



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 749**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00912065 .0**  
96 Fecha de presentación : **01.03.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1159003**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

54 Título: **Anticuerpos anti-TNF $\alpha$  en la terapia del asma resistente a esteroides.**

30 Prioridad: **02.03.1999 US 260953**  
**17.12.1999 US 465691**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2011**

73 Titular/es: **CENTOCOR, Inc.**  
**200 Great Valley Parkway**  
**Malvern, Pennsylvania 19355-1307, US**

72 Inventor/es: **Treacy, George**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 749 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

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que normalmente se presenta en forma de episodios recurrentes de sibilancias, dificultades respiratorias, opresión torácica y tos, particularmente durante la noche o de madrugada. Estos episodios se asocian normalmente con obstrucción generalizada aunque variable del flujo del aire que frecuentemente es reversible espontáneamente o con tratamiento.

Muchas células y elementos celulares desempeñan un papel en la inflamación de las vías respiratorias, en particular, mastocitos, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos, y células epiteliales. La inflamación está asociada con exudación plasmática, edema, hipertrofia del músculo liso, obstrucción mucosa y cambios epiteliales. La inflamación también produce un aumento asociado con la hipersensibilidad bronquial existente frente a una diversidad de estímulos.

La obstrucción variable del flujo del aire y la hiperactividad bronquial (específica y no específica) son características centrales en el asma sintomático. La inflamación de las vías respiratorias produce contracción del músculo liso de las vías respiratorias, filtración microvascular e hipersensibilidad bronquial. Cuando la reactividad de las vías respiratorias es alta, los síntomas son más graves y persistentes y la magnitud de las fluctuaciones diurnas en la función pulmonar es mayor. El mecanismo mediante el cual la inflamación de las vías respiratorias está relacionada con la reactividad bronquial es confuso. Recientes investigaciones indican que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que se expresa en cantidades aumentadas en las vías respiratorias de personas asmáticas, puede asociarse con hipersensibilidad aumentada de las vías respiratorias (Shah y col., Clin. Exper. Allergy, 25:1038-1044 (1995)). Por ejemplo, la administración intravenosa de TNF $\alpha$  recombinante a ovejas dio como resultado una notable intensificación en la reactividad de las vías respiratorias inducida por histamina (Wheeler y col., J. Appl. Physiol., 68: 2542-2549 (1990)) mientras que la exposición de ratas a TNF $\alpha$  aerosolizado aumentó la hipersensibilidad de las vías respiratorias e indujo un menor grado de inflamación de las vías respiratorias (Kips y col., Am. Rev. Respir. Dis., 145:332-336 1992)). En sujetos humanos normales, la inhalación de TNF $\alpha$  recombinante produce actividad bronquial aumentada (Yates y col., Thorax, 48:1080 (1993)), mientras que análisis inmunohistoquímicos de biopsias bronquiales de personas asmáticas alérgicas leves reveló que el aumento de la inmunorreactividad de TNF $\alpha$  se correlacionaba con la hipersensibilidad de las vías respiratorias (Hosselet y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 149: A957(1994)).

El asma es muy común. Afecta casi al 5% de la población en países industrializados, aunque está infradiagnosticada e infratratada. Existen pruebas de que la frecuencia y el predominio del asma están en aumento. Estas tendencias se producen a pesar de los aumentos en las terapias disponibles para el asma, lo que sugiere que los procedimientos actuales del tratamiento del asma son inadecuados o no se están utilizando apropiadamente.

El documento WO9208474 divulga el tratamiento de enfermedades pulmonares con ciclosporina A u otros agentes inmunosupresores adecuados.

El documento WO9846642 divulga moléculas de TNF $\alpha$  modificadas, ADN que codifica dichas moléculas de TNF $\alpha$  modificadas y vacunas que comprenden dichas moléculas de TNF $\alpha$  modificadas y ADN.

El documento WO9104054 divulga un tratamiento del Síndrome de Distrés Respiratorio (SDR) del adulto.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al descubrimiento de que mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , los signos clínicos y los síntomas asociados con el asma pueden mejorar. Como resultado, la presente invención proporciona usos de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en el tratamiento del asma resistente a esteroides como se define en las reivindicaciones.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico tal como el anticuerpo monoclonal cA2.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un histograma que muestra una acumulación de células inflamatorias en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) (acumulación total y acumulación de eosinófilos), 72 horas después de exposición a ovalbúmina (OA; al 5% durante 20 minutos) o solución salina (n=10) en ratones sensibilizados tratados por vía intravenosa 1 h antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA con (1) vehículo (PBS; n=10), (2) anticuerpo cV1qmuG2a (1 mg/kg, n=10) o (3) anticuerpo cV1q muG2a (10 mg/kg, n=9). Un grupo adicional de 10 ratones se trató por vía intraperitoneal 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA con dexametasona a 1 mg/kg. El símbolo \* indica diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) en comparación con el grupo tratado con vehículo.

La figura 2 es un histograma que muestra una acumulación de eosinófilos en líquido de LBA 72 horas después de exposición a OA (al 5% durante 20 minutos) o a solución salina (n=10) en ratones sensibilizados tratados por vía intravenosa 1 hora antes y 24 y 48 horas después de exposición a OA con (1) vehículo (PBS, n=10), (2) anticuerpo cV1qmuG2a (1 mg/kg, n=10) o (3) anticuerpo cV1qmuG2a (10 mg/kg, n=9). Un grupo adicional de 10 ratones se trató

por vía intraperitoneal 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA con dexametaxona a 1 mg/kg: los valores se presentan como un % de media de células totales  $\pm$  ETM. El símbolo \* indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo tratado con vehículo.

La figura 3 es un histograma que muestra la IgE total en suero 72 horas después de exposición a OA (al 5% durante 20 minutos) o a solución salina ( $n=10$ ) en ratones sensibilizados tratados por vía intravenosa 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA con (1) vehículo (PBS,  $n=10$ ), (2) anticuerpo cV1qmuG2a (1 mg/kg,  $n=10$ ) o (3) anticuerpo cV1qmuG2a (10 mg/kg,  $n=9$ ). Un grupo adicional de 10 ratones se trató por vía intraperitoneal 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA con dexametaxona a 1mg/kg.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al descubrimiento inesperado y sorprendente de que la acumulación en los pulmones de células inflamatorias, asociadas con el asma, particularmente eosinófilos, leucocitos perivascuales, leucocitos intersticiales y leucocitos pleurales, en lavado broncoalveolar (LBA), se reduce significativamente mediante tratamiento con un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ . La infiltración de las vías respiratorias por células inflamatorias, particularmente de eosinófilos en los pulmones, es uno de los aspectos característicos del asma (Holgate, Eur. Respir. J., 6:1507-1520 (1993)). Estudios de biopsia bronquial realizados en pacientes con asma alérgica demostraron que, en el tejido de las vías respiratorias y en LBA, existe una cantidad aumentada de eosinófilos y linfocitos T activados.

Se ha demostrado que la cantidad de eosinófilos en sangre periférica y en líquido de LBA se correlaciona con el grado de hiperreactividad bronquial y con la gravedad del asma (Corrigan and Kay, Immunology Today, 13:501-507 (1992)). Los eosinófilos almacenan 4 proteínas básicas en sus gránulos: proteína básica principal, neurotoxina derivada de eosinófilos, proteína catiónica eosinofílica y peroxidasa eosinofílica. La liberación de estas proteínas puede ser responsable de lesiones tisulares en las vías respiratorias y de hipersensibilidad bronquial en personas asmáticas (Flavahan y col., Am. Rev. Respir. Dis., 138:685-688 (1988)).

Los linfocitos T producen citocinas que activan la inmunidad mediada por células así como las respuestas inmunes humorales (IgE). El asma alérgica es dependiente de una respuesta de IgE controlada por linfocitos T y B y activada por la interacción del antígeno con moléculas de IgE unidas a mastocitos.

Los resultados descritos en el presente documento demuestran que la terapia con un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  es beneficiosa en el tratamiento del asma o inflamación de las vías respiratorias. Los resultados en el presente documento demuestran que los signos y síntomas clínicos asociados con el asma pueden mejorarse mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ . Como resultado, se describen procedimientos para el tratamiento del asma o inflamación de las vías respiratorias en un individuo que comprende administrar, al individuo, un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  y procedimientos para tratar la inflamación de las vías respiratorias asociada con el asma. Se describen procedimientos para reducir la acumulación de células inflamatorias en los pulmones, en un individuo que lo necesita, y procedimientos para reducir la acumulación de células inflamatorias, asociadas con el asma, en los pulmones. Los síntomas, como se usa en el presente documento, se refieren a sensaciones subjetivas. Por ejemplo, los síntomas incluyen cuando un paciente padece dificultad respiratoria, opresión torácica, insomnio. Los signos, como se usa en el presente documento, se refieren a que esto se observan objetivamente. Por ejemplo, los signos incluyen los resultados de ensayos pulmonares y otros realizados en laboratorio.

#### Factor de Necrosis Tumoral Alfa

El TNF $\alpha$  es un homotrímero soluble de 17 kD de subunidades de proteínas (Smith y col., J.Biol. Chem., 262:6951-6954 (1987)). También existe una forma precursora del TNF $\alpha$  de 26 kD unida a membrana (Kriegler y col., Cell, 53:45-53 (1988)). Como revisión del TNF $\alpha$ , véase Beutler y col., Nature, 320 (6063): 584-588 (1986); Old, Science, 230: 630-632. (1986); y Le y col., Lab. Invest., 56:234 (1987).

El TNF $\alpha$  está producido por una diversidad de células que incluye monocitos y macrófagos, linfocitos, particularmente células del linaje de linfocitos T (Vassalli, Annu. Rev. Immunol., 10:411-452 (1992)), neutrófilos (Dubravec y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6758-6761 (1990)), células epiteliales (Ohkawara y col., Am. J. Respir. Cell. Biol., 7:985-392 (1992)) y mastocitos (Shah y col., Clin. Exper. Allergy, 25:1038-1044 (1995); Gordon y col., Nature, 346:274-276 (1990); Gordon y col., J. Exp. Med., 174:103-107 (1991); Bradding y col., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 10:471-480 (1994); Walsh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4220-4224 (1991); Benyon y col., J. Immunol., 147:2253-2258 (1991); y Ohkawara y col., Am. J. Respir. Cell. Biol., 7:985-392 (1992)). También se han sugerido los eosinófilos como una fuente de TNF $\alpha$  (Costa y col., J. Clin. Invest., 91:2673-2684 (1993)).

#### Anticuerpos Anti-TNF $\alpha$

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa, disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con, la actividad de TNF $\alpha$  *in vivo*. En una realización preferida, el anticuerpo se une específicamente al antígeno. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, y el término anticuerpo pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales. Los términos policlonal y monoclonal se refieren al grado de homogeneidad de una preparación de anticuerpos, y no pretenden limitarse a procedimientos de producción particulares. En la presente

invención también se incluyen anticuerpos monocatenarios y quiméricos, anticuerpos humanizados o primatizados (anticuerpos injertados en la CDR, con o sin cambios en armazón), o revestidos, así como anticuerpos quiméricos, injertados en la CDR o monocatenarios revestidos, que comprenden partes derivadas de diferentes especies y similares y el término "anticuerpo".

5 En una realización particular, el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  es un anticuerpo quimérico. En una realización preferida, el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  es el anticuerpo monoclonal quimérico cA2 (o un fragmento de unión al antígeno del mismo) o el anticuerpo monoclonal murino A2 (o un fragmento de unión al antígeno del mismo) o tiene una especificidad epitópica similar a la del anticuerpo quimérico cA2, anticuerpo monoclonal murino A2 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que incluyen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que reaccionan con el mismo o con un epítipo funcionalmente equivalente sobre un TNF $\alpha$  humano que se une mediante el anticuerpo quimérico cA2 o anticuerpo monoclonal murino A2, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos con una especificidad epitópica similar a la del anticuerpo quimérico cA2 o anticuerpo monoclonal murino A2 incluyen anticuerpos que pueden competir con el anticuerpo quimérico cA2 o el anticuerpo monoclonal murino A2 (o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) para unirse al TNF $\alpha$  humano. Dichos anticuerpos o fragmentos pueden obtenerse como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo quimérico cA2, anticuerpo monoclonal murino A2 y procedimientos para la obtención de estos anticuerpos también se describen en Le y col., Patente de Estados Unidos N° 5.656.272; Le y col., Patente de Estados Unidos N° 5.698.195; Patente de Estados Unidos N° 5.919.452; Le, J. y col., Publicación Internacional N° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992); Knight, D.M. y col., Mol. Immunol., 30:14 43-1453 (1993); y Siegel, S.A. y col., Cytokine, 7 (1): 15-25 (1995). El anticuerpo quimérico cA2 también se conoce como infliximab y REMICADE™.

20 El anticuerpo quimérico cA2 consiste en la región variable de unión al antígeno del anticuerpo IgG1 de ratón anti-TNF $\alpha$  humano neutralizante de elevada afinidad, denominado A2, y las regiones constantes de una IgG1 humana, inmunoglobulina kappa. La región Fc de la IgG1 humana mejora la función efectora alogénica del anticuerpo, aumenta la semivida circulante en suero y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y especificidad epitópica del anticuerpo quimérico cA2 procede de la región variable del anticuerpo murino A2. En una realización particular, una fuente preferida de ácidos nucleicos que codifican la región variable del anticuerpo murino A2 es la línea celular del hibridoma A2.

30 El A2 quimérico (cA2) neutraliza el efecto citotóxico del TNF $\alpha$  humano natural y recombinante de una manera dependiente de la dosis. A partir de ensayos de unión del anticuerpo quimérico cA2 y del TNF $\alpha$  humano recombinante, se calculó que la constante de afinidad del anticuerpo quimérico cA2 era de  $1,04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ . En Harlow, y col., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan y col., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, New York, (1992, 1993); Kozbor y col., Immunol. Today, 4: 72-79 (1983); Ausubel y col., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York (1987, 1992, 1993); y Muller, Meth. Enzymol., 92:589-601 (1983), pueden encontrarse procedimientos preferidos para determinar la especificidad y afinidad de anticuerpos monoclonales por inhibición competitiva.

35 En una realización particular, el anticuerpo quimérico cA2 procede de una línea celular denominada c168A y el anticuerpo monoclonal murino A2 procede de una línea celular denominada c134A.

40 En la técnica se describen ejemplos adicionales de anticuerpos anti-TNF $\alpha$  (o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5,231,024; Möller, A. y col., Cytokine, 2(3):162-169 (1990); Rathjen y col., Publicación Internacional N° WO 91/02078 (publicada el 21 febrero de 1991); Rubin y col., Publicación de Patente EPO N° 0 218 868 (publicada el 22 abril de 1987); Yone y col., Publicación de Patente EPO N° 0 288 088 (26 octubre de 1988); Liang, y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 137:847-854 (1986); Meager, y col., Hybridoma, 6:305-311 (1987); Fendly y col., Hybridoma, 6: 359-369 (1987); Bringman, y col., Hybridoma, 6:489-507 (1987); and Hirai, y col., J. Immunol. Meth., 96:57-62 (1987).

45 Los anticuerpos adecuados están disponibles, o pueden sensibilizarse contra un inmunógeno apropiado, tal como un antígeno aislado y/o recombinante o una parte del mismo (incluyendo moléculas sintéticas, tales como péptidos sintéticos) o contra una célula huésped que expresa un antígeno recombinante. Además, como inmunógenos, pueden usarse células que expresan el antígeno recombinante, tales como células transfectadas, o en una exploración para anticuerpos que se unen al receptor (véase, por ejemplo, Chuntharapai y col., J. Immunol., 152: 1783-1789 (1994); y Chuntharapai y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.440.021).

50 La preparación de antígenos inmunizantes y la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales pueden realizarse usando cualquier técnica adecuada. Se ha descrito una diversidad de procedimientos (véase, por ejemplo, Kohler y col., Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976); Milstein y col., Nature, 266: 550-552 (1977); Koprowski y col., Patente de Estados Unidos N° 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); y Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, verano del 94), Ausubel y col., Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11, (1991)). Generalmente un hibridoma puede producirse fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos, preferentemente las del bazo o ganglios linfáticos, pueden obtenerse a partir de animales inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas y clonarse por dilución limitante. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden ser seleccionarse mediante

un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

5 Para producir o aislar anticuerpos de especificidad necesaria, incluyendo anticuerpos humanos, pueden usarse otros procedimientos adecuados, que incluyen, por ejemplo, procedimientos mediante los cuales, a partir de una biblioteca, se selecciona un anticuerpo recombinante, o una parte del mismo, tal como, por ejemplo, por tecnología de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Winters y col., *Annu Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994); Hoogenboom y col., documento WO 93/06213; Hoogenboom y col., Patente de Estados Unidos N° 5.565.332; documento WO 94/13804, publicado el 23 de junio de 1994; Krebber y col., Patente de Estados Unidos N° 5.514.548; y Dower y col., Patente de Estados Unidos N° 5.427.908), o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Kuchelapati y col., Patente Europea N° EP 0 463 151 B1; Lonberg y col., Patente de Estados Unidos N° 5.569.825; Lonberg y col., Patente de Estados Unidos N° 5.545.806; y Surani y col., Patente de Estados Unidos N° 5.545.807).

15 Las diversas partes de anticuerpos monocatenarios, quiméricos, humanizados o primatizados (anticuerpos injertados a la CDR con o sin cambios en armazón) o anticuerpos revestidos, así como anticuerpos quiméricos, monocatenarios injertados a la CDR o revestidos, que comprenden partes procedentes de diferentes especies, pueden unirse entre sí químicamente por técnicas convencionales o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de modificación por ingeniería genética. Por ejemplo, para producir una proteína contigua, pueden expresarse ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada. Véase, por ejemplo, Cabilly y col., Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly y col., Patente Europea N° 0.125.023 B1; Boss y col., Patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Boss y col., Patente Europea N° 0.120.694 B1; Neuberger, M.S. y col., WO 86/01533; Neuberger, M.S. y col., Patente Europea N° 0.194.276 B1; Winter, Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Winter, Patente Europea N° 0.239.400 B1; Queen y col., Patente de Estados Unidos N° 5.585.089; Queen y col., Patente Europea N° 0.451.216 B1; Adair y col., WO 91/09967, publicado el 11 julio de 1991; Adair y col., Patente Europea N° 0.460.167 B1; y Padlan, E.A. y col., Patente Europea N° 0.519.596 A1. Véase también, Newman, R. y col., *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992), en lo que respecta a anticuerpos primatizados, y Huston y col., Patente de Estados Unidos N° 5.091.513; Huston y col., Patente de Estados Unidos N° 5.132.405; Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 4.946.778 y Bird, R.E. y col., *Science*, 242: 423-426 (1988)) con respecto a anticuerpo monocatenarios.

30 Además, también pueden producirse fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados, primatizados, revestidos o monocatenarios y similares. Por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno incluyen, pero sin limitación, fragmentos tales como fragmentos Fv, Fab, Fab', y F(ab')<sub>2</sub>. Los fragmentos de unión al antígeno pueden producirse por escisión enzimática o por técnicas recombinantes, por ejemplo. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. Los anticuerpos también pueden producirse en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno más codones de terminación aguas arriba del sitio de terminación natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen quimérico que codifique una parte de la cadena pesada de F(ab')<sub>2</sub> para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH<sub>1</sub> y la región bisagra de la cadena pesada.

40 Los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  adecuados para su uso en la presente invención se caracterizan por una alta afinidad de unión al TNF $\alpha$  y baja toxicidad (incluyendo la respuesta de anticuerpo humano anti-murino (HAMA) y/o anticuerpo humano anti-quimérico (HACA)). En la presente invención, es adecuado para su uso, un anticuerpo en el que los componentes individuales, tales como la región variable, región constante y armazón, poseen individualmente y/o colectivamente baja inmunogenicidad. Los anticuerpos que pueden usarse la invención se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante períodos prolongados con una buena a excelente mejora de los síntomas y una baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos. En el presente documento, "baja inmunogenicidad" se define como que se suscitan respuestas de HACA o HAMA significativas, menores de aproximadamente el 75%, o preferentemente menores de aproximadamente el 50% de los pacientes tratados y/o que producen bajas titulaciones en los pacientes tratados (menores de aproximadamente 300, preferentemente menores de aproximadamente 100, medido con un inmunoensayo enzimático antigénico doble) (véase, por ejemplo, Elliott y col, *Lancet* 344: 1125-1127 (1994)).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "región de unión al antígeno" se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que contiene los restos aminoacídicos que interaccionan con un antígeno y confiere al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La región de unión al antígeno incluye los restos aminoacídicos "flanqueantes" necesarios para mantener la conformación correcta de los restos de unión al antígeno.

55 El término antígeno se refiere a una molécula o a una parte de una molécula que puede unirse a un anticuerpo que adicionalmente puede inducir a un animal a producir anticuerpos que pueden unirse selectivamente a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo.

60 El término epítipo significa que se refiere a la parte del antígeno que puede reconocer y unirse a un anticuerpo en una o más de las regiones de unión del antígeno al anticuerpo. Los epítopes normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Por "inhibición y/o neutralización epitópica" se refiere a un epítipo, que cuando se une a un anticuerpo, da

como resultado la pérdida de actividad biológica de la molécula que contiene el epítipo, *in vivo* o *in vitro*, más preferentemente *in vivo*, incluyendo la unión de TNF $\alpha$  a un receptor de TNF $\alpha$ .

#### Administración

5 Los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  pueden administrarse a un paciente en una diversidad de formas. En una realización preferida, los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  se administran por inhalación (por ejemplo, en un inhalante o pulverizador o como un vapor nebulizado). Otras vías de administración incluyen vías intranasal, oral, intravenosa, incluyendo infusión y/o inyección en embolada, intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en polímeros de liberación lenta), intramuscular, interperitoneal, subcutánea, tópica, epidural, bucal, etc. También pueden usarse otras vías de administración adecuadas, por ejemplo, para conseguir la absorción a través de los recubrimientos epiteliales o mucocutáneos. Los anticuerpos también pueden administrarse por terapia génica, en la que una molécula de ADN que codifica una proteína o un péptido terapéutico particular, se administra al paciente, por ejemplo, mediante un vector, que hace que la proteína o el péptido particular se exprese y se secrete a niveles terapéuticos *in vivo*. Además, los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  pueden administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, glicéridos), excipientes (por ejemplo, lactosa), portadores, diluyentes y vehículos. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, saporíferos y/o colorantes.

10 Los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  pueden administrarse a un individuo profiláctica o terapéuticamente, antes de, simultáneamente con o secuencialmente con, otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de fármacos múltiples). Los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos pueden administrarse en la misma o en diferentes composiciones.

15 Los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  pueden formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado junto con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de dichos vehículos el agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y estabilizantes químicos (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación puede esterilizarse por técnicas habitualmente usadas. En una realización preferida, los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  se administran por vía intranasal (por inhalación). En Remington's Pharmaceutical Sciences se describen portadores farmacéuticos adecuados

20 En el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno se define como la cantidad, o dosis, de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno que, cuando se administra a un individuo, es suficiente para conseguir eficacia terapéutica (por ejemplo, una cantidad suficiente para reducir o eliminar significativamente síntomas o signos o los síntomas y signos, asociados con asma o inflamación de las vías respiratorias). La dosificación administrada a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo las características farmacodinámicas del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  particular y su modo y vía de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor; naturaleza y grado de los síntomas de la enfermedad o trastorno a tratar, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

25 La cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse en dosis únicas o divididas (por ejemplo, una serie de dosis separadas por intervalos de días, semanas o meses) o en una forma de liberación prolongada, dependiendo de factores tales como la naturaleza y grado de los síntomas, tipo de tratamiento simultáneo y el efecto deseado. También pueden usarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con la presente invención. El ajuste y manejo de intervalos de dosificación establecidos se encuentra dentro de las habilidades adecuadas de los expertos en la técnica.

30 Una vez que se ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz, puede administrarse al individuo una cantidad de mantenimiento del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ . Una cantidad de mantenimiento es la cantidad de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  necesaria para mantener la reducción o eliminación de los síntomas y/o signos conseguidos por la dosis terapéuticamente eficaz. La cantidad de mantenimiento puede administrarse en forma de una monodosis, o como una serie de dosis separadas por intervalos de días o semanas (dosis divididas).

35 Las segundas o posteriores administraciones pueden administrarse a una dosificación que sea igual, menor o mayor a la dosis inicial o previa administrada al individuo. Preferentemente, se realiza una segunda administración o posterior durante o inmediatamente antes de la recaída o un empeoramiento de la enfermedad o síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, la segunda y posteriores administraciones pueden proporcionarse de entre aproximadamente un día a 30 semanas desde la primera administración. Si fuera necesario, al individuo se le pueden administrar dos, tres, cuatro o más administraciones totales.

40 Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna contienen generalmente de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 500 miligramos del principio activo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas el principio activo estará normalmente presente en una cantidad de aproximadamente 0,5-95% en peso basándose en el peso total de la composición.

45 La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser, de ninguna

manera, limitativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 Efectos de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  monoclonal en un modelo de ratón para el asma alérgica.

5 El ratón es una especie patrón que se usa en estudios farmacológicos pulmonares. El modelo murino para el asma alérgica usado en los experimentos descritos en el presente documento simula el asma humano en sus características fenotípicas. En particular, las dos enfermedades se caracterizan por infiltración celular inflamatoria peribronquial, particularmente una afluencia de eosinófilos en los pulmones. Por lo tanto, el modelo murino sirve como una buena aproximación a la enfermedad humana.

Anticuerpo anti-TNF $\alpha$

10 El anticuerpo anti-TNF $\alpha$  cV1q muG2a se construyó en Centocor, Inc. (Malvern, PA). Las células de hibridoma que secretan el anticuerpo de rata anti TNF $\alpha$  murino V1q procedían de Meter Krammer del Centro de Investigación Contra el Cáncer (German Cancer Research Center), Heidelberg, Alemania (Echtenacher y col., J. Immunol. 145:3762-3766 (1990)). Se clonaron los genes que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo V1q. La cadena pesada clonada se insertó en cuatro vectores de expresión génica diferentes para codificar la cadena pesada de cV1q con una región constante de IgG1 humana, IgG3 humana, IgG1 murina o IgG2a murina. La cadena ligera V1q se insertó en otro vector de expresión para codificar una región constante de cadena ligera kappa humana o una murina..

20 Se transfectaron células de mieloma SP2/0 con las construcciones génicas de cadena ligera y pesada diferentes. Se identificaron clones celulares productores del anticuerpo quimérico V1q (cV1q) ensayando sobrenadante celular para la IgG humana o murina usando ensayos convencionales ELISA. Para obtener líneas celulares homogéneas, se subclonaron clones de producción alta. Las versiones murinas de la IgG1 e IgG2a se denominaron C257A y C258 respectivamente. El anticuerpo cV1q se purificó del sobrenadante celular por cromatografía de proteína A.

25 El anticuerpo cV1 se caracterizó midiendo su afinidad por el TNF $\alpha$  murino soluble, ensayando su capacidad para proteger a células WEHI de la citotoxicidad del TNF $\alpha$  murino, examinado su capacidad para neutralizar o unirse a la linfotoxina murina, comparando la capacidad de las versiones murinas de IgG1 e IgG2 $\alpha$  para desencadenar la lisis, mediada por el complemento, de células que expresan TNF $\alpha$  murino transmembrana recombinante y examinado la capacidad de la versión humana de IgG1 para proteger a los ratones de dosis letales de LPS (endotoxina). El cV1q se une al TNF murino (muTNF) con alta afinidad, neutraliza el muTNF en un ensayo de citotoxicidad de células WEHI, desencadena una citotoxicidad, mediada por el complemento, de una manera dependiente del isotipo, de células que expresan muTNF transmembrana. Además, el cV1q no neutralizó la actividad citotóxica de la linfotoxina murina. En el siguiente procedimiento experimental se usó la versión murina de IgG2a del anticuerpo cV1q y en el presente documento se denomina anticuerpo cV1q muG2a.

Procedimiento Experimental.

35 Los días 0, 7 y 14, se sensibilizaron cincuenta ratones BALB/CJ hembra, con un peso de 15-23 gramos, de 7 semanas de edad, mediante inyecciones intraperitoneales de 10  $\mu$ g de ovoalbúmina (OA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) mezclada en una suspensión de 1,6 mg de gel de hidróxido de aluminio (Intergen, Inc., Purchase, NY) en 0,2 ml de solución salina estéril. Esta suspensión se preparó una hora antes de la inyección intraperitoneal a cada ratón.

40 Los cincuenta ratones sensibilizados se dividieron en cinco grupos (10 ratones/grupo) y se trataron de la siguiente manera:

Grupo	N	Tratamiento
1	10	Sensibilizados, tratados con vehículo (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS; Centocor, Inc., Malvern, PA)) - 10 ml/kg, por vía intravenosa (i. v.), 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA.
2	10	Sensibilizados, tratados con anticuerpo cV1q muG2a - 1 mg/kg, i.v., 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA.

(cont.)

Grupo	N	Tratamiento
3 <sup>a</sup>	10	Sensibilizados, tratados con anticuerpo cV1q muG2a, 10 mg/kg, i.v., 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA.
4	10	Sensibilizados, tratados con dexametasona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) - 1 mg/kg, por vía intraperitoneal (i. p.), 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA.
5	10	Sensibilizados y expuestos a solución salina al 0,9%.
<sup>a</sup> Un animal murió después del primer tratamiento con cV1q muG2a (10 mg/kg, i.v.)		

5 Los ratones se expusieron a OA por exposición a OA aerosolizada el día 21 (solución salina estéril al 5% p/v (Baxter, Inc., Chicago, IL)) durante 20 minutos. El aerosol se generó mediante un nebulizador PARI-Master (PARI-Respiratory, Richmond, VA). La salida de este se conectó a una pequeña cámara Plexiglas® (Pena-Plas, Jessup, PA) que contenía a los animales.

10 El día 24, setenta y ocho horas después de la exposición con aerosol a OA o a solución salina, se extrajo sangre a los animales por vía retro-orbital y el suero se recogió y se congeló para el análisis de IgE total en suero. Después de la extracción de sangre, los animales se anestesiaron con uretano (0,2 g/kg) y se realizó el lavado broncoalveolar (LBA). Brevemente, la traquea se descubrió y se introdujo una cánula. Los pulmones se lavaron con solución salina equilibrada con Hank estéril 2 x 0,5 ml (HBSS; Gibco, Grand Island, NY) sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>, que contenía EDTA al 0,1%. Después de 30 segundos, se recogió líquido de lavado, por aspiración cuidadosa, y se agrupó de cada animal. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos a 5° C. Los sedimentos individuales se reconstituyeron con 1 ml de HBSS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>, que contenía EDTA al 0,1%. El recuento de células totales y células blancas (eosinófilos) diferenciales en el LBA, se determinó usando un Technicon H1 (Roche Diagnostics, Suiza) y un portaobjetos celular, respectivamente.

20 El suero se separó de cada muestra y se ensayó para determinar los anticuerpos IgE mediante ensayo de ELISA. Brevemente, se revistieron placas de microtitulación con 100 µl de un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgE de ratón y se incubó durante 1 hora (± 15 min) a 37° C (±2°) y durante una noche a 4° C (± 2°). Las placas se bloquearon con 300 µl de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 1 hora (±15 min) a 37° C (± 2°). Las placas se lavaron 5 veces. El suero del ensayo se diluyó 1:3, 1:6, 1:12 y 1:24 con BSA al 1% en solución salina tamponada con fosfato más Tween-20 al 0,05% (PBST). A los pocillos se añadieron 100 µl del suero diluido, por duplicado, y se incubó durante 1,5 horas (±15 min) a 37° C (± 2°). Los pocillos exteriores, alrededor de la placa, no se usaron para evitar los efectos del perímetro. Se añadieron, a cada pocillo, 100 µl de IgE de conejo anti-ratón y las placas se incubaron durante 1,5 horas (±15 min) a 37° C (±2°). Se añadieron, a cada pocillo, 100 µl de IgG de cabra anti-conejo biotinilada y las placas se incubaron durante 1,5 horas (±15 min) a 37° C (± 2°). Se añadió, a cada pocillo, peroxidasa de rábano picante conjugado con estreptavidina (100 µl) y las placas se incubaron 15 minutos (± 2 min) a 37° C (± 2°). Entre cada incubación, las placas se lavaron cinco veces con PBST. A cada pocillo se añadió sustrato de peroxidasa TMB (100 µl) y se incubó a 37° C (± 2°). Para finalizar la reacción, a cada pocillo se le añadieron 100 µl de ácido fosfórico 1M. Se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector UVMax Microplate de Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, CA). Con este ensayo se procesó una curva patrón usando un anti-DNP monoclonal de IgE de ratón (SPE-7) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

35 Usando un ANOVA, se compararon los niveles de células totales, eosinófilos e IgE en suero de diversos grupos de tratamiento seguido de un ensayo de comparación múltiple (Zar, J.H., Biostatistical Analysis, Prentice Hall: Englewood, NJ, p. 185 (1984)).

Células totales, eosinófilos e IgE en suero

En la Tabla 1, se muestran los niveles en LBA de células totales, eosinófilos e IgE total en suero, de los diferentes grupos de tratamiento.

TABLA 1: Acumulación de células inflamatorias pulmonares inducidas por antígeno en los datos animales de ratones individuales

Grupo Número	Animal Número	Peso corporal (g)	Células totales ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	EOS <sup>c</sup> ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	EOS <sup>c</sup> (% del total)	IgE total en suero (ng/ml)
1	1	22	0,87	0,50	57	328
	2	21	0,6	0,23	39	218
	3	21	2,19	1,20	55	243
	4	21	0,97	0,44	45	419
	5	21	0,47	0,14	30	305
	6	21	0,16	0,09	58	242
	7	20	0,80	0,48	60	292
	8	19	1,30	0,81	62	241
	9	19	0,28	0,12	44	366
	10	20	0,62	0,23	37	410

(cont.)

Grupo Número	Animal Número	Peso corporal (g)	Células totales ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	EOS <sup>a</sup> ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	EOS <sup>a</sup> (% del total)	IgE total en suero (ng/ml)
2	11	21	0,68	0,22	33	159
	12	20	0,60	0,16	27	124
	13	22	0,55	0,05	9	134
	14	21	0,92	0,35	38	208
	15	15	0,79	0,04	5	312
	16	23	0,68	0,12	18	345
	17	22	0,55	0,14	25	116
	18	21	0,68	0,08	12	280
	19	20	0,68	0,13	19	250
	20	21	0,67	0,11	16	402
3	21	20	0,58	0,12	20	325
	22	18	0,67	0,01	2	269
	23 <sup>a</sup>	19	-	-	-	-
	24	21	0,06	0	4	361
	25	20	0,07	0,02	22	316
	26	21	0,69	0,01	1	374
	27	20	0,55	0,15	27	173

	28	21	0,47	0,06	13	130
	29	21	1,07	0,33	31	502
	30 <sup>p</sup>	20	0,02	-	-	502
4	31	19	0,57	0,11	20	284
	32	20	0,24	0,01	5	553
	33	21	0,31	0,01	2	545
	34	22	0,80	0,32	40	106
	35	20	0,31	0,05	17	105
	36	22	0,53	0,09	17	254
	37	20	0,88	0,43	49	136
	38	20	0,73	0,16	22	191
	39	21	0,51	0,08	15	149
	40	18	0,45	0,01	2	154
5	41	19	0,76	0	0	184
	42	21	0,06	0	0	230
	43	19	0,33	0	0	157
	44	20	0,42	0	0	262
	45	20	0,61	0,01	1	275
	46	21	0,70	0,01	1	348
	47	18	0,50	0	0	176
	48	21	0,59	0	1	133
	49	20	0,54	0	0	119
	50	19	0,35	0,01	2	63

<sup>a</sup>EOS = eosinófilos

<sup>a</sup>Animal muerto encontrado un día después de la exposición a OA

<sup>b</sup>Animal no incluido en los datos del resumen

<sup>c</sup>EOS = eosinófilos

5 Como se ilustra en la Figura 1, una exposición de 20 minutos a OA (5%) en ratones sensibilizados, produjo un aumento aproximado de dos veces de células totales en LBA en comparación con los ratones expuestos a solución salina. En el lavado broncoalveolar, los eosinófilos aumentaron desde prácticamente 0, en ratones expuestos a solución salina, a  $0,42 \pm 0,11 \times 10^6$ , 72 horas después de la exposición a OA (Figura 1). El aumento de células totales en LBA, 72 horas después de la exposición a OA, resultó principalmente del aumento de eosinófilos (Figura 2). Como se muestra en la Figura 3, los niveles totales de IgE en suero aumentaron un 56% después de la exposición a antígeno, en ratones sensibilizados, en comparación con ratones sensibilizados expuestos a solución salina.

10 El control positivo, dexametasona (1 mg/kg, i. p., un antiinflamatorio esteroideo) administrado 1 hora antes y de 24 a 48 horas después de la exposición a OA inhibió aumentos inducidos por antígeno en células totales y eosinófilos un 36% y 69%, respectivamente, en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 1). La dexametasona también produjo una reducción del 30% en los niveles de IgE totales en suero en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 3).

La administración intravenosa del anticuerpo cV1q muG2a, un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ , a 1 y 10 mg/kg, 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a antígeno (exposición a OA) produjo una reducción del 18% y del 37%, respectivamente en células totales en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 1) ( $0,52 \pm 0,09 \times 10^6$ /ml en el grupo tratado con 10 mg/kg de anti-TNF $\alpha$  frente al  $0,83 \pm 0,18 \times 10^6$ /ml en el grupo tratado con vehículo, NS). Además, la administración del anticuerpo cV1q muG2a a 1 y 10 mg/kg inhibió los aumentos inducidos por antígeno (inducidos por OA) en eosinófilos en LBA el 67% y 79% respectivamente en comparación con los animales tratados con vehículo (Figura 1) ( $0,09 \pm 0,04 \times 10^6$ /ml en el grupo tratado con 10 mg/kg de anti-TNF $\alpha$  frente a  $0,42 \pm 0,11 \times 10^6$ /ml en el grupo tratado con vehículo,  $p < 0,05$ ). Estos resultados indican que, en ratones sensibilizados, el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  modula la acumulación de células inflamatorias pulmonares inducida por antígeno.

En resumen, la administración intravenosa del anticuerpo cV1q muG2a a 1 y 10 mg/kg, 1 hora antes y de 24 a 48 horas después de la exposición a OA produjo una reducción del 67% y 79%, respectivamente, de eosinófilos en LBA en comparación con animales tratados con vehículo. Por lo tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-TNF $\alpha$  produce una reducción significativa en el número de células totales y eosinófilos en LBA.

#### Farmacocinética

Se analizaron concentraciones del anticuerpo cV1q en las muestras de suero por inmunoensayo enzimático (EIA). En resumen, se revistió un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico específico para el anticuerpo cV1q (Lote SM970109; Centocor, Inc., Malvern, PA) sobre una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después las placas se lavaron y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% (BSA)/ solución salina tamponada con fosfato (PBS) para evitar la unión no específica. Esta solución bloqueante se retiró. Se añadieron a la placa patrones de anticuerpo cV1q muG2a y muestras de ensayo diluidas para una incubación de 2 horas. Las placas se lavaron y se añadió a los pocillos una versión biotinilada de un anticuerpo monoclonal anti-cV1q diferente para una incubación de dos horas. Las placas se lavaron e incubaron con un conjugado de estreptavidina con peroxidasa de rábano picante durante un tercer periodo de incubación. Se realizó una etapa de desarrollo de color enzimática final usando, como sustrato, o-fenilendiamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El desarrollo del color se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 4N y la lectura de la absorbancia lumínica se leyó usando un espectrofotómetro de placa de microtitulación a 490nm. Las concentraciones patrón del anticuerpo cV1q y sus correspondientes valores de densidad óptica se usaron para construir una curva patrón mediante un ajuste de mínimos cuadrados generado informáticamente con respecto a una ecuación de cuatro parámetros. Después, las concentraciones del anticuerpo cV1q en la muestra se determinaron usando la curva patrón y el factor de dilución en suero para esta muestra.

#### Resultados

En la Tabla 2, en la fila superior e inferior, se muestran las concentraciones del anticuerpo cV1q en las muestras de suero y en LBA, respectivamente, de los ratones tratados con 1 y 10 mg/kg del anticuerpo cV1q.

TABLA 2: Concentraciones del anticuerpo cV1q en suero y en LBA ( $\mu$ g/ml)

Anticuerpo cV1q muG2a (1 mg/kg, i. v.)											
Ratón	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Media $\pm$ DT
Suero	29,7	28,5	37,6	23,8	23,4	26,7	21,0	31,2	21,4	27,8	27,1 $\pm$ 5,06
LBA	0,042	0,055	<0,04	0,069	0,118	0,062	0,055	0,071	0,119	0,076	0,067 $\pm$ 0,035
Anticuerpo cV1q muG2a (10 mg/kg, i. v.)											
Ratón	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Media $\pm$ DT
Suero	317	282	NS	295	4 02	289	301	291	257	284	302 $\pm$ 40,8
LBA	1,65	0,537	NS	0,626	0,176	0,391	0,429	0,306	0,851	<0,04	0,55 $\pm$ 0,48
NS = Sin muestra											

Las muestras de suero y de lavado broncoalveolar (LBA) del grupo de control con vehículo en (=10) no presentó niveles detectables del anticuerpo cV1q muG2a (cV1q) ( $< 0,04 \mu$ g/ml). Después de múltiples administraciones intravenosas (n=3) de anticuerpo cV1q a 1mg/kg, las muestras de suero de estos ratones tratados con el anticuerpo (n=10) tenían una media  $\pm$  desviación típica de concentración del anticuerpo cV1q de  $27,1 \pm 5,06 \mu$ g/ml; las muestras de LBA de estos ratones presentaron una media de concentración de anticuerpo cV1q  $0,067 \pm 0,035 \mu$ g/ml. La concentración media del anticuerpo cV1q en suero (n=9) después de múltiples administraciones intravenosas (n=3) de

10 mg/kg del anticuerpo, era de  $302 \pm 40,8$   $\mu\text{g/ml}$ ; la concentración media del anticuerpo cV1q de las muestras de LBA de estos ratones era de  $0,55 \pm 0,48$   $\mu\text{g/ml}$ .

5 Las concentraciones determinadas del anticuerpo cV1q de las muestras de ratón de suero y de LBA confirman un tratamiento dependiente de la dosis con anticuerpo anti-TNF $\alpha$  y que el anticuerpo puede detectarse en LBA después de una administración intravenosa.

EJEMPLO 2 Acumulación de células inflamatorias pulmonares inducida por antígeno en el ratón: evaluación histopatológica

Se realizó una evaluación histopatológica en los pulmones de ratones hembra Balb/CJ sensibilizados.

Procedimiento Experimental

10 Se sensibilizaron veinte ratones hembra Balb/CJ de semanas de edad por inyecciones intraperitoneales de 10  $\mu\text{g}$  de OA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) mezclado en 1,6 mg de suspensión de gel de hidróxido de aluminio (Intergen, Inc., Purchase, NY) en 0,2 ml de solución salina estéril los días 0, 7 y 14. Esta suspensión se preparó una hora antes de la inyección intraperitoneal a cada ratón.

15 Los veinte sensibilizados se dividieron en dos grupos (10 ratones/grupo). A un grupo de ratones se le administró por vía intravenosa 10 mg/kg de anticuerpo cV1q muG2a (Grupo 2) 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA. Al otro grupo de ratones se le administró por vía intravenosa 10 ml/kg de PBS de Dulbecco (Centocor, Inc., Malvern, PA) (vehículo) (Grupo 1) 1 hora antes y 24 y 48 horas después de la exposición a OA. Los ratones se expusieron a OA (antígeno) por exposición aerosolizada el día 21 (5% p/w en solución salina (Baxter, Inc., Chicago, IL) durante 20 minutos. El aerosol se generó mediante un nebulizador PARI-Master (PARI-Respiratory, Richmond, VA). La salida del mismo se conectó a una pequeña cámara Plexiglas® (Pena-Plas, Jessup, PA) que contenía a los animales.

20 Setenta y dos después de la exposición al antígeno, se sacrificó a los ratones y los pulmones se extirparon y se llenaron con formalina neutra tamponada (NBF; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 10%. Después, los pulmones se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cambios microscópicos se clasificaron en una escala de uno a cuatro (mínimo, ligero/leve, moderado y marcado/intenso) dependiendo de la gravedad del cambio.

25 Resultados

Los cambios microscópicos que no pudieron clasificarse se indicaron como Presente (P). En la Tabla 3 se presentan todos los hallazgos microscópicos.

TABLA 3: Cambios Microscópicos en los Pulmones de los Ratones

Grupo/Tratamiento	Grupo 1									
Animal número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PULMONES*										
Leucocitos perivasculares	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2
Edema perivascular	1			1	1	2				1
Vasos mineralizados, focales										
Leucocitos intersticiales	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1
Depósitos eosinofílicos intersticiales	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2
Leucocitos alveolares	1	1		2	2	1	1	1	1	1
Macrófagos alveolares	1	1			1				1	
Hemorragia alveolar					2					
Leucocitos pleurales	2	2	2	2	3	1	2	2	2	
Macrófagos pleurales										

Grupo/Tratamiento	Grupo 1									
Ganglios linfáticos peribronquiales										
Macrófagos eosinofílicos										
* CÓDIGO DE INTENSIDAD: 1 = MÍNIMO, 2 = LIGERO, 3 = MODERADO, 4 = INTENSO, P = PRESENTE										

TABLA 3: Cambios Microscópicos en los Pulmones de los Ratones (continuación)

Grupo/Tratamiento	Grupo 2									
Animal número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PULMONES*										
Leucocitos perivasculares	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
Edema perivascular	1			1					1	
Vasos mineralizados, focales			P							
Leucocitos intersticiales	1	1			1					
Depósitos eosinofílicos intersticiales	2	1			1	1	2	1		
Leucocitos alveolares	1	1			1				1	1
Macrófagos alveolares				2	1		1		1	1
Hemorragia alveolar										2
Leucocitos pleurales	2	2			1				2	2
Macrófagos pleurales										4
Ganglios linfáticos peribronquiales										
Macrófagos eosinofílicos						3				4
* CÓDIGO DE INTENSIDAD: 1 = MÍNIMO, 2 = LIGERO, 3 = MODERADO, 4 = INTENSO, P = PRESENTE										

5 Las acumulaciones de células inflamatorias estaban presentes y se enumeraron en tres áreas de los pulmones de ratones individuales en los dos grupos del ensayo. Las acumulaciones de leucocitos se evaluaron en los tejidos perivasculares alrededor de los vasos en las áreas bronquiales, en los tejidos intersticiales de las áreas alveolares y en los tejidos pleural/subpleural. En los dos grupos, algunos ratones presentaron edema perivascular alrededor de los vasos en las áreas bronquiales. Ratones individuales en los dos grupos presentaron depósitos eosinofílicos de tipo 10 fibrina en los capilares de los tejidos intersticiales. Los números 6 y 10 de los ratones del Grupo 2 presentaron acumulaciones moderadas e intensas, respectivamente, de macrófagos con tinción eosinofílica en los nódulos linfáticos peribronquiales. El número 10 de los ratones del grupo 2, también presentaron acumulaciones intensas de macrófagos con tinción eosinofílica en los tejidos pleurales y tejidos peribronquiales junto con células inflamatorias.

15 Como un grupo, cuando se comparó con el Grupo 1 (ratones tratados con vehículo), análisis histopatológicos mostraron reducción significativa en el número de leucocitos perivasculares, leucocitos intersticiales y leucocitos pleurales en los ratones del Grupo 2 (ratones tratados con cV1q). Estos resultados muestran que, en ratones sensibilizados, el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  modula la acumulación de células inflamatorias pulmonares inducida por antígeno.

EJEMPLO 3 Terapia con Infiximab para el Asma Resistente a Esteroides.

5

Una mujer de 53 años (N.L.) con enfermedad pulmonar obstructiva crónica leve y asma grave dependiente de esteroides, desarrolló un empeoramiento del asma durante varias semanas a pesar del tratamiento intenso con 40 mg de prednisona por vía oral, esteroides inhalados, ipratropium inhalado, albuterol inhalado, salmeterol inhalado, teofilina y zileuton oral. Los efectos secundarios este sustancial pero ineficaz programa incluyeron aumento de peso, disminución del grosor de la piel y hematoma.

El tratamiento con infiximab se estableció de acuerdo con la Tabla 4.

TABLA 4: Infusión con Infiximab (Paciente N.L.)

Día	Número de infusión	Dosis de Infusión (mg)	Dosis acumulativa (mg)
0	1	200	200
4	2	200	400
16	3	400	800
45	4	400	1.200

10

La paciente recibió cuatro infusiones de un total de 1200 mg de infiximab durante el periodo de tratamiento.

Resultados

Hubo una disminución de los síntomas del asma, cese de despertares nocturnos, una reducción del uso de esteroides y menos dependencia de la medicación inhalada. Esta mejora comenzó a las 24 horas de la terapia con infiximab y se documenta en la Tabla 5, el diario de la paciente.

15

TABLA 5: Diario de la paciente

Día	Síntomas asmáticos después de 24 horas*	Número de veces que se despertó la noche pasada debido al asma	Número de descargas de Proventil usadas en las últimas 24 horas	Número de tratamientos de nebulización usados en las últimas 24 horas	Uso de esteroides (dosis total diaria) (mg)	Puntuación de flujo máximo (ml/min)**	
						AM	PM
2	4	1	6	4	20	200	160
3	2	0	0	2	15	200	400
4	2	0	0	2	15	205	400
5	2	0	0	2	10	275	400
6	2	0	2	2	10	255	400
7	2	0	0	2	0	200	400
8	2	0	0	1	10	205	400
9	2	0	0	2	0	205	400
10	2	0	0	2	10	200	400
11	2	0	2	2	0	195	400
12	2	0	0	2	10	195	400

(cont)

ES 2 357 749 T3

Día	Síntomas asmáticos después de 24 horas*	Número de veces que se despertó la noche pasada debido al asma	Número de descargas de Proventil usadas en las últimas 24 horas	Número de tratamientos de nebulización usados en las últimas 24 horas	Uso de esteroides (dosis total diaria) (mg)	Puntuación de flujo máximo (ml/min)**	
						AM	PM
13	2	0	0	2	0	245	400
14	2	0	0	1,5	10	225	400
15	2	0	0	2	0	245	400
16	2	0	0	2	10	200	400P/350A
17	2	0	0	2	0	180P/160A	400/310
18	2	0	0	2	10	220/200	400/320
19	2	0	0	2	0	370/225	400/320
20	2	0	0	2	10	370/270	400/340
21	2	0	0	2	0	305/260	400/330
22	2	0	0	2	10	230/200	400/350
23	2	0	0	2	0	205/240	400/330
24	2	0	0	2	10	250/210	400/340
25	2	0	0	2	0	220/200	400/350
26	2	0	0	2	10	175/200	400/355
27	2	0	0	2	0	200/210	400/350
28	2	0	0	3	10	235/210	400/350
29	2	0	0	2	0	225/200	400/340
30	4	0	0	3	10	200/ 170	300/280
31	2	0	0	2	0	180/180	400/330
32	2	0	0	2	10	225/ 190	400/350
33	1	0	0	2	0	275/250	400/340
34	1	0	0	2	10	210/240	400/345
35	2	0	0	2	0	300/200	400/340
36	2	0	0	2	10	230/220	400/350
37	1	0	0	2	0	275/250	400/350
38	1	0	0	2	10	210/190	400/340
39	1	0	0	2	0	245/ 180	400/335

(continuación)

Día	Síntomas asmáticos después de 24 horas*	Número de veces que se despertó la noche pasada debido al asma	Número de descargas de Proventil usadas en las últimas 24 horas	Número de tratamientos de nebulización usados en las últimas 24 horas	Uso de esteroides (dosis total diaria) (mg)	Puntuación de flujo máximo (ml/min)**	
						AM	PM
40	1	0	0	3	10	195/180	400/340
41	1	0	0	2	0	180/170	400/340
42	3	0	0	2	10	230/210	400/340
43	3	0	0	2	0	235/210	400/340
44	2	0	0	2	10	190/ 170	380/290
45	-	0	-	-	0	175/ 180	-

\* Las puntuaciones de los síntomas asmáticos se realizaron cada mañana usando la siguiente escala:

0 = Sin síntomas durante el día

1 = Síntomas durante un periodo corto durante el día

2 = Síntomas durante dos o más periodos cortos durante el día

3 = Síntomas durante la mayor parte del día que no influyeron en las actividades normales diarias

4 = Síntomas durante la mayor parte del día que influyeron en las actividades normales diarias

5 = Síntomas tan graves que causan falta al trabajo o no poder realizar las actividades normales diarias

\*\* Las puntuaciones de flujos máximos se midieron usando un flujómetro pediátrico o un flujómetro pediátrico (P) y un flujómetro adulto (A), como se indica.

5

La puntuación de flujo máximo es la mayor velocidad del flujo de aire registrada para la paciente como se mide en una espirometría. A diferencia de las puntuaciones de flujo máximo de 160 a 200 ml/min previas al tratamiento, durante el programa de tratamiento con infliximab se registraron máximos de 340 a 400 ml/min. Las puntuaciones de flujo máximo más altas son mejores que las puntuaciones más bajas.

Durante el tratamiento con infliximab, no se necesitó albuterol inhalado. Además, el esteroide usado se redujo a 10 mg cada dos días.

10

La calidad de vida de la paciente mejoró enormemente cuando recibió infliximab. Por ejemplo, comparando la calidad vida de las respuestas de la paciente, el asma de la paciente se controló bien y los despertares nocturnos habían desaparecido dos días después del tratamiento con infliximab.

La Tabla 6 muestra la mejora objetiva en estudios de función pulmonar.

TABLA 6: Ensayos de Función Pulmonar (paciente N.L.)

Día	Capacidad Voluntaria Forzada (CVF)	Volumen Espiratorio Forzado en 1 segundo (VEF <sub>1</sub> )	FEV <sub>1</sub> /CVF	Flujo Espiratorio Forzado (FEF 25-75)
2 (inicio)	54%	33%	56%	13%
16 (tratamiento)	82%	60%	73%	25%
22 (tratamiento)	71%	50%	57%	22%
28 (tratamiento)	79%	55%	57%	23%
36 (tratamiento)	87%	66%	61%	32%
45 (tratamiento)	80%	54%	67%	22%

5 La capacidad voluntaria forzada (CVF) es una medición de flujo espiratorio. El volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF<sub>1</sub>) es la cantidad máxima de aire que el paciente puede soplar en 1 segundo. El flujo espiratorio forzado (FEF 25-75) es una medición de la velocidad entre el primer y los tres cuartos de segundo. Los valores más altos son mejores que los valores más bajos. Los valores de VEF observados fueron los más altos documentados por la paciente durante su cuidado aproximado de dos años

10 Esta paciente de 53 años tuvo una mejora inmediata y prolongada tanto en las señales como en los síntomas del tratamiento resistente al asma durante la terapia con infliximab. La terapia con infliximab redujo o eliminó la necesidad de terapias ineficaces o mal toleradas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en el tratamiento del asma resistente a esteroides en un individuo que necesita el tratamiento, comprendiendo dicha anticuerpo una región constante humana, en el que dicho anticuerpo anti- TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno inhibe competitivamente la unión del cA2 (REMICADE® infliximab) al TNF $\alpha$  humano
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha asma resistente a esteroides está asociada a una acumulación de células inflamatorias en los pulmones de dicho individuo que necesita el tratamiento.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo quimérico es el anticuerpo monoclonal cA2 (REMICADE® infliximab).
5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fragmento se selecciona de grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv.
- 15 6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es de la clase IgG1 de inmunoglobulina.
7. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno se administra al ser humano por medio de administración parenteral.
- 20 8. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno se administra al ser humano por medio de inhalación, administración intranasal, infusión, administración intravenosa, administración subcutánea o administración intramuscular.
- 25 9. El anticuerpo o fragmento unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, comprendiendo la cantidad terapéuticamente eficaz una dosis única o dividida que contiene aproximadamente de 0,1 mg a 500 mg de dicho anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno.
10. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, comprendiendo la cantidad terapéuticamente eficaz cuatro infusiones de un total de 1200 mg de dicho anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno.
- 30 11. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante humana y dicho anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o fragmento de unión al antígeno (i) comprende las regiones de cA2 (REMICADE® infliximab) de unión al antígeno y (ii) se une a un epítipo neutralizante de TNF $\alpha$  humano con una afinidad de  $1,04 \times 10^{10}$  litros/mol, medido como una constante de asociación (K<sub>a</sub>).
- 35 12. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

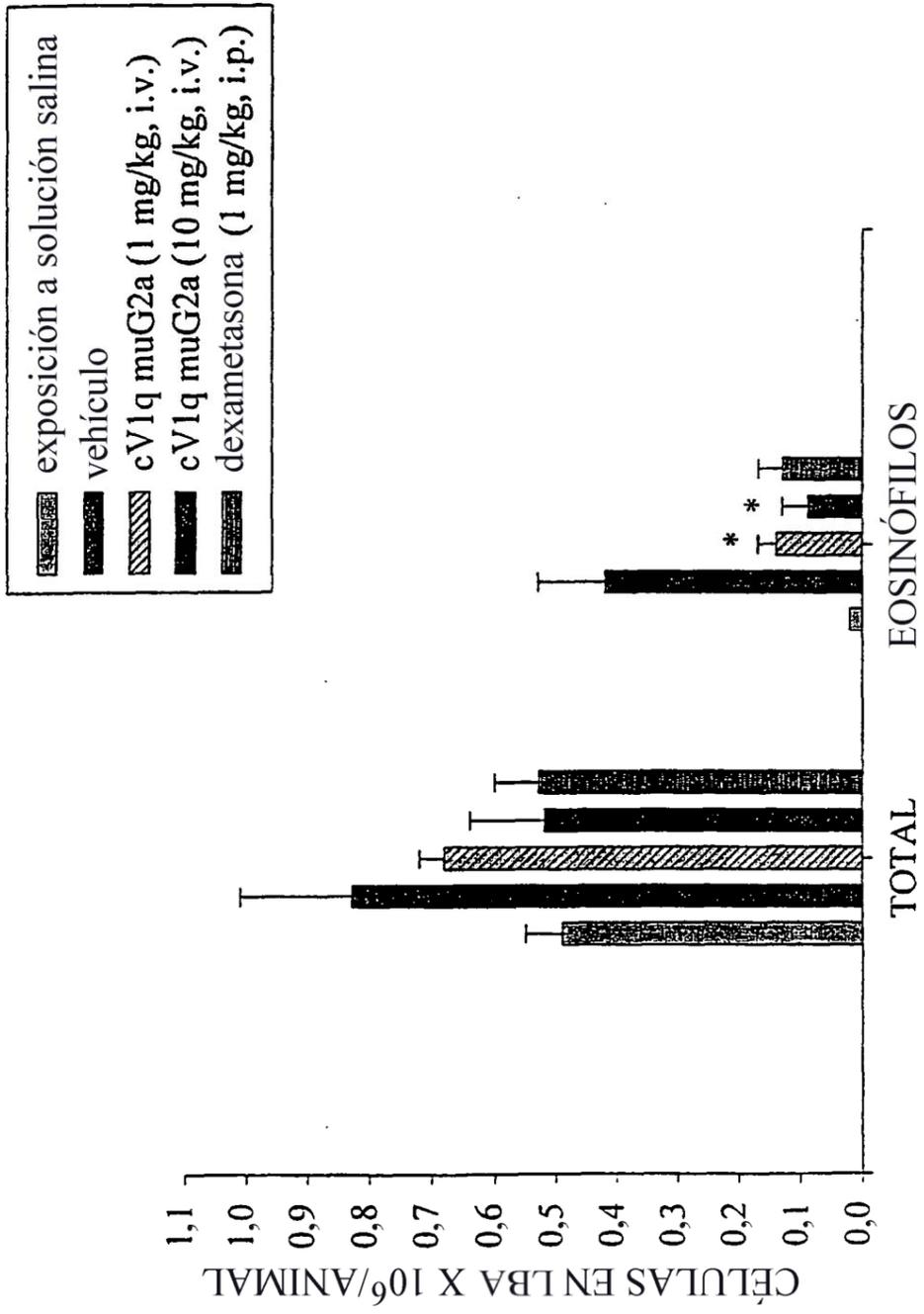


Fig. 1

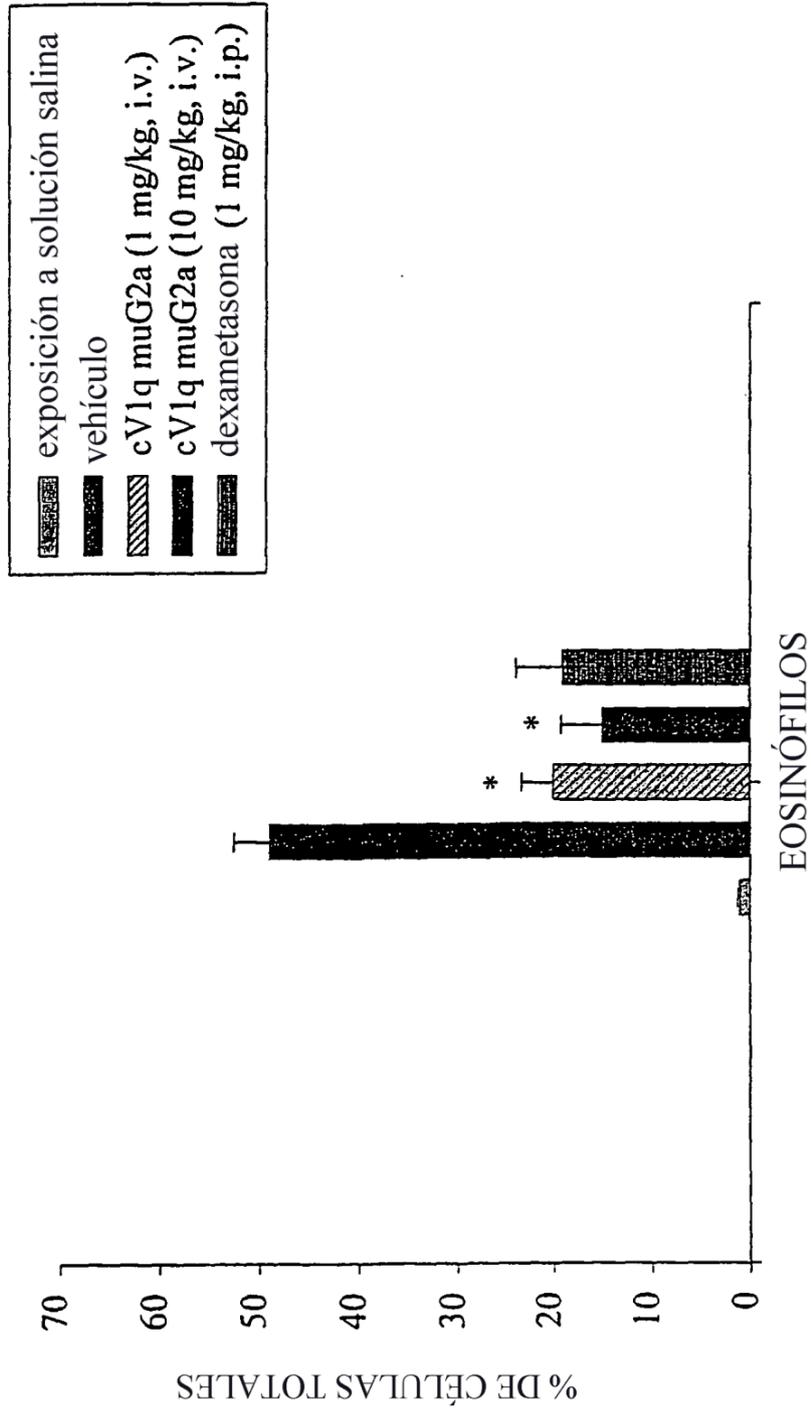


Fig. 2

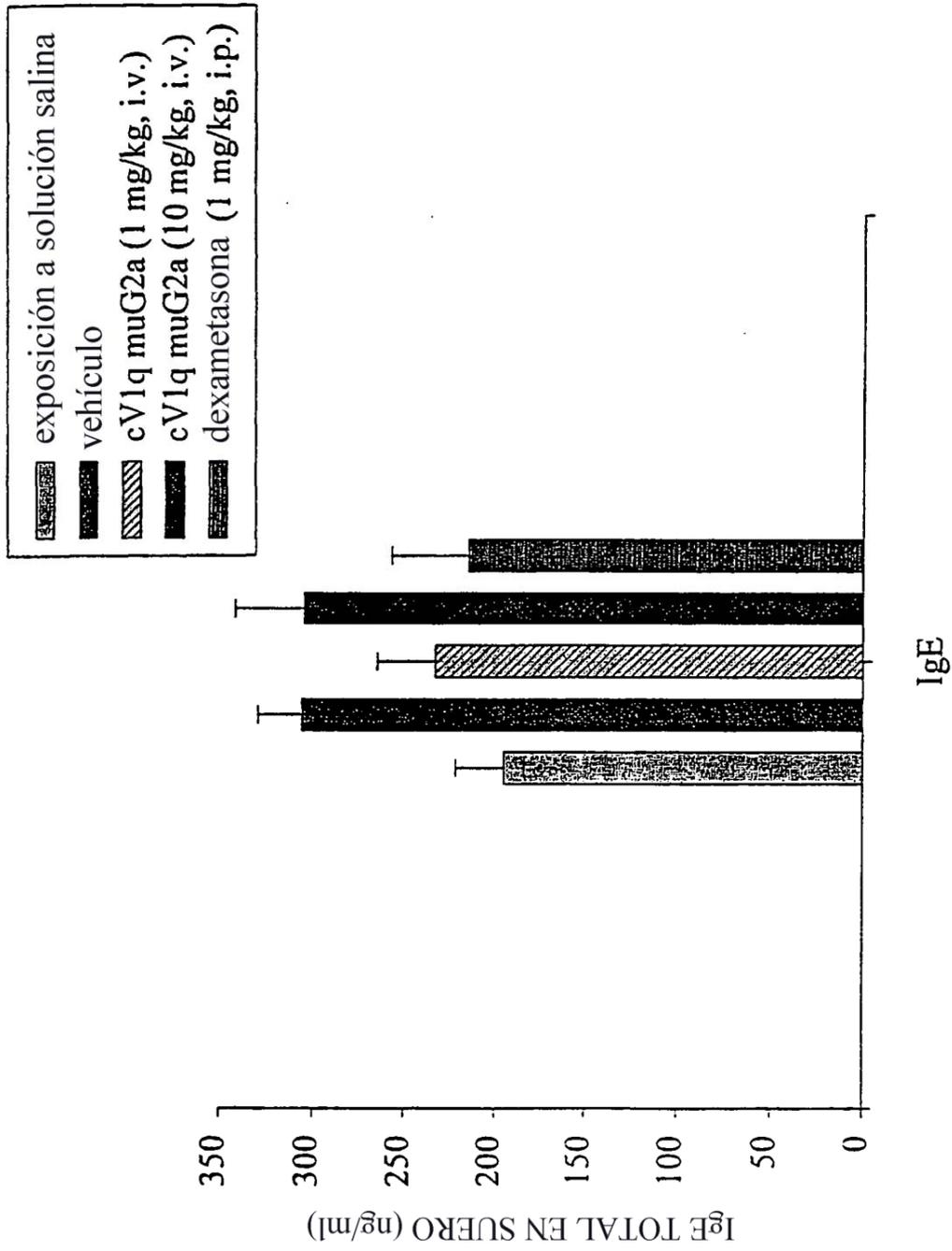


Fig. 3