (LENERCEPT™)); antagonistas enzimáticos, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE) (por ejemplo, un derivado de ácido alfa-sulfonil hidroxámico, documento WO 01/55112, e inhibidor TACE de N-hidroxiformamida GW 3333, -005, o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína de unión a TNF soluble; véase, por ejemplo, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, N.º 9 (complemento), S284; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, págs. 37-42).

Además de un segundo agente, también es posible administrar otros agentes al sujeto. Sin embargo, en algunos casos, no se administra ninguna proteína o ningún agente biológico, aparte del anticuerpo de unión a VLA-4 y el segundo agente, al sujeto como una composición farmacéutica. El anticuerpo de unión a VLA-4 y el segundo agente pueden ser los únicos agentes que se administran mediante inyección. En los casos en los que el anticuerpo de unión a VLA-4 y el segundo agente son proteínas recombinantes, el anticuerpo de unión a VLA-4 y el segundo agente pueden ser los únicos agentes recombinantes administrados al sujeto, o al menos los únicos agentes recombinantes que modulan el sistema inmunitario o respuestas inflamatorias. En otros casos, el anticuerpo de unión a VLA-4 solo es el único agente recombinante o el único agente biológico administrado al sujeto. Los siguientes ejemplos no pretenden ser limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Resumen del desarrollo de la formulación intravenosa: almacenamiento y estabilidad estructural. Se realizaron experimentos para determinar la capacidad de almacenamiento de una formulación de natalizumab que contenía 20 mg/ml de natalizumab en fosfato 10 mM, cloruro sódico 140 mM, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 6. Se calcularon las tasas de cambio de estabilidad durante el almacenamiento de la formulación para diferentes conjuntos de datos de condiciones de almacenamiento (2-8 °C durante 24 meses; 25 °C durante 12 meses; 40 °C durante 3 meses). Se usaron los siguientes parámetros para evaluar las tasas de cambio de estabilidad en comparación con el punto de tiempo inicial: porcentaje de agregación, porcentaje de oxidación del residuo de aminoácido metionina 255, porcentaje de semianticuerpo presente, porcentaje de H + L, porcentaje de fragmentación, porcentaje de sialilación y porcentaje de isoformas con un punto isoeléctrico inferior (pI). Los resultados de los ensayos de desarrollo de formulaciones de estabilidad en almacenamiento se muestran en la Tabla 2. Estos resultados también proporcionan un valor inicial para estudios de estabilidad de formulaciones que contienen concentraciones más altas de anticuerpos.

Tabla 2. Formulación de 20 mg/ml: Estabilidad en almacenamiento.

Atributo	Efecto de la condición de formulación en el degradante	Cambio durante el almacenamiento	Velocidad de cambio durante el almacenamiento		
			2-8 °C ¹	25 °C ²	40 °C ³
% de agregación	~pH 6 óptimo	Aumento	N/C	~0,1 % al año	~0,3 % al mes
% de oxidación de Met255	Optimizar minimizando los niveles de peróxido	Aumento	N/C	N/C	~0,4 - 1 % al mes

% de semianticuerpo	~pH 5-6 óptimo, dependiente del excipiente	Aumento	N/C	N/C	~1 %/mes
% de H+L	~pH 5-6,5 óptimo	Aumento	N/C	N/C	~1,5 %/mes
% de fragmentación	~pH 5-6,5 óptimo	Disminución	N/C	N/C	~1 %/mes
% de sialilación	~pH 5-6 óptimo (predicho)	Disminución	N/C	N/C	N/D
% de isoformas de pl inferior	~pH 5 óptimo	Aumento	~1 %/año	~1,8 %/mes	~14 %/mes
¹ Tasa calculada usando datos de tiempo real de 24 meses. ² Tasa calculada usando un conjunto de datos de 12 meses. ³ Tasa calculada usando un conjunto de datos de 3 meses. N/C - Sin cambio, N/D - No determinado.					

Se utilizaron diversas técnicas biofísicas para evaluar la estabilidad estructural de la formulación de 20 mg/ml de natalizumab, incluyendo el control de la estructura secundaria de proteínas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), el control del entorno de los residuos de triptófano a través de la fluorescencia del triptófano con un espectrofotómetro fluorescente, el control de la estructura terciaria del pliegue de IgG a través del dicroísmo circular en UV lejano, y el control del entorno de los residuos aromáticos a través de UV y espectrofotometría visible.

La estabilidad estructural de la formulación de 20 mg/ml se optimizó, en parte, controlando la T_m (punto medio de la curva de fusión térmica) durante los experimentos de fusión térmica en un calorímetro de barrido diferencial (Microcal, Amherst, MA). Se supervisó el exceso de entalpía necesaria para fundir la proteína en comparación con el control del tampón y los datos se analizaron por ordenador. La fluorescencia del triptófano, conocida por ser sensible a la estabilidad estructural, se controló mediante espectrofotometría UV a temperaturas crecientes para optimizar las condiciones de la formulación. De nuevo, se usó espectrofotometría UV en la región de UV lejano para medir el pliegue de IgG. Se supervisaron seis picos, y se calculó la segunda derivada del espectro UV-Vis 230-320 nm para seguir el entorno de los residuos aromáticos como una medida de la estabilidad estructural en diversas formulaciones.

Los resultados de los estudios estructurales realizados para evaluar la estabilidad del natalizumab a 20 mg/ml se muestran en la Tabla 3. Estudios adicionales han demostrado que natalizumab experimenta una nucleación heterogénea durante el bombeo con bombas de pistón. No se observó ningún cambio en la calidad del anticuerpo después de múltiples ciclos de congelación/descongelación y el anticuerpo era estable después de una agitación prolongada de 2-3 días en viales (datos mostrados en el Ejemplo 2). Natalizumab experimenta agregación, oxidación y desamidación en presencia de un estrés lumínico intenso y también es sensible a la oxidación catalizada por metal cuando se almacena en contacto con acero inoxidable durante largos periodos de tiempo.

Tabla 3. Formulación de 20 mg/ml: Estabilidad estructural.

Propiedad molecular	Técnica	Condición de formulación óptima
Estructura secundaria	DSC	pH óptimo entre 7 y 8 (basándose en T_m a 68 °C)
Entorno de triptófano	Fluorescencia	pH ~7 (basándose en la Temp. de inicio más alta entre pH 4-9)
Pliegue de IgG	CD UV lejano	Control a 215-218 nm, T_m máxima a pH 7 sin sal
Entorno del residuo aromático	^{2a} Derivada de los picos UV-Vis	Se controlaron 6 picos, T_m máxima entre pH 5 y 7

Ejemplo 2. Experimentos de estabilidad acelerada de formulaciones de 150 mg/ml. Para determinar una formulación adecuada para concentraciones más altas de natalizumab, lo que sería útil para la administración subcutánea o intramuscular en particular, se realizaron experimentos de estabilidad acelerada con 150 mg/ml de natalizumab en diversas formulaciones. Las formulaciones de ensayo se sometieron a agitación en viales de vidrio tipo I USP/EP durante varios días a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Las formulaciones usadas en los estudios de agregación fueron las siguientes. HCN = histidina 20 mM, glicina 240 mM, pH 6. HOL = histidina 20 mM, glicerol 240 mM, pH 6. PCN = fosfato 20 mM, glicina 240 mM, pH 6. PST = fosfato 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6. Las formulaciones de HOL y HCN tienen un polisorbato 80 al 0,04 % (p/v) adicional. Las formulaciones de PCN y PST tienen un polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) adicional, excepto cuando se ensayan como una variable para estabilidad (Experimento 3 a continuación). Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para medir el porcentaje de agregación antes y después de la agitación.

Los niveles de agregados solubles antes y después de la agitación se muestran en la Figura 1. El porcentaje de agregados solubles se midió por SEC, y se observó el menor cambio en el porcentaje de agregados solubles en la formulación de HOL (histidina 20 mM, glicerol 240 mM, polisorbato 80 al 0,04 % (p/v), pH 6).

- 5 Las pruebas de estabilidad acelerada se realizaron como se ha descrito anteriormente, también se controlaron mediante absorbancia UV para detectar agregados. Se usó un espectrofotómetro UV para controlar la presencia de agregados antes y después de la agitación midiendo la absorbancia a 340 nm para soluciones de natalizumab a una concentración de 150 mg/ml en tampones HCN, HOL, PCN y PST como se ha descrito anteriormente, en un espectrofotómetro UV/Vis con una longitud de trayectoria de 1 cm.

- 10 Los resultados del estudio de absorbancia UV de la agregación de natalizumab (150 mg/ml) en diversas formulaciones antes y después de la agitación se pueden ver en la Figura 2. Las formulaciones de histidina (HOL y HCN) eran más estables en estas condiciones, como lo demuestra la menor absorbancia a 340 nm, lo que indica una menor agregación. Se observaron precipitados insolubles en las formulaciones de fosfato después del
15 almacenamiento durante 1 mes a 40 °C, pero no se observaron en las formulaciones de histidina.

La Tabla 4 compara los atributos de estabilidad de las formulaciones de 20 mg/ml y 150 mg/ml. Los resultados indican que las formulaciones de 20 mg/ml y 150 mg/ml son igualmente estables.

20 Tabla 4. Atributos de estabilidad a 20 mg/ml y 150 mg/ml

Atributo	Velocidad de cambio promedio. 5 °C al año	
	20 mg/ml	150 mg/ml
Agregación por SEC	<0,5 %	<0,5 %
Isoformas ácidas	~1 %	~1 %
Oxidación	<0,5 %	<0,5 %
Pureza (% de H+L)	<-0,5 %	<-0,5 %
Potencia	Sin cambio	Sin cambio

- Ejemplo 3. Polisorbato-80 tiene un efecto solubilizante sobre natalizumab. Se investigaron los efectos de solubilización de los niveles de polisorbato-80 en natalizumab a 20 mg/ml y 150 mg/ml. Se añadió polisorbato-80 a
25 varias concentraciones (p/v) a 20 mg/ml y 150 mg/ml de natalizumab en tampón HOL. La prueba de estabilidad acelerada se realizó agitando los materiales como se ha descrito anteriormente, durante 8 semanas a 40 °C. El porcentaje de agregación se midió por SEC como se describe en el Ejemplo anterior.

- El efecto de los niveles de polisorbato 80 en la estabilidad de natalizumab durante la agitación se muestra en la Figura 3, que muestra datos para natalizumab a 135-165 mg/ml. El nivel mínimo de polisorbato 80 para la estabilidad
30 durante los experimentos de agitación es de aproximadamente el 0,03 % (p/v) para 150 mg/ml de natalizumab, y el 0,02 % (p/v) para 20 mg/ml de natalizumab. Por lo tanto, la concentración de polisorbato 80 preferida varía según la concentración de anticuerpo.

- Ejemplo 4. Almacenamiento a largo plazo de natalizumab a diferentes temperaturas. La estabilidad de 150 mg/ml de
35 natalizumab en diversas formulaciones y entre 2-8 °C y a 40 °C se evaluó midiendo el porcentaje de agregación utilizando cromatografía de exclusión por tamaño como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Natalizumab (150 mg/ml) estaba en los tampones de HCN, HOL, PCN o PST como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Los datos de natalizumab almacenado a 40 °C se recopilaron durante cinco meses; natalizumab almacenado entre 2-8 °C se recopiló durante veinticuatro meses.

- 40 Los resultados de los efectos de estabilidad de diversas formulaciones de natalizumab (150 mg/ml) para el almacenamiento a 40 °C se muestran en la Figura 4; los resultados para el almacenamiento a 2-8 °C se muestran en la Figura 5. A una concentración de 150 mg/ml, natalizumab en la formulación de PST (fosfato 20 mM, NaCl 140 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), pH 6) se agregó al menos a 40 °C. No se observaron diferencias significativas en
45 la agregación cuando el anticuerpo se almacenó a 2-8 °C durante veinticuatro meses. Estos datos demostraron que la alta concentración de natalizumab en la formulación de PST es particularmente estable.

- Ejemplo 5. Oxidación con metionina de natalizumab reducida en formulaciones de fosfato La tendencia de los
50 residuos de metionina a oxidarse en diversas formulaciones de natalizumab (150 mg/ml), y los efectos protectores de la metionina libre (10 mM) se estudiaron por caracterización UV-HPLC de mapas peptídicos endoLysC. Se almacenó natalizumab (150 mg/ml) entre 2-8 °C y a 40 °C durante hasta veinticuatro meses en las formulaciones de histidina y fosfato (HOL, HCN, PST y PCN, como se describe en el Ejemplo 2). Los resultados, expresados como

porcentaje de metioninas oxidadas, se muestran en la Figura 6. Para las formulaciones de fosfato, la oxidación de metioninas en natalizumab a 150 mg/ml se redujo significativamente y se produjo a una tasa menor en ambos intervalos de temperatura, en comparación con las formulaciones de histidina.

- 5 Los efectos antioxidantes del exceso de metionina libre (L-met) en las formulaciones de histidina, tal como HOL, se observaron cuando se compararon con las formulaciones libres de metionina para natalizumab (150 mg/ml) almacenadas a 40 °C a lo largo de un periodo de tiempo de seis meses (Figura 7). El porcentaje de oxidación de metionina se cuantificó como se describe anteriormente. Por lo tanto, la formulación de natalizumab a 150 mg/ml en tampones de fosfato era más protectora contra la oxidación de metionina, y redujo el número de excipientes
10 necesarios para la estabilidad a 150 mg/ml.

Ejemplo 6. Tasa de fragmentación mayor en tampones de histidina que en tampones de fosfato. La tasa de fragmentación de natalizumab (20 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml y 150 mg/ml) en diversas formulaciones (HOL: histidina 20 mM, glicerol 240 mM, polisorbato 80 al 0,04 % (p/v), pH 6, y PST: fosfato 20 mM, NaCl 140 mM,
15 polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), pH 6) se comparó en el tiempo durante 8 semanas. La fragmentación se cuantificó midiendo el porcentaje de semianticuerpo mediante electroforesis capilar GelChip no reductora.

Los resultados de los estudios de fragmentación, que midieron el porcentaje de semianticuerpo en el tiempo para natalizumab en cuatro concentraciones diferentes (20 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml y 150 mg/ml) y en dos
20 formulaciones diferentes (HOL: histidina 20 mM, glicerol 240 mM, polisorbato 80 al 0,04 % (p/v), pH 6; y PST: fosfato 20 mM, NaCl 140 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), pH 6) se muestran en la Figura 8. La tasa de escisión de la bisagra es inferior en fosfato que en las formulaciones de histidina. El entorno de formulación de histidina es más reductor que el entorno de formulación de fosfato (basado en el potencial redox).

25 Ejemplo 7. Formulaciones ejemplares de natalizumab adecuadas para administración subcutánea o intramuscular. En vista de los experimentos anteriores, se determinó que las formulaciones basadas en fosfato eran óptimas para composiciones de natalizumab altamente concentradas adecuadas para la administración SC o IM. Las composiciones también pueden diluirse y usarse para administración IV. Los experimentos anteriores indican que natalizumab es menos susceptible a la oxidación cuando se almacena en formulaciones de fosfato, tal como PST y
30 PCN, que cuando se almacena en las formulaciones de histidina HOL y HCN. Por lo tanto, la metionina libre típicamente no se requiere en las formulaciones de fosfato para prevenir la oxidación de natalizumab (véase el Ejemplo 5). También se observó que la velocidad de fragmentación de natalizumab en la formulación de fosfato PST era menor que en la formulación de histidina HOL (véase el Ejemplo 6). La estabilidad a largo plazo fue mejor en las formulaciones de fosfato PST y PCN que en las formulaciones de histidina HOL y HCN.

35 En algunos casos, cada uno de los componentes de las formulaciones proporcionadas a continuación puede variar en un 10 %.

Ejemplo 8.

40 *Formulación ejemplar*

150 mg/ml de Natalizumab
tampón fosfato sódico 10 mM
45 cloruro sódico 140 mM
polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

Ejemplo 9.

50 *Formulación ejemplar*

150 mg/ml de Natalizumab
tampón fosfato sódico 10 mM
55 glicerol 275 mM
polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

Ejemplo 10.

60

Formulación ejemplar

- 150 mg/ml de Natalizumab
- tampón fosfato sódico 10 mM
- 5 clorhidrato de L-arginina 160 mM
- polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
- pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

Ejemplo 11.

10

Formulación ejemplar

- 150 mg/ml de Natalizumab
- tampón fosfato sódico 10 mM
- 15 sacarosa al 9 % (p/v)
- polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
- pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

Ejemplo 12.

20

Formulación ejemplar

- 150 mg/ml de Natalizumab
- tampón fosfato sódico 10 mM
- 25 sorbitol al 9 % (p/v)
- polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
- pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

Ejemplo 13.

30

Formulación ejemplar

- 150 mg/ml de Natalizumab
- L-histidina 20 mM
- 35 glicerol 240 mM
- L-metionina 10 mM
- polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
- pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

40 Ejemplo 14.

Formulación ejemplar

- 150 mg/ml de Natalizumab
- 45 L-histidina 20 mM
- glicerol 240 mM
- polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
- pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

50 Ejemplo 15. Datos de estabilidad.

La formulación proporcionada anteriormente como ejemplo 8 se almacenó en una jeringa de aguja apilada, y los datos de estabilidad se midieron en diversos puntos de tiempo. Estos datos se resumen en las Tablas a continuación e indican que la formulación, cuando se almacena en una jeringa a 5 °C, es estable durante al menos 18 a 24 meses.

Formulación

- 150 mg/ml de Natalizumab
- 60 tampón fosfato sódico 10 mM

ES 2 707 815 T3

cloruro sódico 140 mM
polisorbato 80 al 0,04 % (p/v)
pH ajustado a pH 6,0 ± 0,5

5 Agregados:

Tiempo, meses	% de agregados durante el almacenamiento a 5 °C
0	0,7
1	0,7
2	0,7
3	0,7
6	0,8
8	0,9
12	1,0
18	1,1

Potencia:

Tiempo, meses	Potencia relativa a 25 °C
0	100
8	101
12	97

10

Isoformas de pl inferior:

Tiempo, meses	% de isoformas de pl inferior durante el almacenamiento a 5 °C
0	15,2
1	15,4
2	15,1
3	15,6
6	13,5
8	13,3
12	15,0

Pureza (% de cadenas pesada + ligera):

15

Tiempo, meses	% de H+L durante el almacenamiento a 5 °C
0	100
1	100
2	100
3	100
8	98,8
12	100

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

20

<120> FORMULACIONES DE ANTICUERPO

<130> B2047-7051WO

25

<140>

<141>

<150> 60/944.076

<151> 14/06/2007

30

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 3.3

5 <210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 1

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
          20           25           30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
          85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
          100          105          110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
          115          120          125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
          130          135          140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
          145          150          155          160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
          165          170          175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
          180          185          190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
          195          200          205

Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

15

<210> 2

<211> 450

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética

ES 2 707 815 T3

<400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	20	25	30	
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Val	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220	
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	225	230	235	240

ES 2 707 815 T3

Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu		
			260					265					270				
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
		275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
	290					295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu		
			325						330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
			340					345					350				
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
		355					360					365					
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
	370					375					380						
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
385					390					395					400		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp		
				405					410					415			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
			420					425					430				
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu		
		435					440					445					
Gly	Lys																
	450																

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica acuosa estable para administración subcutánea o intramuscular a un sujeto, donde la composición comprende natalizumab a una concentración de 120 a 190 mg/ml, un tampón fosfato a una concentración de 5 mM a 30 mM, cloruro de sodio a una concentración entre 100 mM y 200 mM, y polisorbato 80 en una cantidad del 0,01 % al 0,1 % (p/v), y donde la composición tiene un pH 5,5 a pH 6,5, y donde natalizumab comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 2.
2. La composición de la reivindicación 1, donde el tampón fosfato es un tampón fosfato de sodio.
3. La composición de la reivindicación 1, donde el cloruro de sodio está presente a 140 mM.
4. La composición de la reivindicación 1, donde natalizumab se encuentra a una concentración de 150 mg/ml.
5. La composición de la reivindicación 1, donde la composición comprende natalizumab a una concentración de 140 a 160 mg/ml, un tampón fosfato de sodio a una concentración de 5 mM a 15 mM, cloruro de sodio a una concentración de 130 a 150 mM, y un polisorbato 80 en una cantidad del 0,01 % al 0,1 % (p/v), y donde la composición tiene un pH de 5,5 a 6,5.
6. La composición de la reivindicación 1, donde la composición comprende natalizumab a una concentración de 150 mg/ml, un tampón fosfato de sodio a una concentración de 10 mM, cloruro de sodio a una concentración de 140 mM, y polisorbato 80 en una cantidad del 0,04 % (p/v), y donde la composición tiene un pH de 5,5 a 6,5.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición es estable durante al menos 12 meses a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición es estable durante al menos 24 meses a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como un medicamento.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, inmune o autoinmune.
11. La composición de la reivindicación 10, donde dicho trastorno es esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide, diabetes o enfermedad de Crohn.
12. Una dosis unitaria de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la dosis unitaria es de 0,25 a 1,5 ml.
13. Una jeringa precargada que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la composición está en forma de una solución líquida.
14. La jeringa precargada de la reivindicación 13, que contiene una dosis unitaria de 0,25 a 1,5 ml de dicha composición.

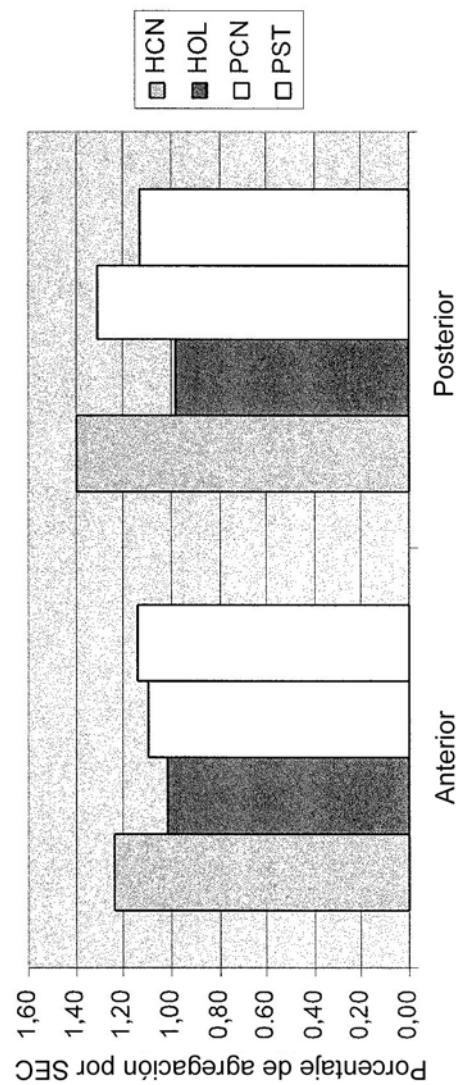


FIG. 1

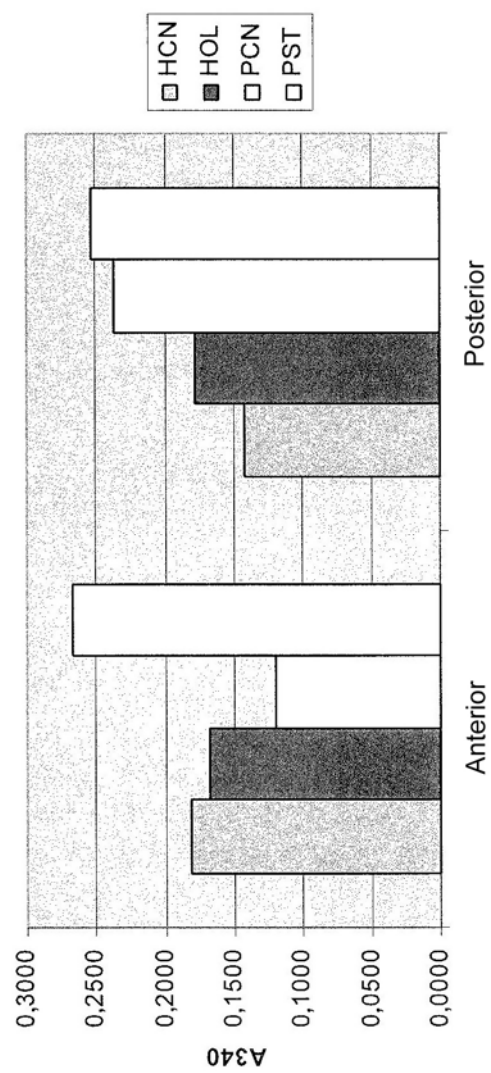


FIG. 2

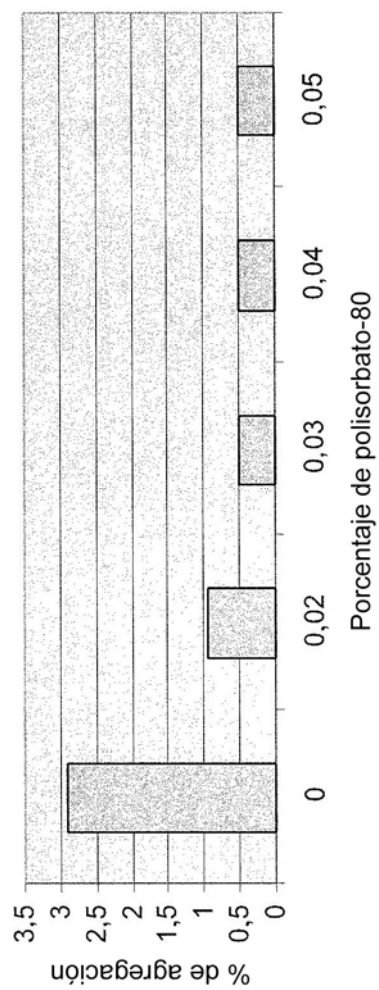


FIG. 3

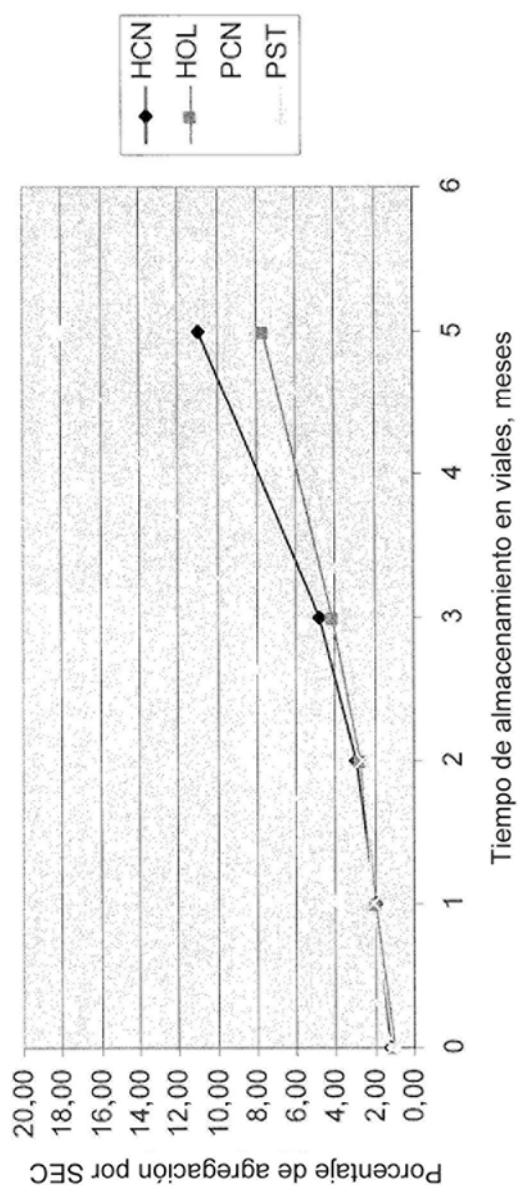


FIG. 4

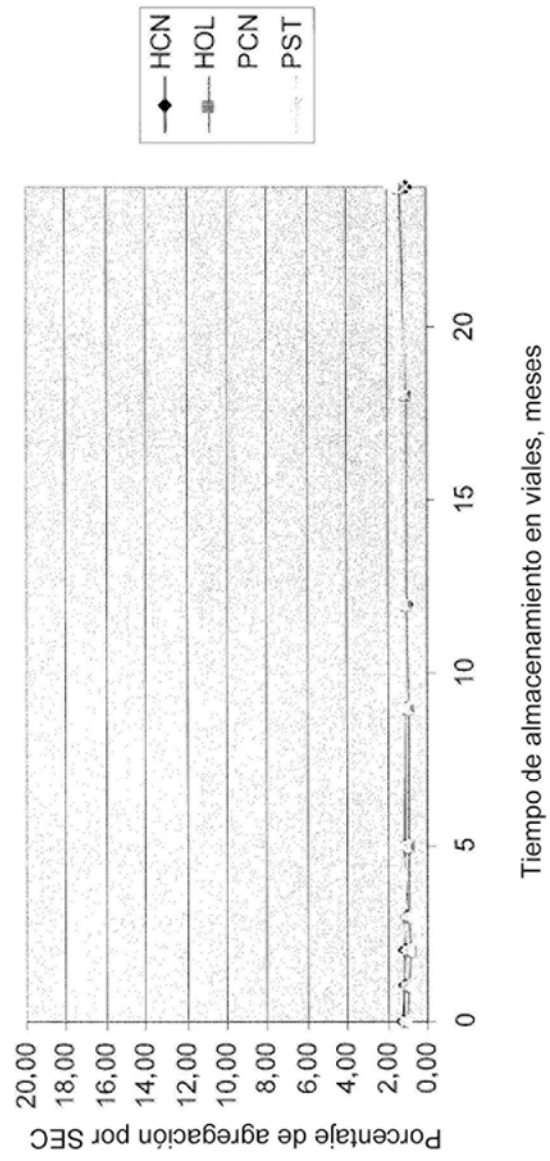


FIG. 5

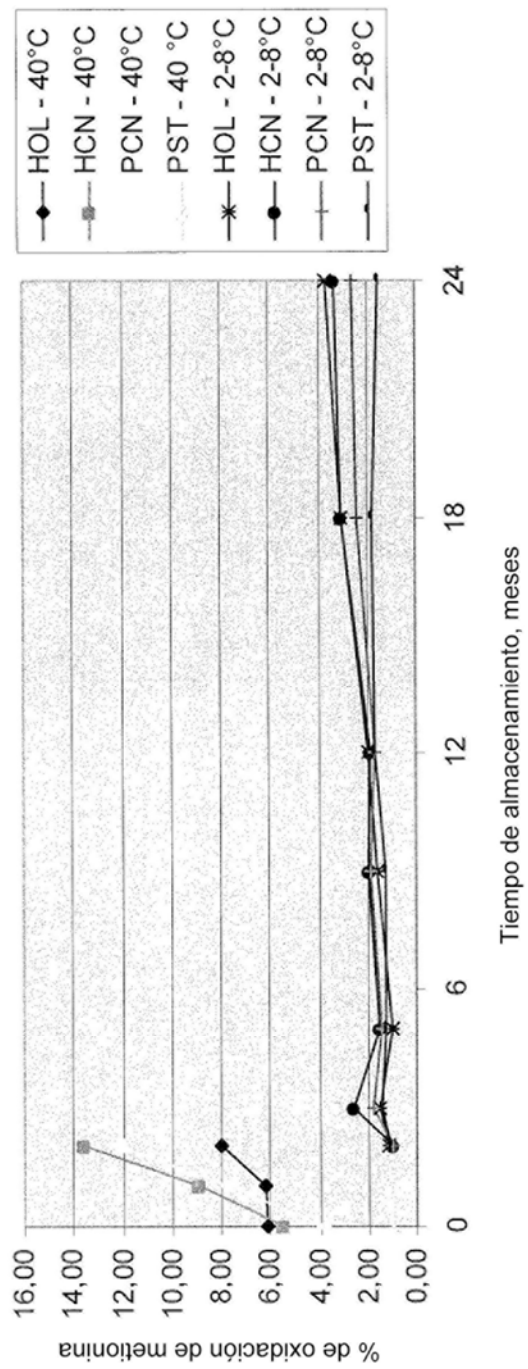


FIG. 6

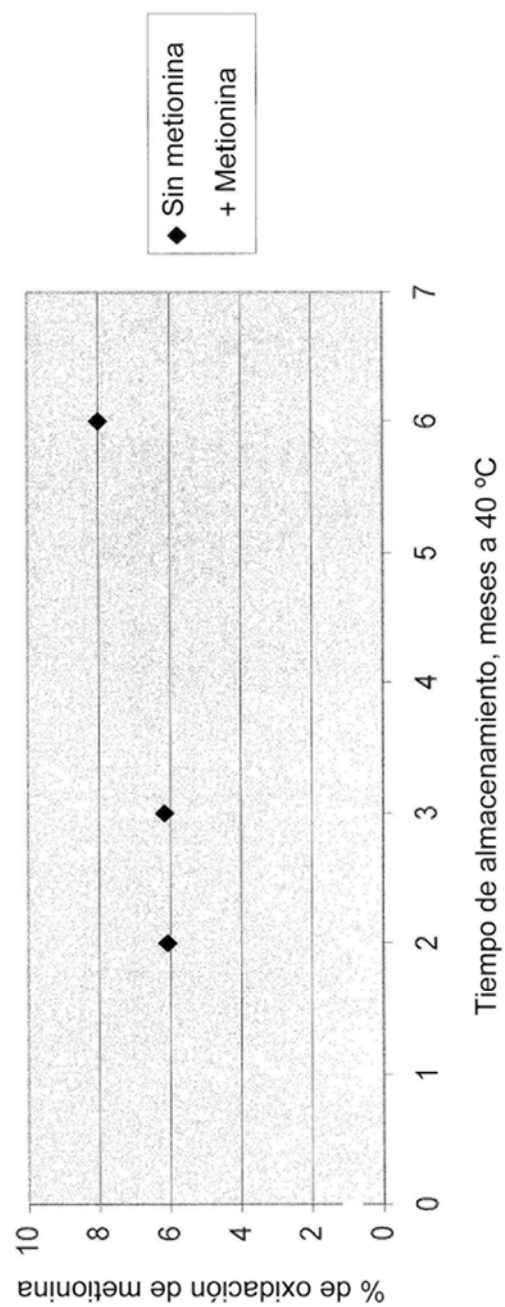


FIG. 7

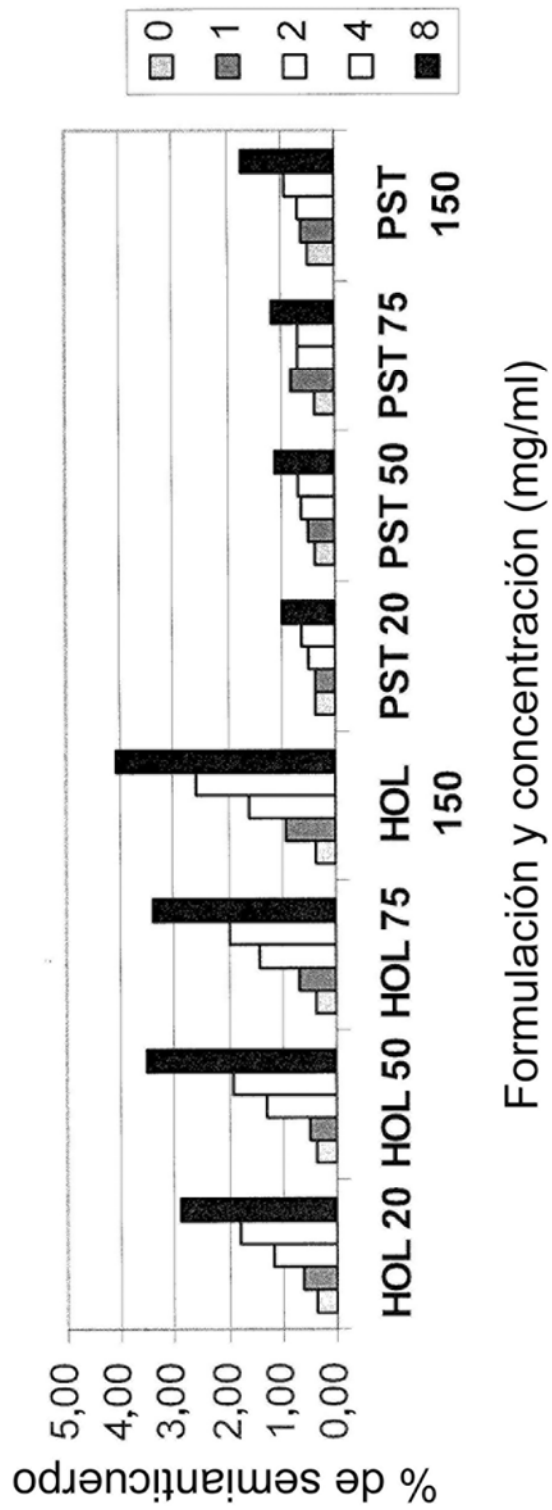


FIG. 8