

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 351**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03809644 .2**
96 Fecha de presentación: **24.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1578439**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54 Título: **TERAPIAS CON DOSIS BAJAS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS EN LOS QUE LA ACTIVIDAD DEL TNF-ALFA ES PERJUDICIAL.**

30 Prioridad:
24.10.2002 US 421262 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.12.2011

73 Titular/es:
**ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD
CLARENDON HOUSE, 2 CHURCH STREET
HM 11 HAMILTON, BM**

72 Inventor/es:
**KAYMAKCALAN, Zehra y
KAMEN, Robert**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 370 351 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

Terapias con dosis bajas para el tratamiento de trastornos en los que la actividad del TNF-Alfa es perjudicial

5 **Antecedentes de la invención**

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citocina producida por numerosos tipos de células, incluyendo monocitos y macrófagos, que originalmente se identificó basándose en su capacidad para inducir la necrosis de determinados tumores en ratones (véase, por ejemplo, Old, L (1985) (1985) Science 230:630-632). Posteriormente, se demostró que un factor denominado cachectina, asociado con caquexia, se trataba de la misma molécula que el TNF α . El TNF α se ha implicado en la mediación de choques (véase, por ejemplo, Beutler, B. and Cerami, A. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:505-518; Beutler, B. and Cerami, A. (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:625-655). Además, el TNF α se ha implicado en la patofisiología de diversas otras enfermedades y trastornos humanos, que incluyen septicemia, infecciones, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante y enfermedad de injerto contra huésped (véase, por ejemplo, Moeller, A., et al. (1990) Cytokine 2:162-169; patente de los Estados Unidos N.º. 5,231,024 de Moeller et al.; Publicación de Patentes Europeas N.º. 260 610 B1 de Moeller, A., et al. Vasilli, P. (1992) Annu. Rev. Immunol. 10:411 -452; Tracey, K.J. and Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45:491-503).

Debido al papel perjudicial del TNF α humano (hTNF α) en una diversidad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad del hTNF α . En particular, se han buscado anticuerpos que se unan a y neutralicen el hTNF α como un medio para inhibir la actividad del hTNF α . Algunos de los primeros anticuerpos de este tipo fueron los anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón, secretados por hibridomas preparados a partir de linfocitos de ratones inmunizados con hTNF α (véase, por ejemplo, Hahn T; et al., (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 3814-3818; Liang, C-M., et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:847-854; Hirai, M., et al. (1987) J. Immunol. Methods 96:57-62; Fendly, B.M., et al. (1987) Hybridoma 6:359-370; Moeller, A., et al. (1990) Cytokine 2:162-169; Patente de los Estados Unidos N.º. 5,231,024 de Moeller et al.; Publicación de patente europea N.º. 186 833 B1 por Wallach, D.; Publicación de Solicitud de patente europea N.º. 218 868 A1 de Old et al.; Publicación de patente europea N.º. 260 610 B1 de Moeller, A., et al.). Aunque que estos anticuerpos anti-hTNF α de ratón a menudo mostraban una alta afinidad por hTNF α (por ejemplo, $K_D \leq 10^{-9} M$) y podían neutralizar la actividad del hTNF α , su uso *in vivo* podría estar limitado por problemas asociados con la administración de anticuerpos de ratón a seres humanos, tales como semivida en suero corta, una incapacidad para desencadenar determinadas funciones efectoras humanas y provocación de una respuesta inmune no deseada contra el anticuerpo de ratón en un ser humano (reacción "anticuerpo humano anti-ratón" (HAMA)).

En un intento por superar los problemas asociados con el uso de anticuerpos totalmente murinos en seres humanos, se han modificado por ingeniería genética anticuerpos anti-hTNF α murinos para que sean más "de tipo humano ". Por ejemplo, se han preparado anticuerpos quiméricos, en los que las regiones variables de las cadenas del anticuerpo derivan de murinos y las regiones constantes de las cadenas del anticuerpo derivan de seres humanos (Knight, D.M, et al. Immunol. 30:1443-1453; Publicación PCT N.º. WO 92/16553 de Daddona, P.E., et al.). Además, también se han preparado anticuerpos humanizados, en los que los dominios hipervariables de las regiones variables del anticuerpo derivan de murinos pero el resto de las regiones variables y las regiones constantes del anticuerpo derivan de seres humanos (Publicación PCT N.º. WO 92/11383 de Adair, J.R., et al.). Sin embargo, dado que estos anticuerpos quiméricos y humanizados aún conservan algunas secuencias murinas, aún pueden provocar una reacción inmune no deseada, la reacción anticuerpo humano anti-quimérico (HACA), especialmente cuando se administran durante periodos prolongados, por ejemplo: para síntomas crónicos, tales como artritis reumatoide (véase, por ejemplo, Elliott, M.J., et al. (1994) Lancet 344:1125-1127; Elliot, M.J., et al. (1994) Lancet 344:1105-1110).

Un agente inhibidor de hTNF α preferido contra los mAb murinos o derivados de los mismos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados) sería un anticuerpo anti-hTNF α , completamente humano, puesto que dicho agente no debería suscitar la reacción HAMA, incluso aunque se use durante periodos prolongados. Se han preparado autoanticuerpos monoclonales humanos contra hTNF α usando técnicas de hibridoma humano (Boyle, P., et al. (1993) Cell. Immunol. 152:556-568; Boyle, P., et al. (1993) Cell. Immunol. 152: 569-581; Publicación de Solicitud de Patente Europea N.º. 614 984 A2 de Boyle, et al). Sin embargo, se comunicó que estos autoanticuerpos monoclonales derivados de hibridoma, que tenían una afinidad por el hTNF α demasiado baja como para poder calcularla con métodos convencionales, eran incapaces de unirse al hTNF α soluble y eran incapaces de neutralizar la citotoxicidad inducida por el hTNF α (véase, Boyle, et al.; anterior). Además, el éxito de la técnica de hibridoma humano depende de la presencia natural en sangre periférica humana de linfocitos productores de anticuerpos específicos para el hTNF α . Algunos estudios han detectado autoanticuerpos séricos contra hTNF α en seres humanos (Fomsgaard; A., et al. (1989) Scand. J. Immunol. 30:219-223; Bendtzen, K., et al. (1990) Prog. Leukocyte Biol. 10B:447-452), mientras que otros no lo han hecho (Leusch, H-G., et al. (1991) J. Immunol. Methods 139:145-147).

Una alternativa a los anticuerpos humanos anti-hTNF α de origen natural sería un anticuerpo hTNF α recombinante. Se han descrito anticuerpos humanos recombinantes que se unen a hTNF α con una afinidad relativamente baja (es decir, $K_D \sim 10^{-7} M$) y una velocidad de disociación rápida (es decir, $K_{off} \sim 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$) (Griffiths, A.D., et al. (1993) EMBO

J. 12:725-734). Sin embargo, debido a su cinética de disociación relativamente rápida, estos anticuerpos podrían no ser adecuados para su uso terapéutico. Adicionalmente, se ha descrito un anti-hTNF α humano recombinante que no neutraliza la actividad del hTNF α , sino que en su lugar potencia la unión del hTNF α a la superficie de las células y potencia la internalización del hTNF α (Lidbury, A., et al. (1994) *Biotechnol. Ther.* 5:27-45; Publicación PCT N°. WO 92/03145 de Aston, R. et al.)

Por consiguiente, siguen siendo necesarios anticuerpos humanos, tales como anticuerpos humanos recombinantes, que se unan al hTNF α soluble con una alta afinidad y una cinética de disociación lenta y que tengan la capacidad de tratar trastornos en los que la actividad TNF α es perjudicial.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo anti-TNF α humano que es, o bien el anticuerpo D2E7 o bien un anticuerpo anti-TNF α humano con propiedades equivalentes a las del D2E7, que se disocia del TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o menor y una constante de velocidad de disociación k_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, y que neutraliza la citotoxicidad inducida por el TNF α humano en un ensayo L929 convencional *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menor, para su uso en el tratamiento o alivio de la artritis, en el que el anticuerpo anti-TNF α debe administrarse a una dosis baja de 0,01 -0,11 mg/kg, de manera que se trate o alivie la artritis.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las puntuaciones artríticas medias de cada ratón en los grupos de tratamiento a los que se les había administrado distintas dosis de D2E7. Las puntuaciones artríticas se registraron semanalmente comenzando a 1 semana de vida. Para cada grupo de tratamiento, en el gráfico se indican las puntuaciones artríticas medias \pm error típico. Los grupos de tratamiento estaban constituidos de la siguiente manera: Grupo de control: 11 hembras, 9 machos de ratón, (n=20); grupo con dosis de 10 mg/kg: 2 hembras, 2 machos de ratón (n=4); grupo con dosis de 5 mg/kg: 6 hembras, 1 macho de ratón (n=7); grupo con dosis de 1mg/kg: 5 hembras, 3 machos de ratón (n=8); grupo con dosis de 0,5 mg/kg: 3 hembras, 2 machos de ratón (n=5); grupo con dosis de 0,1 mg/kg: 3 hembras, 3 machos de ratón (n=6); grupo con dosis de 0,01 mg/kg: 4 hembras, 2 machos de ratón (n=6).

La figura 2 muestra las puntuaciones artríticas de cada ratón en los grupos de tratamiento a los que se les había administrado distintas dosis de Remicade. Las puntuaciones artríticas se registraron semanalmente comenzando a 1 semana de vida. Para cada grupo de tratamiento, en el gráfico se indican las puntuaciones artríticas medias \pm error típico. Los grupos de tratamiento estaban constituidos de la siguiente manera: Grupo de control: 11 hembras, 9 machos de ratón (n=20); grupo con dosis de 10 mg/kg: 4 hembras, 1 macho de ratón (n=5); grupo con dosis de 5 mg/kg: 3 hembras, 4 machos de ratón (n=7); grupo con dosis de 1mg/kg: 6 hembras, 2 machos de ratón (n=8); grupo con dosis de 0,5 mg/kg: 4 hembras, 2 machos de ratón (n=6); grupo con dosis de 0,1 mg/kg: 1 hembra, 4 machos de ratón (n=5); grupo con dosis de 0,01 mg/kg: 2 hembras, 3 machos de ratón (n=5).

La figura 3 muestra las puntuaciones artríticas de cada ratón en los grupos de tratamiento a los que se les había administrado distintas dosis de Enbrel. Las puntuaciones se registraron semanalmente comenzando a 1 semana de vida. Para cada grupo de tratamiento, en el gráfico se indican las puntuaciones artríticas medias \pm error típico. Los grupos de tratamiento estaban constituidos de la siguiente manera: Grupo de control: 11 hembras, 9 machos de ratón (n=20); grupo con dosis de 10 mg/kg: 3 hembras, 2 machos de ratón (n=5); grupo con dosis de 5 mg/kg: 3 hembras, 3 machos de ratón (n=6); grupo con dosis de 1 mg/kg: 5 hembras, 1 macho de ratón (n=6); grupo con dosis de 0,5 mg/kg: 4 hembras, 3 machos de ratón (n=7); grupo con dosis de 0,1 mg/kg: 2 hembras, 3 machos de ratón (n=5); grupo con dosis de 0,01 mg/kg: 2 hembras, 4 machos de ratón (n=6).

La figura 4 muestra las puntuaciones artríticas finales en ratones huTNF-Tg197 con 10 semanas de vida tratados con D2E7, Remicade, y Enbrel.

Las figuras 5A-D muestran una evaluación histopatológica de diversos tejidos extraídos de articulaciones artríticas.

Las figuras 6A, 6B, y 6C muestran niveles circulantes de huTNF en ratones huTNF-Tg197 tratados con D2E7, Remicade, y Enbrel.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo anti-TNF α humano que es, o bien el anticuerpo D2E7 o bien un anticuerpo anti-TNF α humano con propiedades equivalentes a las del D2E7, que se disocia del TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o menor y una constante de velocidad de disociación k_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, y que neutraliza la citotoxicidad inducida por el TNF α humano en un ensayo L929 convencional *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menor, para su uso en el tratamiento o alivio de la artritis, en el que el anticuerpo anti-TNF α debe administrarse a una dosis baja de 0,01 -0,11 mg/kg, de manera que se trate o alivie la artritis.

La expresión "TNF α humano" (abreviada en el presente documento como huTNF, hTNF α , o sencillamente hTNF), tal y como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una citocina humana que existe como una forma de 17 kD secretada y una forma de 26 kD asociada a membrana, cuya forma biológicamente activa se compone de un trímero de moléculas de 17 kD unidas por enlace no covalente. La estructura del hTNF α se describe

con más detalle, por ejemplo, en Pennica, D., et al. (1984) Nature 312:724-729; Davis, J.M., et al. (1987) Biochemistry 26: 1322-1326; and Jones, E.Y., et al. (1989) Nature 338:225-228. La expresión TNF α humano pretende incluir el TNF α humano recombinante (rhTNF α), que se puede preparar mediante métodos convencionales de expresión recombinante o bien se puede adquirir en el mercado (R&D Systems, Catálogo N°. 210-TA, Minneapolis, MN).

La expresión "inhibidor del TNF α " incluye agentes que inhiben el TNF α . Entre los ejemplos de inhibidores de TNF α se incluyen el etanercept (ENBREL, Immunex), el infliximab (REMICADE, Johnson and Johnson), el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF (D2E7, Knoll Pharmaceuticals), CDP571 (Cell-tech), y CDP870 (Cell-tech) y otros compuestos que inhiben la actividad del TNF α , de forma que cuando se administran a un sujeto que padece un trastorno o que corre el riesgo de padecer dicho trastorno, en el que la actividad del TNF α es perjudicial, el trastorno se trata. La expresión también incluye cada uno de los anticuerpos y partes de anticuerpos humanos anti-TNF α descritos en el presente documento, así como los descritos en las patentes de los Estados Unidos N°. 6,090,382 y 6,258,562 B1, en la Patente de los Estados Unidos número: 6,509,015 y en el documento US 2003/0092059 A1.

El término "anticuerpo", tal y como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada VH y VL se compone 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. Los anticuerpos se describen con más detalle en las patentes de los Estados Unidos N°. 6,090,382 y 6,258,562 B1, y en la patente de los Estados Unidos N°. 6,509,015 y en US 2003/0092059 A1.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o sencillamente "parte del anticuerpo"), tal y como se usa en el presente documento se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hTNF α). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión " parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes separados, estos pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite constituirse como una sola cadena proteínica 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). También se pretende que la expresión " parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluya dichos anticuerpos monocatenarios. También se incluyen otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero que usan un conector que demasiado corto como para permitir emparejamientos entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Las partes de los anticuerpos se describen con más detalle en las patentes de los Estados Unidos N°. 6,090,382 y 6,258,562 B1, en la patente de los Estados Unidos N°. 6,509,015 y en US 2003/0092059 A1.

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-TNF α humano que es, o bien el anticuerpo D2E7 o bien un anticuerpo anti-TNF α humano con propiedades equivalentes a las del D2E7, que se disocia del TNF α humano con una K_d de 1x10⁻⁸ M o menor y una constante de velocidad de disociación k_{off} de 1x10⁻³s⁻¹ o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, y que neutraliza la citotoxicidad inducida por el TNF α humano en un ensayo L929 convencional *in vitro* con una CI₅₀ de 1 x 10⁻⁷ M o menor, para su uso en el tratamiento o alivio de la artritis, en el que el anticuerpo anti-TNF α debe administrarse a una dosis baja de 0,01 -0,11 mg/kg, de manera que se trate o alivie la artritis.

De acuerdo con una realización, dicho anticuerpo humano aislado, se disocia del TNF α humano con una K_{off} de 5 x 10⁻⁴ s⁻¹ o menor, o incluso más preferiblemente, con una K_{off} 1 x 10⁻⁴ s⁻¹ o menor. Más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado neutraliza la citotoxicidad inducida por el TNF α humano en un ensayo L929 convencional *in vitro* con una CI₅₀ del 1 x 10⁻⁸ M o menor, y aún más preferiblemente con una CI₅₀ de 1 x 10⁻⁹ M o menor y todavía más preferiblemente con una CI₅₀ de 5 x 10⁻¹⁰ M o menor.

La expresión "dosis baja " o "dosificación baja", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de inhibidor del TNF α que se administra a un sujeto, en el que la cantidad es sustancialmente menor que la habitualmente normalmente. Una "terapia de dosis baja" incluye un régimen de tratamiento que se basa en administrar una dosis baja de un inhibidor del TNF α . De acuerdo con la invención, una dosis baja de D2E7 se considera que es 0,01 -0,11 mg/kg. Dicha dosis baja puede usarse para tratar la artritis reumatoide y los síntomas asociados con la enfermedad. Por ejemplo, entre los síntomas que pueden tratarse usando una terapia de dosis baja de D2E7 se incluyen desgaste óseo, desgaste cartilaginoso, inflamación y vascularidad. Las dosis bajas de un inhibidor del TNF α son ventajosas por varias razones, incluyendo la reducción en la frecuencia y gravedad de efectos secundarios que podría asociarse con las dosis de inhibidor del TNF α normales prescritas.

I. Usos de inhibidores del TNF α

El TNF α se ha implicado en la patofisiología de una amplia diversidad de trastornos (véase, por ejemplo, Moeller, A., et al. (1990) Cytokine 2:162-169; patente de los Estados Unidos N $^{\circ}$. 5,231,024 de Moeller et al.; Publicación de Patente europea N $^{\circ}$. 260 610 B1 de Moeller, A). De acuerdo con la invención, tal y como se ha definido anteriormente, en el presente documento se describen métodos para inhibir la actividad del TNF α en un sujeto que padece dicho trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto dosis bajas del anticuerpo para inhibir la actividad del TNF α en el sujeto. Preferiblemente, el TNF α es TNF α humano y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa el sujeto puede ser un mamífero que exprese un TNF α con el que el anticuerpo de la invención presente reactividad cruzada. El anticuerpo se administrará a un sujeto humano con fines terapéuticos en dosis bajas de 0,01-0,11 mg/kg. Además, puede administrarse una dosis baja del anticuerpo a un mamífero no humano que exprese un TNF α con el que el anticuerpo presente una reactividad cruzada (por ejemplo: un primate, un cerdo o un ratón) con fines veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales podrían ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos (por ejemplo, ensayar dosificaciones y la evolución de la administración).

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "un trastorno en el que la actividad TNF α es perjudicial " pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de TNF α en un sujeto que padece el trastorno se ha demostrado que es, o se sospecha que es, o bien el responsable de la patofisiología del trastorno, o bien un factor que contribuye a empeorar el trastorno. Para los fines de la invención, el tratamiento de un trastorno en el que la actividad del TNF α es perjudicial, se refiere al tratamiento de la artritis e incluye, pero sin limitación, aliviar síntomas asociados con dicho trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad TNF α es nociva es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad del TNF α alivie los síntomas y/o el avance del trastorno. Dichos trastornos pueden ponerse en evidencia, por ejemplo, por un aumento en la concentración de TNF α en un fluido biológico de un sujeto que padezca el trastorno (por ejemplo: un aumento en la concentración de TNF α en suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto) que pueda detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-TNF α tal y como se ha descrito anteriormente. El uso de una dosis baja de anticuerpos en el tratamiento de la artritis, en particular de la artritis reumatoide, se describe más adelante. En algunas realizaciones, se administra una dosis baja del anticuerpo al sujeto en combinación con otro agente terapéutico, tal y como se describe a continuación.

Artritis Reumatoide

El TNF α se ha implicado en la activación de la inflamación tisular y en causar la destrucción articular en la artritis reumatoide (véase, por ejemplo, Moeller, A., et al. (1990) Cytokine 2:162-169; Patente de los Estados Unidos N $^{\circ}$. 5,231,024 de Moeller et al.; Publicación de patente europea N $^{\circ}$. 260 610 B 1 de Moeller, A.; Tracey and Cerami, *supra*; Arend, W. P. and Dayer, J-M. (1995) Arth. Rheum. 38:151-160; Fava, R. A., et al. (1993) Clin. Exp. Immunol. 94:261-266). Los anticuerpos anti-hTNF α quiméricos y murinos humanizados se han sometido a ensayos clínicos para el tratamiento de la artritis reumatoide (véase, por ejemplo, Elliott, M. J., et al. (1994) Lancet 344:1125-1127; Elliot, M. J., et al. (1994) Lancet 344:1105-1110; Rankin, E. C, et al. (1995) Br.J. Rheumatol. 34:334-342).

Se pueden usar dosis bajas de anticuerpos anti-TNF α , de acuerdo con la invención, tal y como se han definido anteriormente, para tratar la artritis reumatoide. Se pueden usar dosis bajas de anticuerpos anti-TNF α para tratar la artritis reumatoide aliviando los síntomas asociados con dicho trastorno. Entre los ejemplos de síntomas o indicios comúnmente asociados con la artritis reumatoide se incluyen, pero sin limitación, el desgaste osteo-articular, desgaste cartilago-articular, inflamación articular, vascularidad articular y una combinación de los mismos. Otros ejemplos de síntomas asociados con la artritis reumatoide incluyen: aumento de peso, distorsión articular, inflamación articular, deformación articular, anquilosis en flexión, movilidad gravemente afectada y combinaciones de los mismos.

Los anticuerpos humanos, de acuerdo con la invención, pueden usarse para tratar artritis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa. Típicamente, el anticuerpo se administra por vía sistémica, aunque en algunos trastornos, la administración local del anticuerpo en el lugar de la inflamación podría ser beneficiosa (por ejemplo, la administración local en las articulaciones en la artritis reumatoide, sola o en combinación con un derivado del ciclohexano-ilideno tal y como se describe en la publicación PCT N $^{\circ}$. WO 93/19751). El anticuerpo también puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades

autoinmunes, tal y como se describe más adelante en la subsección II.

También pueden usarse los anticuerpos para tratar la artritis reumatoide juvenil, la artritis psoriásica y la osteoartritis.

5 II. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

10 Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para administrar en dosis bajas a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal y como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Entre los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición 15 agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, poli alcoholes, tales como manitos, sorbitos, o cloruro sódico. Adicionalmente, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender menores cantidades más pequeñas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumenten la vida útil o la eficacia del anticuerpo, parte de anticuerpo u otros inhibidores del TNF α .

20 Las composiciones pueden adoptar diversas formas adecuadas para la administración de dosis bajas. Entre ellas se incluye, por ejemplo, formas de dosificación líquida, sem.-sólida y sólida, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica que se desee. Las composiciones típicas preferidas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como las 25 composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos u otros inhibidores del TNF α . El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, se administra una dosis baja del anticuerpo por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, se administra una dosis baja del anticuerpo por inyección intramuscular o subcutánea.

30 Típicamente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura organizada adecuada para concentraciones elevadas de fármaco. Las soluciones estériles inyectables pueden prepararse incorporando una dosis baja del compuesto activo (es decir, anticuerpo, parte de anticuerpo, u otro inhibidor del TNF α) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una 35 combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según las necesidades, seguido de una esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración, de la misma. La 40 fluidez apropiada de una disolución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimientos, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario, en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede obtenerse incluyendo en la 45 composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

También se describen composiciones farmacéuticas envasadas que comprenden una dosis baja del anticuerpo e instrucciones para usar el inhibidor para tratar un trastorno particular en el que la actividad del TNF α sea perjudicial, tal y como se ha descrito anteriormente.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que se ha determinado como necesaria para eliminar dicho trastorno o para reducir y/o aliviar los síntomas de dicho trastorno, siempre y cuando una "cantidad terapéutica eficaz" se refiera a una cantidad que sea eficaz, a dosis bajas de 0,01- 0,11 mg/kg y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad 55 terapéuticamente eficaz del anticuerpo 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. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo esté compensada por los efectos terapéuticos beneficiosos.

60 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, en varias dosis bajas divididas a lo largo del tiempo o la dosis baja puede reducirse o aumentarse proporcionalmente tal y como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas 65 unitarias de dosificación baja para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como

dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención viene estipulada por y depende directamente de (a) las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico o profiláctico particular a conseguir, y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de preparación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

El intervalo, de acuerdo con la invención, para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo es 0,01-0,11 mg/kg. Debe tenerse en cuenta que los valores de dosificación podrían variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además, que para cualquier sujeto particular, los regímenes específicos de dosificación deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y con el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

La dosis baja del anticuerpo administrado a un sujeto es de aproximadamente 0,01-0,11 mg/kg, tal como 0,06-0,11 mg/kg. En una realización preferida, el anticuerpo es D2E7. También se pretende que formen parte de esta invención los intervalos intermedios a las dosificaciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, se pretenden incluir los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores.

Se puede administrar una dosis baja de los anticuerpos mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferido es una inyección intravenosa o infusión. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En algunas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En algunas realizaciones, puede administrarse por vía oral una dosis baja del anticuerpo, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y, si se desea, otros ingredientes) también pueden incluirse en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración oral terapéutica, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y pueden usarse en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar una dosis baja del compuesto por administración distinta a la administración parenteral, podría ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos complementarios. En algunas realizaciones, una dosis baja del anticuerpo se formula conjuntamente con y/o se administrada conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar la artritis. Por ejemplo, una dosis baja del anticuerpo anti-hTNF α puede formularse conjuntamente y/o administrarse conjuntamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo: anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular), una o más citocinas, receptor de TNF α soluble (véase, por ejemplo, publicación PCT N $^{\circ}$. WO 94/06476) y/o uno o más agentes químicos que inhiben la producción o actividad del hTNF α (tal como los derivados del ciclohexano-ilideno tal y como se describe en la publicación PCT N $^{\circ}$. WO 93/19751). Además, puede usarse una dosis baja de uno o más anticuerpos en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Dichas terapias de combinación podrían incluso usar, ventajosamente, dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando de esta forma, posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las distintas monoterapias.

III. Otros agentes terapéuticos

La frase "en combinación con" un agente terapéutico, incluye la administración conjunta de una dosis baja del anticuerpo con un agente terapéutico, la administración de una dosis baja del primer anticuerpo, seguida por el agente terapéutico y la administración del primer agente terapéutico, seguida por la dosis baja del anticuerpo. El agente (o agentes) terapéutico específico se selecciona, generalmente, basándose en el trastorno particular que se está tratando, tal y como se describe más adelante.

Entre los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos, para la artritis reumatoide, con los que puede combinarse una dosis baja del anticuerpo, se incluyen los siguientes: fármaco (o fármacos) antiinflamatorio no esteroideo (AINE); fármaco (o fármacos) antiinflamatorio supresor de citocinas (AISC); CDP- 571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; CelltechBayer); cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión receptor de TNF-IgG de 75 kd; Immunex; véase, por ejemplo: Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A); TNFR-IgG de 55 kd (proteína de fusión receptor de TNF-IgG de 55 kd;

Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado inagotable; IDEC/Smith-Kline; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión IL-2; Seragen; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2R α humanizado; Protein Design Labs/ Roche); IL-4 (citocina anti-inflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; citocina anti-inflamatoria IL-10, recombinante; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 y/o agonistas de IL-4 (por ejemplo, anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista de receptores de IL-1; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (proteína de unión a TNF soluble; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, págs. 37-42); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa de tipo IV; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S282); MK-966 (inhibidor de COX-2; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S81); Iloprost (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S82); metotrexato; talidomida (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S282) y fármacos afines a talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (inhibidor de citocinas y anti-inflamatorio; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S131); *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, págs. 103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación del plasminógeno; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S284); T-614 (inhibidor de citocina; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S282); prostaglandina E1 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S282); Tenidap (fármaco antiinflamatorio no esteroideo; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S280); Naproxeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo; véase, por ejemplo, *Neuro Report* (1996) Vol. 7, págs. 1209-1213); Meloxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Ibuprofeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Sulfasalazina (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S281); Azatioprina (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S281); Inhibidor de la ICE (inhibidor de la enzima convertidora de interleucina-1 β); inhibidor de zap-70 y/o Inhibidor de Ick (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o de Ick); Inhibidor de del VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular o receptor del factor de crecimiento endotelial vascular; inhibidores de angiogénesis); fármacos antiinflamatorios corticosteroides (por ejemplo, SB203580); Inhibidores de TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12; interleucina-11 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S296); interleucina-13 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S308); inhibidores de interleucina-17 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, N $^{\circ}$. 9 (suplemento), S120); oro; penicilamina; chloroquina; hidroxiclороquina; clorambucilo; ciclofosfamida; ciclosporina; irradiación total linfoide; globulina antitímocito; anticuerpos anti-CD4; toxinas-CD5; péptidos y colágeno administrados por vía oral; Lobenzarit disódico; Agentes reguladores de citocinas (CRA) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); Oligodesoxinucleótidos fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 del complemento soluble (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; glucosaminoglucano polisulfato; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de peces y de semillas de plantas; véase, por ejemplo, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileuton; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); y azaribina.

Esta invención se ilustra aún más con los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplo 1: Estudio de eficacia de D2E7 administrado en dosis bajas

Se efectuaron estudios para determinar la eficacia de D2E7, infliximab, y etanercept a dosis bajas para prevenir la poliartritis usando el modelo murino transgénico (Tg197) de artritis reumatoide (RA). El infliximab es un anticuerpo quimérico humano derivado de ratón, y el etanercept es una construcción del receptor p75 del TNF. El D2E7 es un anticuerpo totalmente humano derivado a partir de una genoteca de inmunoglobulina humana. Los ratones transgénicos, Tg197 llevan el gen TNF α y espontáneamente desarrollan una enfermedad similar a la artritis reumatoide humana (Keffer, J. et al, 1991, *EMBO J.* 10:4025). Los síntomas de la enfermedad artrítica, incluyendo la artritis reumatoide, incluyen aumento de peso más lento, distorsión articular e inflamación, deformación articular y anquilosis y movilidad reducida. Los hallazgos histopatológicos incluyen hiperplasia de la membrana sinovial, infiltración leucocitaria, formación de cataratas, destrucción de cartílago y hueso articular. La administración de agentes anti-TNF previene el desarrollo de la poliartritis de una manera dependiente de la dosis.

A. Comparación de las características de unión de D2E7, Remicade, y Enbrel

El Infliximab (Remicade) y el Etanercept (Enbrel) son dos fármacos anti-TNF autorizados para la artritis reumatoide. El Remicade es un anticuerpo IgG $_1$ quimérico humano derivado de ratón y el Enbrel es una proteína de fusión constituida por el dominio extra-celular del receptor p75 del TNF y la región constante de la molécula IgG $_1$. El D2E7 es un anticuerpo totalmente humano de la IgG $_1$, clase kappa, seleccionado a partir de una genoteca de inmunoglobulina humana. Los tres agentes anti-TNF se unen al TNF humano con una fuerza relativamente similar. Las afinidades intrínsecas de D2E7, Remicade y Enbrel por el TNF son $8,6 \times 10^{-11}$, $9,5 \times 10^{-11}$ y $15,7 \times 10^{-11}$ M (valores Kd), respectivamente. Las cinéticas de unión al TNF son similares para los anticuerpos D2E7 y Remicade. Por otro lado, Enbrel, se une a y se disocia del TNF rápidamente. Por tanto, la semivida de 16 minutos del complejo TNF:

Enbrel es considerablemente menor que las semividas de 184 y 255 minutos de los complejos TNF: Remicade y D2E7, respectivamente.

5 Se usó un instrumento BIAcore 3000 para obtener los parámetros cinéticos de unión entre el TNF humano y los agentes anti-TNF. Se acoplaron covalentemente microplacas biodetectoras con un anticuerpo anti - Fc humano de cabra. Los agentes Anti-TNF (D2E7, Remicade y Enbrel) se capturaron después sobre las microplacas y se añadieron diversas concentraciones de huTNF. Los datos de unión se analizaron para obtener los parámetros cinéticos, que se describen en la Tabla 1.

10 Tabla 1: Unión de D2E7, Remicade, o Enbrel a TNF humano

Agente	asociación ($M^{-1} s^{-1}$)	disociación (s^{-1})	Kd(M)
D2E7	$5,37 \times 10^5$	$4,53 \times 10^{-5}$	$8,56 \times 10^{-11}$
Remicade	$6,71 \times 10^5$	$6,29 \times 10^{-5}$	$9,45 \times 10^{-11}$
Enbrel	$4,47 \times 10^6$	$7,02 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-10}$

B. Prevención de síntomas artríticos

15 Se usaron ratones Tg197 como modelo para estudiar los efectos de un régimen de dosis bajas de D2E7, Remicade, y Enbrel en el alivio de los síntomas comúnmente asociados con la artritis reumatoide. Los ratones transgénicos TNF humanos se identificaron y se verificaron por PCR. Desde la primera semana de vida, se asignaron camadas distintas de ratones Tg197 a diferentes grupos de estudio. A los ratones heterocigotos Tg197 para el gen TNF humano se les administraron dosis intraperitoneales semanales de D2E7, Remicade o Enbrel. Cada grupo de dosis del tratamiento farmacológico estaba constituido por ratones de una sola camada. Al grupo de control se le administró el diluyente de solución salina tamponada con fosfato y estaba constituido por ratones de 4 camadas. Los pesos de los animales de cada grupo se registraron semanalmente antes de la dosificación. A cada grupo se le administró una inyección i.p. semanal, de la siguiente manera:

25 Control de vehículo

D2E7, 10mg/kg	Remicade, 10 mg/kg	Enbrel, 10 mg/kg
D2E7, 5 mg/kg	Remicade, 5 mg/kg	Enbrel, 5 mg/kg
D2E7, 1 mg/kg	Remicade, 1 mg/kg	Enbrel, 1 mg/kg
D2E7, 0,5 mg/kg	Remicade, 0,5 mg/kg	Enbrel 0,5 mg/kg
D2E7, 0,1 mg/kg	Remicade, 0,1 mg/kg	Enbrel 0,1 mg/kg
D2E7, 0,01 mg/kg	Remicade, 0,01 mg/kg	Enbrel 0,01 mg/kg

Cada semana se registraron las puntuaciones artríticas de cada grupo usando el siguiente sistema de puntuación:

- 30
- 0 sin artritis
 - 1 artritis leve (distorsión articular)
 - 2 artritis moderada (inflamación, deformación articular)
 - 3 artritis grave (anquilosis en flexión y movilidad gravemente disminuida)

35 El tratamiento continuó durante 10 semanas. Los resultados del ensayo de puntuación se muestran en las figuras 2 y 3. La figura 4 muestra la puntuación artrítica final, en la semana 10, para los tres anticuerpos en los ratones Tg197 tratados. Los resultados muestran que fueron necesarias dosis más altas de Enbrel para prevenir el desarrollo de las puntuaciones artríticas. El valor de la ED₅₀ para el Enbrel estaba próximo a 1 mg/kg mientras que el valor de la ED₅₀ para el D2E7 y Remicade estaba por debajo de 0,5 mg/kg. Entre los dos anticuerpos, D2E7 ofreció más protección que Remicade a la misma dosis. Adicionalmente, la aparición de la enfermedad se retrasó hasta 5 semanas en los ratones tratados con 0,5 mg/kg de D2E7 y hasta 4 semanas en ratones tratados con dosis de 0,1 mg/kg de D2E7 (Figura 1). En cambio, la aparición de la enfermedad se retrasó durante sólo 3 semanas en los ratones tratados con 0,1 mg/kg ó con 0,5 mg/kg de Remicade (Figura 2).

45 En resumen, los tres agentes, D2E7, Remicade, y Enbrel impidieron el desarrollo de la artritis en ratones Tg197 de una manera dependiente de la dosis. Los ratones tratados obtuvieron puntuaciones artríticas más bajas y menos inflamación y lesión articular y ganaron más peso que los ratones no tratados. El patrón de respuesta fue similar para los tres antagonistas del TNF, pero el grado de protección varió entre los tres agentes. Aunque las dosis más altas, de saturación no permitieron ninguna distinción entre los agentes, la fuerza de protección a dosis intermedias fue mayor para los ratones tratados con D2E7, que para los ratones tratados con Infliximab (Remicade), siendo la menor para los ratones tratados con Etanercept (Enbrel).

C. Análisis de niveles circulantes de huTNF en ratones tratados

5 Durante el estudio se tomaron muestras de sangre a las 5 y 10 semanas. Se preparó suero y se determinaron los niveles de TNF humano con el kit ELISA para TNF humano de Medgenix. Los niveles de TNF se midieron para cada ratón en los grupos de tratamiento. Los resultados del estudio se muestran en la figura 6. Para cada grupo de tratamiento, en el gráfico se indica la media \pm error típico de los niveles de TNF. En cada gráfico se ha dibujado una línea continua en el nivel de TNF de 2 ng/ml con fines orientativos. En el grupo no tratado, los niveles de huTNF en suero fueron bajos, 0,1 y 0,2 ng/mL a las 5 y 10 semanas, respectivamente. La administración semanal de los agentes anti-TNF dio como resultado la captura de TNF en el suero. Los niveles de huTNF en suero fueron similares para los ratones tratados con D2E7 o con Remicade. Los niveles medios de huTNF disminuyeron de 2 a 0,1 ng/ml en función de la dosis administrada. Los ratones tratados con Enbrel, por otro lado, tuvieron mucho más huTNF en suero, alcanzando niveles de 20 ng/ml

15 En resumen, la medición del TNF humano mediante el ensayo ELISA de Medgenix, que detecta tanto TNF libre como unido, indica que los agentes anti-TNF estaban capturando el TNF en complejos. Hubo niveles detectables de TNF en el suero de los ratones tratados a diferencia de niveles muy bajos en ratones sin tratar. Curiosamente, el nivel de los complejos de TNF sin eliminar para etanercept fue 10 veces mayor que en los ratones tratados con infliximab o D2E7. La eliminación retardada de TNF con etanercept se ha observado en modelos animales y en estudios clínicos publicados.

20 D. Análisis microscópico de los ratones tratados

25 Tras la semana 10 de tratamiento, todos los ratones se sacrificaron. Se recogieron las extremidades posteriores izquierda y derecha de dos ratones de cada grupo de tratamiento. Las extremidades se fijaron en formalina neutra tamponada al 10% y después se descalcificaron. Se montaron tres secciones consecutivas de cada muestra de la extremidad en portaobjetos y los portaobjetos codificados se enviaron a un patólogo para una evaluación independiente.

30 Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina/eosina. El patólogo puntuó cada portaobjetos con respecto a la gravedad de vascularidad, inflamación, desgaste cartilaginoso y óseo en una escala del 1-4. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2: Valores aproximados de ED₅₀ (mg/kg) de D2E7, Remicade o Enbrel para la prevención de síntomas microscópicos de artritis en ratones Tg197

	ED ₅₀ de D2E7, mg/kg	ED ₅₀ de Remicade, mg/kg	ED ₅₀ de Enbrel, mg/kg
Inflamación	0,1	0,5	0,5
Vascularidad	0,1	0,1	1 <ED ₅₀ < 5
Desgaste cartilaginoso	0,01 <ED ₅₀ <0,1	0,1 <ED ₅₀ <0,5	0,5
Desgaste óseo	0,01 1<ED ₅₀ < 0,1	0,1 <ED ₅₀ <0,5	0,5 <ED ₅₀ < 1

35 Los resultados de este experimento también se muestran en la figura 5. En la figura 5, se examinaron tres portaobjetos de cada extremidad; por lo tanto, se puntuaron 6 portaobjetos por ratón y 12 portaobjetos por cada grupo de tratamiento para valoración histopatológica. Por cada grupo de tratamiento, en el gráfico se indica la media \pm desviación típica de las puntuaciones histopatológicas. La mayoría de las lesiones se asociaron con las articulaciones de los tobillos y todas parecían simétricas (es decir, puntuaciones similares para las extremidades izquierda y derecha para un ratón determinado). La degradación cartilaginosa ocurrió, en la mayoría de los casos, debido a lesiones de desgaste endosteal y fue generalmente menos exhaustiva que la de desgaste óseo. La inflamación fue predominantemente por células mononucleares con pocos PMN, pero con locus PMN no densos.

45 La diferencia entre los tres agentes anti-TNF fue más pronunciada en los síntomas microscópicos de la actividad de la enfermedad en las articulaciones artríticas, que en las manifestaciones externas medidas como puntuaciones artríticas. El desgaste óseo en las articulaciones se suprimió completamente con dosis de 0,5 mg/kg de D2E7. Con objeto de conseguir el mismo efecto fueron necesarias dosis mucho más altas de Remicade o Enbrel, 5 mg/kg. El desgaste cartilaginoso en las articulaciones se suprimió completamente con dosis de 0,1 mg/kg de D2E7. Con objeto de conseguir el mismo efecto fueron necesarias dosis más altas de Remicade, 1 mg/kg, o de Enbrel, 5 mg/kg. La inflamación articular se suprimió completamente con dosis de 0,5 mg/kg de D2E7. Con objeto de conseguir el mismo efecto fueron necesarias dosis más altas de los otros fármacos: 5 mg/kg de Remicade y 10 mg/kg de Enbrel. La vascularidad articular se suprimió completamente con dosis de 0,5 mg/kg de D2E7 o de Remicade. Con objeto de conseguir el mismo efecto fueron necesarias dosis mucho más altas de Enbrel, 5 mg/kg.

55 Hubo una clara diferencia de respuesta a la dosis entre D2E7, infliximab y etanercept en la prevención de lesión articular microscópica. Mientras que D2E7 prevenía completamente el desgaste óseo, la degradación cartilaginosa, la inflamación y la vascularidad con dosis de 0,5-mg/kg, tanto infliximab como etanercept necesitaron una dosis de 1 ó 5 mg/kg para alcanzar niveles similares de eficacia. En resumen, en los ratones transgénicos para TNF humano,

Tg197, D2E7 impidió la poliartritis con más fuerza de la que lo hizo etanercept o infliximab, especialmente a dosis bajas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-TNF α humano que es D2E77, o un anticuerpo anti-TNF α humano con propiedades equivalentes al D2E7, que se disocia del TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o menor y una constante de velocidad de disociación k_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, y que neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 convencional *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menor, para su uso en el tratamiento o alivio de la artritis, en el que el anticuerpo anti-TNF α se administra a una dosis baja de 0,01-0,11 mg/kg, de tal forma que la artritis se trata o alivia.
- 10 2. El anticuerpo anti-TNF α humano, de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o alivio de la artritis reumatoide.
- 15 3. El anticuerpo anti-TNF α humano, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que se alivian los síntomas asociados con la artritis.
- 20 4. El anticuerpo anti-TNF α humano, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que se alivian los síntomas seleccionados del grupo, que consisten en desgaste óseo, desgaste cartilaginoso, inflamación y vascularidad.
- 25 5. El anticuerpo anti-TNF α humano, de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que se trata la artritis aliviando los síntomas seleccionados del grupo que consiste en distorsión articular, inflamación, deformación articular, anquilosis en flexión, y movilidad gravemente disminuida.
- 30 6. El anticuerpo anti-TNF α humano, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo captura TNF α en complejos en un sujeto que padece dicha artritis.
7. El anticuerpo anti-TNF α humano, de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el nivel de TNF α en suero es mayor que el nivel de TNF α en suero en un sujeto que no padece dicha artritis.
8. El anticuerpo anti-TNF α humano de acuerdo con la reivindicación 1, que es D2E7.

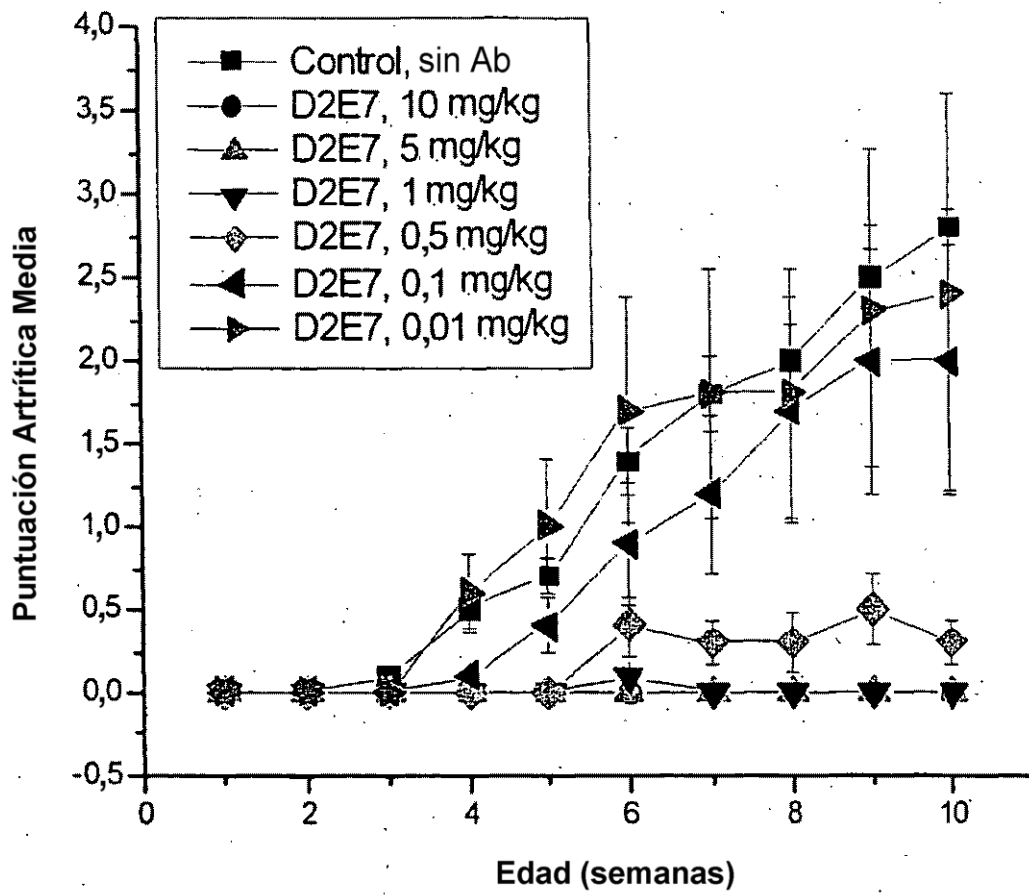


Figura 1

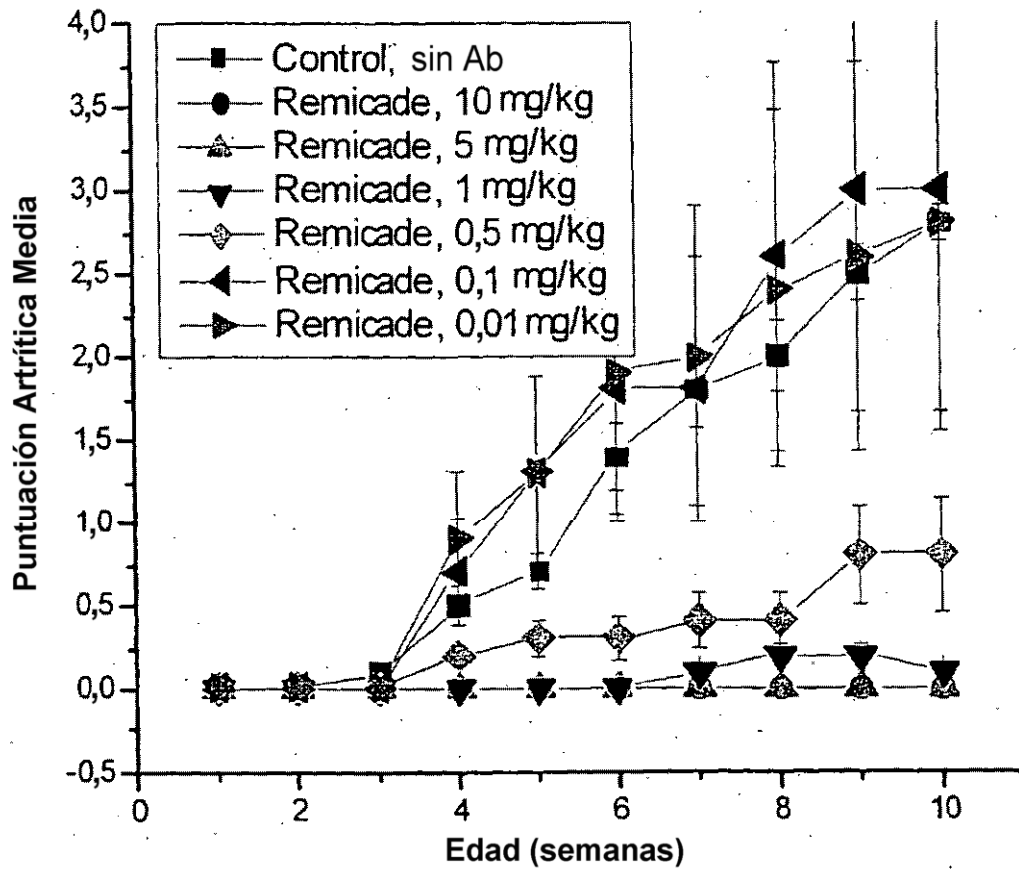


Figura 2

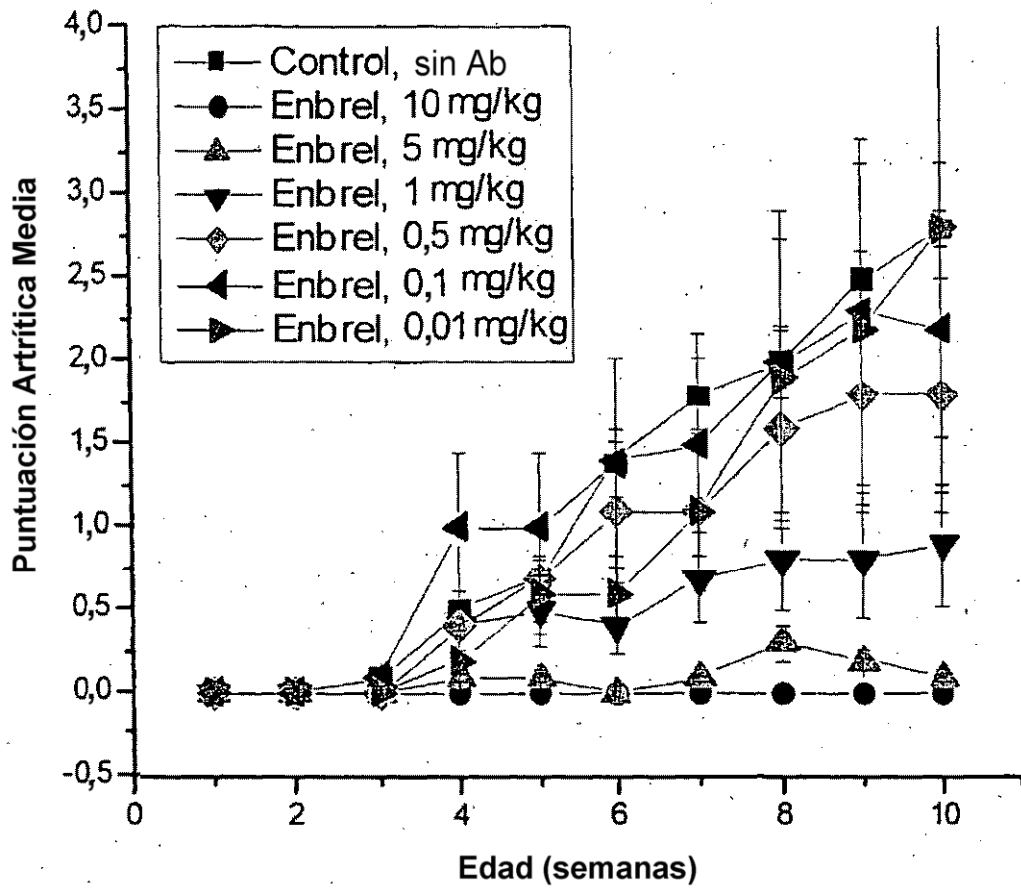
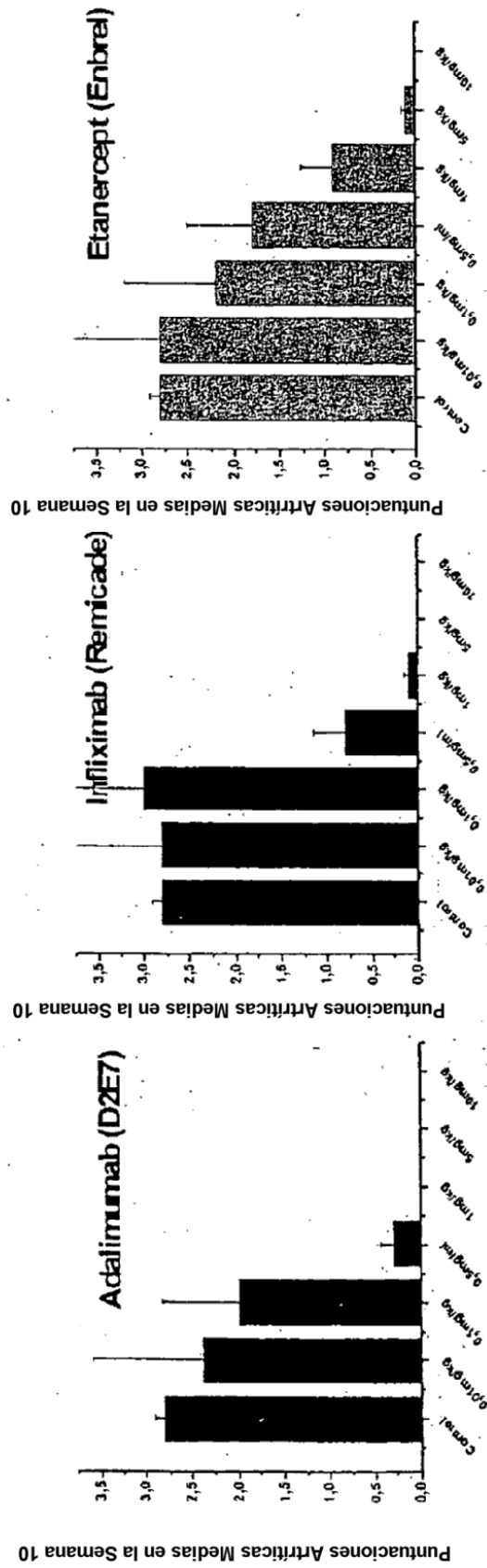


Figura 3

Figura 4



DE₅₀, mg/kg

D2E7 0,1 < DE₅₀ < 0,5

Remicade 0,1 < DE₅₀ < 0,5

Enbrel 0,5 < DE₅₀ < 1

Figura 5

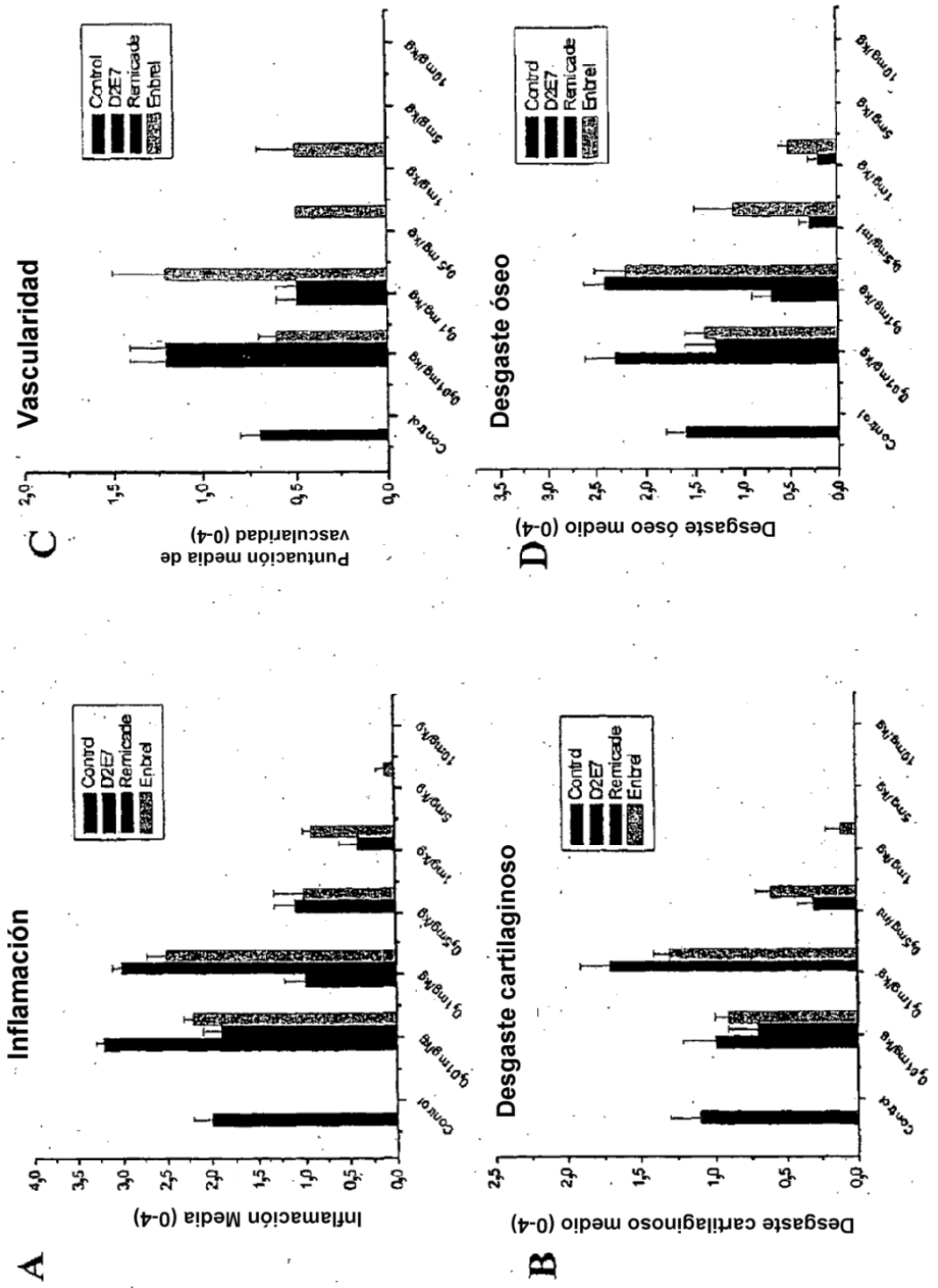


Figura 6

