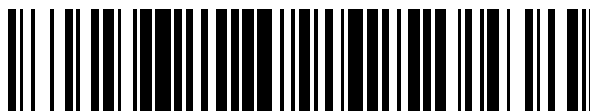


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 244**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08005013 .1**
96 Fecha de presentación: **01.08.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1941904**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **Antagonistas de TNF para uso en terapia coadyuvante de metotrexato en el tratamiento de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:
01.08.1996 US 690775

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2012

73 Titular/es:
**THE MATHILDA AND TERRENCE
KENNEDYINSTITUTE OF RHEUMATOLOGY
TRUST
65 Aspenlea Road
Hammersmith, London W6 8LH, GB**

72 Inventor/es:
**Feldman, Marc y
Maini, Ravinder Nath**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 388 244 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

Antagonistas de TNF para uso en terapia coadyuvante de metotrexato en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Antecedentes de la invención

- 5 Los monocitos y macrófagos secretan las citocinas conocidas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y factor de necrosis tumoral beta (TNF β) en respuesta a endotoxinas u otros estímulos. El TNF α es un homotrímero soluble de subunidades proteicas de 17 kDa (Smith *et al.*, J. Biol. Chem. 262: 6951-6954 (1987)). Existe también una forma precursora de TNF de 26 kDa unida a membrana (Kriegler *et al.*, Cell 53: 45-53 (1988)). Para revisiones del TNF, véanse Beutler *et al.*, Nature 320: 584 (1986); Old, Science 230: 630 (1986); y Le *et al.*, Lab. Invest. 56: 234 (1987).
- 10 Células distintas de monocitos o macrófagos producen también TNF α . Por ejemplo, las estirpes celulares de tumor no monocítico humano producen factor de necrosis tumoral (TNF) (Rubin *et al.*, J. Exp. Med. 164: 1350 (1986); Spriggs *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6563 (1987)). Los linfocitos T de sangre periférica CD4⁺ y CD8⁺ y algunas estirpes de células T y B cultivadas (Cuturi *et al.*, J. Exp. Med. 165: 1581 (1987); Sung *et al.*, J. Exp. Med. 168: 1539 (1988); Turner *et al.*, Eur. J. Immunol. 17: 1807-1814 (1987)) producen también TNF α .
- 15 El TNF causa acciones proinflamatorias que dan como resultado lesión de tejidos, tales como degradación de cartílago y hueso, inducción de moléculas de adhesión, que inducen la actividad procoagulante sobre células endoteliales vasculares (Pober *et al.*, J. Immunol. 136: 1680 (1986)), aumentan la adherencia de neutrófilos y linfocitos (Pober *et al.*, J. Immunol. 138: 3319 (1987)) y estimulan la liberación de factor activador de plaquetas de macrófagos, neutrófilos y células endoteliales vasculares (Camussi *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1390 (1987)).
- 20 Evidencias recientes asocian el TNF con infecciones (Cerami *et al.*, Immunol. Today 9: 28 (1988)), trastornos inmunes, patologías neoplásicas (Oliff *et al.*, Cell 50: 555 (1987)), patologías autoinmunes y patologías de injerto frente a hospedador (Piguet *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1280 (1987)). La asociación del TNF con cáncer y patologías infecciosas está a menudo relacionada con un estado catabólico del hospedador. Los pacientes de cáncer sufren pérdida de peso, asociada habitualmente a la anorexia.
- 25 El agotamiento extendido que está asociado al cáncer y a otras enfermedades es conocido como "caquexia" (Kern *et al.*, J. Parent. Enter. Nutr. 12: 286-298 (1988)). La caquexia incluye pérdida progresiva de peso, anorexia y erosión persistente de la masa corporal en respuesta a un crecimiento maligno. El trastorno fisiológico fundamental puede relacionarse con una reducción de la ingesta de alimento respecto al gasto de energía. El estado caquético causa la mayoría de la morbilidad y mortalidad por cáncer. El TNF puede mediar la caquexia en cáncer, patologías infecciosas y otros estados catabólicos.
- 30 El TNF desempeña también un papel fundamental en la sepsis gram-negativa y en el shock endotóxico (Michie *et al.*, Br. J. Surg. 76: 670-671 (1989); Debets *et al.*, Second Vienna Shock Forum, pág. 463-466 (1989); Simpson *et al.*, Crit. Care Clin. 5: 27-47 (1989)), incluyendo fiebre, malestar, anorexia y caquexia. La endotoxina activa fuertemente la producción de monocito/macrófago y la secreción de TNF y otras citocinas (Kornbluth *et al.*, J. Immunol. 137: 2585-2591 (1986)). El TNF y otras citocinas derivadas de monocitos median las respuestas metabólicas y neurohormonales ante la endotoxina (Michie *et al.*, New Engl. J. Med. 318: 1481-1486 (1988)). La administración de endotoxina a voluntarios humanos produce una enfermedad aguda con síntomas similares a la gripe, incluyendo fiebre, taquicardia, tasa metabólica aumentada y liberación de hormona del estrés (Revhaug *et al.*, Arch. Surg. 123: 162-170 (1988)). El TNF en circulación aumenta en pacientes que sufren sepsis gram-negativa (Waage *et al.*, Lancet 1: 355-357 (1987); Hammerle *et al.*, Second Vienna Shock Forum, pág. 715-718 (1989); Debets *et al.*, Crit. Care Med. 17: 489-497 (1989); Calandra *et al.*, J. Infect. Dis. 161: 982-987 (1990)).
- 35 Por tanto, el TNF α se ha implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, bacterianas y parasíticas, malignidades y/o enfermedades neurodegenerativas, y es una diana útil para terapia biológica específica en enfermedades tales como artritis reumatoide y enfermedad de Crohn. Se han reseñado efectos beneficiosos en ensayos de etiqueta abierta con un anticuerpo monoclonal quimérico ante TNF α (cA2), con supresión de la inflamación (Elliott *et al.*, Arthritis Rheum. 36: 1681-1690 (1993); Elliott *et al.*, Lancet 344: 1125-1127 (1994)). Véase también Van Dulleman *et al.*, Gastroenterology 109: 129-135 (1995). Se han reseñado también resultados beneficiosos en un ensayo aleatorizado doble ciego controlado por placebo con cA2, con supresión de la inflamación (Elliott *et al.*, Lancet 344: 1105-1110 (1994)).
- 45 WO95/09652 describe un método de tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias en un mamífero usando una combinación de un agente que inhibe células T CD4⁺ y un antagonista del factor de necrosis tumoral. Se puede administrar el agente anti-reumático metotrexato conjuntamente con el agente que inhibe células T CD4⁺ y/o el antagonista de TNF. El antagonista de TNF puede ser, entre otros, un anticuerpo anti-TNF o un receptor de TNF soluble. No se describe ni sugiere el uso de un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o un receptor de TNF
- 50 soluble en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática en terapia coadyuvante de terapia metotrexato.

Maini *et al.* (Instituto Kennedy de Reumatología, 29º Informe Científico, 1995) informa de un estudio que examina la seguridad y eficacia, en la artritis reumatoide, de la dosificación repetida con el anticuerpo monoclonal anti-TNF cA2 en combinación con, o comparado con, el fármaco anti-reumático por excelencia, el metotrexato. Este informe no

proporciona los resultados del estudio ni describe efecto terapéutico alguno. Tampoco sugiere que el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral se use en terapia coadyuvante de terapia metotrexato.

5 Bologna et al., La Presse medicale, Vol 25, n° 19, Junio 1996, informa sobre usos de regímenes de combinación para la artritis reumatoide. Se hace referencia a estudios llevados a cabo usando diferentes combinaciones de DMARDs tales como azatioprina, hidroxicloroquina, metotrexato, salazopirina. Los autores concluyen que no ha
10 quedado demostrado que estas combinaciones proporcionen algún beneficio apreciable a nivel clínico, y añaden que todavía quedan por estudiar muchas posibles combinaciones, por ejemplo la combinación de metotrexato con otros fármacos objetivo tales como los anticuerpos monoclonales anti-TNF α y anti-CD4 o el receptor de TNF α soluble. No hay sugerencia sobre el uso de anticuerpos anti-TNF α o receptor de TNF α soluble en terapia coadyuvante de terapia metotrexato en el tratamiento de la artritis reumatoide.

15 Fenner et al., Arthritis & Rheumatism, Vol. 38, n°9 (suppl.) 1995, pág. S266, Abstract 679, describen una monoterapia secuencial de la artritis reumatoide en estudios clínicos. Los pacientes reciben primero metotrexato, que se retira antes de la administración de una molécula de fusión receptor de TNF-IgG. Seguidamente, se reintroduce el metotrexato. No se describe la administración de un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un anticuerpo anti-TNF, en terapia coadyuvante con metotrexato.

WO92/16553 describe anticuerpos monoclonales frente a TNF alfa. Se sugiere que tales anticuerpos monoclonales se pueden conjugar con tipos adicionales de restos terapéuticos. No se describe ni sugiere la administración de un anticuerpo anti-TNF o un receptor de factor de necrosis tumoral soluble en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil o artritis psoriática en terapia coadyuvante de terapia metotrexato.

20 El documento WO96/33204, publicado el 24 de octubre de 1996, se refiere a un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad mediada por TNF, que comprende administrar al individuo múltiples dosis de un anticuerpo anti-TNF. Los anticuerpos anti-TNF pueden estar conjugados con un agente citotóxico, incluyendo daunorrubicina, doxorubicina, metotrexato y Mitomicina C, para terapia in vivo. Las patologías relacionadas con TNF incluyen entre otras, artritis reumatoide. No hay descripción del uso de un conjugado del anticuerpo anti-TNF para el tratamiento de artritis reumatoide, en particular, no se describe un anticuerpo conjugado con MTX en el
25 tratamiento de esta enfermedad concreta; y, en consecuencia, no se describe un efecto terapéutico usando tal conjugado hipotético. WO96/33204 no describe el uso de un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o un receptor de factor de necrosis tumoral soluble en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática en terapia coadyuvante de terapia metotrexato.

30 Moreland et al., Journal of Rheumatology 1996, Vol. 23, suplemento 44, págs. 78-83), analizan los resultados de unos estudios clínicos que combinan metotrexato (MTX) con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 en el tratamiento de artritis reumatoide (AR). En particular, se hace referencia a estudios en fase I y fase II en donde pacientes que ya estaban recibiendo MTX como tratamiento de base fueron tratados con un anticuerpo monoclonal anti-CD4. Las respuestas clínicas en pacientes que recibían tratamiento anti-CD4 y tratamiento MTX resultaron ser iguales que las
35 observadas en pacientes que tomaban placebo y MTX. Los autores concluyen que este tratamiento combinado no está asociado a eficacia. Moreland et al. sugieren que podrían diseñarse estudios usando combinaciones de DMARD tradicionales tales como MTX, u otros DMARD, con agentes biológicos tales como anti-TNF α , o con proteínas de fusión con receptor TNF soluble, pero advierte que hay que tener en cuenta que tales combinaciones pueden aumentar el riesgo de efectos adversos preocupantes. No se describe ni sugiere el uso de anticuerpos monoclonales anti-TNF α o un receptor de factor de necrosis tumoral soluble en terapia coadyuvante con MTX en el
40 tratamiento de la AR.

45 Elliott (International Journal of Immunopharmacology, 1995, vol 17 (2), págs. 141-145, analizan un artículo que resume los resultados de tres estudios clínicos que usaban el anticuerpo anti-TNF cA2 como monoterapia en el tratamiento de la artritis reumatoide. Cualquier terapia DMARD había sido retirada al menos 4 semanas antes de entrar el estudio. Se demuestra supresión de corta duración de la enfermedad reumatoide. Los autores sugieren que cA2 puede ser útil en el control de la enfermedad mientras empiezan a hacer efecto los DMARD. No se describe ni sugiere el uso de anticuerpos monoclonales anti-TNF α o un receptor de factor de necrosis tumoral soluble en terapia coadyuvante con TMX en el tratamiento de AR.

50 Sander et al., Arthritis & Rheumatism, Vol. 38, n°9 (suppl.) 1995, pág. S266, Abstract 678, describen una terapia combinada de la artritis reumatoide, que implica el tratamiento intermitente con metotrexato y el bloqueo de TNF. La terapia de larga duración con metotrexato se interrumpe durante un periodo de eliminación del fármaco de 28 días, y después se administra un agente bloqueante de TNF durante 6 a 12 meses. Durante este tiempo, el paciente no recibe metotrexato. Finalmente, se corta el tratamiento con el agente bloqueante de TNF, y se reinstaura la terapia con metotrexato. No se describe el uso de anticuerpos anti-TNF o un receptor de factor de necrosis tumoral soluble
55 en terapia coadyuvante con terapia metotrexato para el tratamiento de AR.

WO94/08619 se refiere a combinaciones de anticuerpos CD4 y antagonistas de TNF tales como el anticuerpo anti-TNF humano en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias, incluyendo entre otras la artritis reumatoide. Se sugiere que otros fármacos antiinflamatorios tales como el metotrexato o la ciclosporina A se pueden administrar conjuntamente con el anticuerpo anti-CD4 o el anticuerpo anti-TNF. No se describe el uso de un antagonista de TNF conjuntamente con metotrexato para el tratamiento de la artritis reumatoide y consecuentemente
60 no se describe un efecto terapéutico usando dicha combinación hipotética. WO94/08619 no describe ni sugiere el

uso de un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o un receptor de factor de necrosis tumoral soluble en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil o artritis psoriática en terapia coadyuvante con terapia metotrexato.

5 Webster's Third New International Dictionary of the English Language Unabridged, Gove Philip Babcock (Ed.) Könemann, Cologne, 1961, recoge el término "adjunct", referido aquí en español como "coadyuvante" como "algo añadido o unido como objeto o circunstancia acompañante; añadido o acompañante en una capacidad subordinada" y "adjunctive therapy", en español "terapia coadyuvante" como "aquella que implica el uso médico de un coadyuvante".

10 El glosario on-line Phoenix5 (accesible en: http://www.phoenix5.org/glossary/adjunctive_therapy.html) define "adjunctive therapy" (en español, terapia coadyuvante) como "Tratamiento usado junto con el tratamiento principal. Su fin es colaborar con el tratamiento principal."

Sumario de la invención

15 La presente invención se basa en el descubrimiento de que el tratamiento de pacientes afectados por una enfermedad mediada por TNF con un antagonista de factor de necrosis tumoral, tal como un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, como terapia coadyuvante de terapia con metotrexato produce una reducción rápida y sostenida de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad. La presente invención también se basa en el descubrimiento inesperado y espectacular de que un régimen de dosis múltiples de un antagonista de factor de necrosis tumoral, tal como un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, cuando se administra coadyuvantemente con metotrexato a un individuo que sufre una enfermedad mediada por TNF, produce una respuesta clínica altamente beneficiosa o sinérgica durante un tiempo significativamente más largo comparado con la obtenida con un régimen de dosis única o múltiple del antagonista administrado en solitario o con la obtenida con el metotrexato administrado en solitario. Como resultado de la invención de la solicitante, se proporciona en la presente memoria un antagonista de factor de necrosis tumoral, para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral está indicado para su administración como terapia coadyuvante de la terapia metotrexato, y en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral es

- 25 i) un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral, o
- ii) un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.

30 En una realización particular, se administra metotrexato en forma de una serie de dosis bajas separadas por intervalos de días o semanas.

Además de anticuerpos anti-TNF, los antagonistas de TNF incluyen anticuerpos anti-TNF y moléculas receptoras que se unen específicamente a TNF.

Breve descripción de los dibujos

35 Las Figuras 1A-1C son un conjunto de tres gráficas que muestran los resultados frente al tiempo para el recuento de articulaciones inflamadas en pacientes de artritis reumatoide (AR) que reciben tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato. Los resultados para el grupo placebo (metotrexato solo) se muestran con el grupo de 1 mg/kg. El número de pacientes con datos en cada visita de evaluación se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Círculo blanco: - metotrexato (MTX-), círculo negro= + metotrexato (MTX+), cuadrado= placebo.

40 Las Figuras 2A-2C son un conjunto de tres gráficas que muestran los resultados frente al tiempo para el recuento de articulaciones sensibles en pacientes de artritis reumatoide (AR) que reciben tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato. Los resultados para el grupo placebo (metotrexato solo) se muestran con el grupo de 1 mg/kg. El número de pacientes con datos en cada visita de evaluación se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Círculo blanco: - metotrexato (MTX-), círculo negro= + metotrexato (MTX+), cuadrado= placebo.

45 Las Figuras 3A-3C son un conjunto de tres gráficas que muestran los resultados frente al tiempo de la valoración global de la enfermedad por el médico en pacientes con AR que reciben tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato. Los resultados para el grupo placebo (metotrexato solo) se muestran con el grupo de 1 mg/kg. El número de pacientes con datos en cada visita de evaluación se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Círculo blanco: - metotrexato (MTX-), círculo negro= + metotrexato (MTX+), cuadrado= placebo.

50 Las Figuras 4A-4C son un conjunto de tres gráficas que muestran los resultados frente al tiempo de la valoración de la enfermedad por el paciente en pacientes con AR que reciben tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato. Los resultados para el grupo placebo (metotrexato solo) se muestran con el grupo de 1 mg/kg. El número de pacientes con datos en cada visita de evaluación se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Círculo blanco: - metotrexato (MTX-), círculo negro= + metotrexato (MTX+), cuadrado= placebo.

55 Las Figuras 5A-5C son un conjunto de tres gráficas que muestran los resultados frente al tiempo de la concentración de proteína C reactiva (PCR) en pacientes con AR que reciben tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato. Los resultados para el grupo placebo (metotrexato solo) se muestran con el grupo de 1

mg/kg. El número de pacientes con datos en cada visita de evaluación se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Círculo blanco: - metotrexato (MTX-), círculo negro= + metotrexato (MTX+), cuadrado= placebo.

5 Las Figuras 6A-6C son un conjunto de tres gráficas que muestran los resultados frente al tiempo del cuestionario de evaluación de la salud (CES) en pacientes con AR que reciben tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato. Los resultados para el grupo placebo (metotrexato solo) se muestran con el grupo de 1 mg/kg. El número de pacientes con datos en cada visita de evaluación se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Círculo blanco: - metotrexato (MTX-), círculo negro= + metotrexato (MTX+), cuadrado= placebo.

10 Las Figuras 7A-7F son un conjunto de seis gráficas que muestran la concentración sérica de cA2 en cada paciente de AR que recibe tratamiento con cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) con o sin metotrexato, representado frente al tiempo. Los datos representados son las concentraciones séricas de cA2 obtenidas justo antes de la administración de cA2 en las semanas 2, 6, 10 y 14 y después en las semanas 18 y 26. Las escalas para la concentración sérica de cA2 se condensan con las dosis mayores de cA2.

15 Las Figuras 8A y 8B son un conjunto de dos gráficas que muestran la concentración sérica mediana de cA2 frente al tiempo en pacientes con AR que reciben 3 mg/kg de cA2 (panel superior) o 10 mg/kg de cA2 (panel inferior) con o sin metotrexato. Cuadrado= +metotrexato, círculo o triángulo= -metotrexato.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere al descubrimiento de que los antagonistas de factor de necrosis tumoral pueden administrarse a pacientes que sufren una enfermedad mediada por TNF como terapia coadyuvante de la terapia con metotrexato, con un alivio de bueno a excelente de los signos y síntomas de la enfermedad. La presente invención se refiere también al descubrimiento de que los antagonistas de factor de necrosis tumoral pueden administrarse a pacientes que sufren una enfermedad mediada por TNF en dosis múltiples y como terapia coadyuvante de la terapia con metotrexato, con una mejora significativa en la duración de la respuesta clínica.

25 Como resultado de la invención de la solicitante, se proporciona en la presente memoria un antagonista de factor de necrosis tumoral, para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral está indicado para su administración como terapia coadyuvante con terapia metotrexato, y en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral es

- 30 i) un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral, o
- ii) un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.

35 El antagonista de TNF y metotrexato pueden administrarse simultánea o secuencialmente. El antagonista de TNF y metotrexato pueden administrarse cada uno en dosis únicas o múltiples. Pueden coadministrarse múltiples antagonistas de TNF con metotrexato. Pueden utilizarse otros regímenes y agentes terapéuticos en combinación con la coadministración terapéutica de antagonistas de TNF y metotrexato u otros fármacos que suprimen el sistema inmune.

Como se utiliza en la presente memoria, una "enfermedad mediada por TNF" designa una patología o enfermedad relacionada con TNF que es artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática.

Véase, por ejemplo, Berkow *et al.*, Eds., The Merck Manual, 16ª edición, capítulo 11, pág. 1380-1529, Merck and Co., Rahway, Nueva Jersey, 1992.

40 Los términos "recurrencia", "exacerbación" o "recaída" se definen para abarcar la reaparición de uno o más síntomas del estado patológico. Por ejemplo, en el caso de artritis reumatoide, una recurrencia puede incluir la experiencia de uno o más de articulaciones inflamadas, rigidez matutina o sensibilidad articular.

45 En la presente memoria, se describe un método de tratamiento de artritis reumatoide en un individuo, que comprende coadministrar metotrexato y un antagonista de TNF al individuo en cantidades terapéuticamente eficaces.

50 Los beneficios de la terapia de combinación con metotrexato y antagonistas de TNF de acuerdo con la invención reivindicada incluyen altas tasas de respuesta clínica durante periodos significativamente más largos en comparación con la obtenida con el tratamiento con cada modalidad terapéutica separadamente. Además, el metotrexato reduce significativamente la inmunogenicidad de los anticuerpos anti-TNF, permitiendo así la administración de múltiples dosificaciones de anticuerpos anti-TNF con seguridad potenciada. Los resultados descritos en la presente memoria sugieren que puede utilizarse metotrexato para reducir la inmunogenicidad de otros anticuerpos o proteínas.

55 En la presente memoria, también se describen composiciones que comprenden metotrexato y un antagonista de TNF. Las composiciones son útiles para tratar un sujeto que tiene una patología o afección asociada a niveles anormales de una sustancia reactiva con un antagonista de TNF, en particular TNF en exceso o menor que los niveles presentes en un sujeto sano normal, cuando dichos niveles en exceso o reducidos aparecen en un tipo de tejido o localización sistémica, localizada o particular en el cuerpo. Dichos tipos de tejido pueden incluir, pero sin

limitación, sangre, linfa, sistema nervioso central (SNC), hígado, riñón, bazo, músculo cardiaco o vasos sanguíneos, materia blanca o materia gris cerebral o de médula espinal, cartilago, ligamentos, tendones, pulmón, páncreas, ovario, testículos, próstata. Pueden localizarse también concentraciones de TNF aumentadas o reducidas respecto a los niveles normales en regiones o células específicas en el cuerpo, tales como articulaciones, conexiones nervio-vaso sanguíneo, huesos, tendones o ligamentos específicos o sitios de infección, tales como infecciones bacterianas o virales.

Antagonistas de factor de necrosis tumoral.

Como se utiliza en la presente memoria, un "antagonista de factor de necrosis tumoral" reduce, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad TNF *in vivo* y es un anticuerpo anti-TNF o una molécula receptora que se une específicamente a TNF. Un antagonista de TNF adecuado puede prevenir o inhibir también la señalización de receptor de TNF.

Anticuerpos anti-TNF.

Como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral" reduce, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad TNF *in vivo*. Los anticuerpos anti-TNF útiles en los métodos y composiciones de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados, de superficie modificada y recombinantes y fragmentos de los mismos, que se caracterizan por alta afinidad de unión a TNF y baja toxicidad (incluyendo respuesta de anticuerpo humano anti-múrido (HAMA) y/o anticuerpo humano anti-quimérico (HACA)). En particular, un anticuerpo en el que los componentes individuales tales como la región variable, la región constante y estructural posean individual y/o colectivamente una baja inmunogenicidad, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que pueden utilizarse en la invención se caracterizan por su capacidad de tratar pacientes durante periodos extensos con un alivio de bueno a excelente de los síntomas y baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos.

Es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad útil en los métodos y composiciones de la presente invención el anticuerpo monoclonal de múrido (mAb) A2 y los anticuerpos que inhiban competitivamente *in vivo* la unión a TNF α humano de mAb A2 de múrido anti-TNF α , o un anticuerpo que tenga sustancialmente las mismas características de unión específicas, así como fragmentos y regiones de los mismos. Se describe el anticuerpo monoclonal de múrido A2, y derivados quiméricos del mismo tales como cA2, en la patente de EE.UU. n° 6,284,471 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,656,272 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,919,452 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5.698.195 (solicitada el 18 de octubre de 1994) y Le J. *et al.*, publicación internacional n° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992). Es un segundo ejemplo de anticuerpo monoclonal de alta afinidad útil en los métodos y composiciones de la presente invención el mAb de múrido 195 y anticuerpos que inhiban competitivamente *in vivo* la unión a TNF α humano de anti-TNF α de múrido 195, o un anticuerpo que tenga sustancialmente las mismas características de unión específica, así como fragmentos y regiones del mismo. Otros anticuerpos monoclonales de alta afinidad útiles en los métodos y composiciones de la presente invención incluyen mAb de múrido 114 y mAb de múrido 199 y anticuerpos que inhiban competitivamente *in vivo* la unión a TNF α humano de mAb de múrido 114 o mAb de múrido 199 anti-TNF, o un anticuerpo que tenga sustancialmente las mismas características de unión específica que mAb 114 o mAb 199, así como fragmentos y regiones del mismo. Los anticuerpos monoclonales de múrido 114, 195 y 199 y el método para producirlos se describen por Möller A. *et al.* (Cytokine 2(3): 162-169 (1990)). Los métodos preferidos para determinar la especificidad y afinidad de mAb mediante inhibición competitiva pueden encontrarse en Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988); Colligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, Nueva York (1992, 1993); Kozbor *et al.*, Immunol. Today 4: 72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York (1987, 1992, 1993); y Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983).

Se describen en la técnica ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales anti-TNF que pueden utilizarse en la presente invención (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5,656,272 (solicitada el 11 de septiembre de 1992), Rathjen *et al.*, publicación internacional n° WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991); Rubin *et al.*, publicación de patente OEP 0218868 (publicada el 22 de abril de 1987); Yone *et al.*, publicación de patente OEP 0288088 (26 de octubre de 1988); Liang *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137: 847-854 (1986); Meager *et al.*, Hybridoma 6: 305-311 (1987); Fendly *et al.*, Hybridoma 6: 359-369 (1987); Bringman *et al.*, Hybridoma 6: 489-507 (1987); Hirai *et al.*, J. Immunol. Meth. 96: 57-62 (1987); Moller *et al.*, Cytokine 2: 162-169 (1990).

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina caracterizadas por dos o más segmentos o porciones derivados de diferentes especies animales. Generalmente, la región variable del anticuerpo quimérico deriva de un anticuerpo mamífero no humano, tal como un mAb de múrido, y la región constante de inmunoglobulina deriva de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, se selecciona una región variable con baja inmunogenicidad y se combina con una región constante humana que tiene también baja inmunogenicidad, teniendo también preferiblemente la combinación baja inmunogenicidad. Se define la "baja" inmunogenicidad en la presente memoria por elevar significativamente las respuestas HACA o HAMA en menos de aproximadamente 75%, o preferiblemente menos de aproximadamente 50% de los pacientes tratados y/o producir bajas titulaciones en el paciente tratado (menos de aproximadamente 300, preferiblemente menos de aproximadamente 100, medidas con un inmunoensayo enzimático de doble antígeno) (Elliott *et al.*, Lancet 344: 1125-1127 (1994).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Es un anticuerpo quimérico monovalente un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada mediante puentes disulfuro con una cadena L quimérica. Es un anticuerpo quimérico divalente un tetrámero (H2L2) formado por dos dímeros HL asociados mediante al menos un puente disulfuro. Puede producirse también un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región CH que agrega (por ejemplo de una cadena H de IgM o cadena μ).

Los anticuerpos comprenden cadenas de inmunoglobulina pesada (H) y/o ligera (L) individuales. Una cadena H quimérica comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico de TNF, que está ligada al menos a una porción de una región C de cadena H humana (CH), tal como CH1 o CH2. Una cadena L quimérica comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico de TNF, ligada al menos a una porción de una región C de cadena L humana (CL).

Se han descrito en la técnica anticuerpos quiméricos y métodos para su producción (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne *et al.*, Nature 312: 643-646 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi *et al.*, solicitud de patente europea n° 171496 (publicada el 19 de febrero de 1985); Morrison *et al.*, solicitud de patente europea n° 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Neuberger *et al.*, solicitud PCT n° WO 86/01533 (publicada el 13 de marzo de 1986); Kudo *et al.*, solicitud de patente europea n° 184187 (publicada el 11 de junio de 1986); Morrison *et al.*, solicitud de patente europea n° 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Sahagan *et al.*, J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson *et al.*, publicación internacional n° PCT/US86/02269 (publicada el 7 de mayo de 1987); Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443 (1987); Sun *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218 (1987); Better *et al.*, Science 240: 1041-1043 (1988); y Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

El anticuerpo quimérico anti-TNF puede comprender, por ejemplo, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, comprendiendo cada una de las cadenas al menos parte de una región constante humana y al menos parte de una región variable (V) de origen no humano que tiene especificidad por el TNF humano, uniéndose dicho anticuerpo con alta afinidad a un epítipo inhibidor y/o neutralizante de TNF humano, tal como el anticuerpo cA2. El anticuerpo incluye también un fragmento o un derivado de dicho anticuerpo, tal como una o más porciones de la cadena de anticuerpo, tal como las regiones constantes o variables de cadena pesada, o las regiones constantes o variables de cadena ligera.

La humanización y modificación de superficie del anticuerpo puede reducir adicionalmente la inmunogenicidad del anticuerpo. Véanse, por ejemplo, Winter (patente de EE.UU. n° 5.225.539 y EP 239.400 B1), Padlan *et al.* (documento EP 519596 A1) y Pedersen *et al.* (documento EP 592.106 A1).

Los anticuerpos preferidos útiles en los métodos y composiciones de la presente invención son anticuerpos anti-TNF quiméricos humano-múrido de alta afinidad y fragmentos o regiones de los mismos, que tienen potente actividad inhibidora y/o neutralizante *in vivo* contra TNF α humano. Dichos anticuerpos y anticuerpos quiméricos pueden incluir los generados mediante inmunización utilizando TNF α recombinante purificado o fragmentos peptídicos del mismo que comprenden uno o más epítipos.

Es un ejemplo de dicho anticuerpo quimérico cA2 y anticuerpos que inhiban competitivamente *in vivo* la unión a TNF α humano de mAb A2 de múrido anti-TNF α , mAb cA2 quimérico, o un anticuerpo que tenga sustancialmente las mismas características de unión específica, así como fragmentos y regiones de los mismos. El mAb cA2 quimérico se ha descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6,284,471 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,656,272 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,919,452 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,698,195 (solicitada el 18 de octubre de 1994), y por Le J. *et al.* (publicación internacional n° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992); Knight, D.M. *et al.*, (Mol. Immunol. 30: 1443-1453 (1993)); y Siegel, S.A. *et al.*, (Cytokine 7(1): 15-25, (1995)).

El anti-TNF A2 quimérico consiste en la región variable de unión a antígeno del anticuerpo IgG1 de ratón anti-TNF humano neutralizante de alta afinidad, designado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina kappa de IgG1 humana. La región Fc de IgG1 humana mejora la función efectora de anticuerpo alogénico, aumenta la semivida sérica en circulación y reduce la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y la especificidad de epítipo del A2 quimérico derivan de la región variable del A2 de múrido. El A2 quimérico neutraliza el efecto citotóxico tanto de TNF humano natural como recombinante de manera dependiente de la dosis. A partir de los ensayos de unión de cA2 y TNF humano recombinante, se calculó que la constante de afinidad de cA2 era $1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Pueden encontrarse los métodos preferidos para determinar la especificidad y afinidad de mAb mediante inhibición competitiva en Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Colligan *et al.*, eds., "Current Protocols in Immunology", Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, Nueva York (1992, 1993); Kozbor *et al.*, Immunol. Today 4: 72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Intersciences, Nueva York (1987, 1992, 1993); y Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983).

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región de unión a antígeno" designa aquella porción de una molécula de anticuerpo que contiene los residuos aminoacídicos que interaccionan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La región de anticuerpo incluye los residuos aminoacídicos "estructurales" necesarios para mantener la conformación apropiada de los residuos de unión a antígeno.

5 Generalmente, la región de unión a antígeno será de origen m¿rido. En otras realizaciones, la región de unión a antígeno puede derivar e otras especies animales, tales como oveja, conejo, rata o h¿mster. Las fuentes preferidas para codificaci3n de ADN de dicho anticuerpo no humano incluyen estirpes celulares que producen anticuerpo, preferiblemente estirpes celulares h¿bridas conocidas habitualmente como hibridomas. En una realizaci3n, es un hibridoma preferido la estirpe celular de hibridoma A2.

Un "antígeno" es una molécula o una porci3n de molécula capaz de unirse a un anticuerpo que es adicionalmente capaz de inducir a un animal a producir anticuerpo capaz de unirse selectivamente a un epítopo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítopo.

10 El término "epítopo" pretende indicar aquella porci3n del antígeno capaz de ser reconocida por y unirse a un anticuerpo en una o más de las regiones de unión a antígeno del anticuerpo. Los epítopos consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por "epítopo inhibidor y/o neutralizante" se pretende un epítopo que, cuando se une a un anticuerpo, da como resultado la pérdida de actividad biológica de la molécula que contiene el epítopo *in vivo* o *in vitro*, más
15 preferiblemente *in vivo*, incluyendo la uni3n de TNF a un receptor de TNF. Los epítopos de TNF se han identificado en los aminoácidos 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 56 a aproximadamente 77, aproximadamente 108 a aproximadamente 127 y aproximadamente 138 a aproximadamente 149. Preferiblemente, el anticuerpo se une a un epítopo que comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos de TNF en los residuos de TNF de
20 aproximadamente 87 a aproximadamente 107, aproximadamente 59 a aproximadamente 80 o una combinaci3n de los mismos. Generalmente, los epítopos incluyen al menos aproximadamente 5 aminoácidos y menos de aproximadamente 22 aminoácidos abarcados o superpuestos en una o más de estas regiones.

Por ejemplo, los epítopos de TNF que son reconocidos por y/o se unen con actividad anti-TNF a un anticuerpo, y fragmentos y regiones variables de los mismos, incluyen:

59-80:

25 Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-
Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-
Thr-Ile (SEC ID N° 1); y/o

87-108:

30 Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-
Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-
Glu-Gly (SEC ID N° 2).

Los anticuerpos anti-TNF, y fragmentos y regiones variables de los mismos, que son reconocidos por y/o se unen con actividad anti-TNF a estos epítopos bloquean la acci3n del TNF α sin unirse al supuesto locus de uni3n de receptor presentado por Eck y Sprang (J. Biol. Chem. 264 (29): 17595-17605 (1989) (aminoácidos 11-13, 37-42, 49-57 y 155-157 de hTNF α). Rathjen *et al.*, publicaci3n internacional n° WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991), incorporada a la presente memoria como referencia, dan a conocer ligandos de THF que pueden unirse a epítopos adicionales de TNF.

Producci3n de anticuerpos utilizando hibridomas.

40 Son bien conocidas en la ténica las ténicas de producci3n de anticuerpos frente a secuencias peptídicas pequeñas que reconocen y se unen a esas secuencias en forma libre o conjugada o cuando se presentan como una secuencia nativa en el contexto de una proteína grande. Dichos anticuerpos pueden producirse mediante ténicas de hibridoma o recombinantes conocidas en la ténica.

45 Se han descrito también anticuerpos de m¿rido que pueden utilizarse en la preparaci3n de anticuerpos útiles en los métodos y composiciones de la presente invenci3n en Rubin *et al.*, documento EP 0218868 (publicado el 21 de abril de 1987); Yone *et al.*, documento EP 0288088 (publicado el 26 de octubre de 1988); Liang *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 137: 847-854 (1986); Meager *et al.*, Hybridoma 6: 305-311 (1987); Fendly *et al.*, Hybridoma 6: 359-369 (1987); Bringman, *et al.*, Hybridoma 6: 489-507 (1987); Hirai *et al.*, J. Immunol. Meth. 96: 57-62 (1987); Möller *et al.*, Cytokine 2: 162-169 (1990).

50 Las fusiones celulares se consiguen mediante procedimientos estándar bien conocidos por los expertos en el campo de la inmunología. Las estirpes celulares asociadas de fusi3n y los métodos para fusionar y seleccionar hibridomas y examinar los mAb son bien conocidos en la ténica. Véanse, por ejemplo, Ausubel, *infra*, Harlow *infra* y Colligan *infra*.

55 El mAb de m¿rido específico de TNF α útil en los métodos y composiciones de la presente invenci3n puede producirse en grandes cantidades inyectando células de hibridoma o transfectoma que secretan al anticuerpo en la cavidad peritoneal de ratones y, después de un tiempo apropiado, recogiendo el fluido ascítico que contiene una alta titulaci3n del mAb, y aislando el mAb del mismo. Para dicha producci3n *in vivo* del mAb con un hibridoma (por

ejemplo de rata o humano), las células de hibridoma se hacen crecer preferiblemente en ratones desnudos irradiados o atímicos. Como alternativa, los anticuerpos pueden producirse cultivando células de hibridoma o transfectoma *in vitro* y aislando el mAb secretado del medio de cultivo celular o recombinantemente en células eucarióticas o procarióticas.

5 En una realización, el anticuerpo utilizado en los métodos y composiciones de la presente invención es un mAb que se une a aminoácidos de un epítipo de TNF reconocido por A2, rA2 o cA2, producido por un hibridoma o por un hospedador recombinante. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que reconoce un epítipo reconocido por A2. En aún otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico designado como A2 quimérico (cA2).

10 Como ejemplos de anticuerpos útiles en los métodos y composiciones de la presente invención, el mAb A2 de múrido se produce mediante una estirpe celular designada c134A. El anticuerpo quimérico cA2 se produce por una estirpe celular designada c168A. c168A fue depositado en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, como "Depósito de cultivo seguro (Culture Safe Deposit)".

15 Los "derivados" de los anticuerpos, incluyendo fragmentos, regiones o proteínas codificados por genes truncados o modificados para proporcionar especies moleculares funcionalmente similares a los fragmentos de inmunoglobulina, son también útiles en los métodos y composiciones de la presente invención. Las modificaciones incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias genéticas que codifican proteínas citotóxicas tales como toxinas de planta y bacterianas. Los fragmentos y derivados pueden producirse a partir de células apropiadas, como es conocido en la técnica. Como alternativa, pueden unirse anticuerpos, fragmentos y regiones anti-TNF a proteínas o compuestos citotóxicos *in vitro*, proporcionando anticuerpos citotóxicos anti-TNF que matarían selectivamente células que tengan TNF en su superficie.

20 Los "fragmentos" de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Estos fragmentos se producen a partir de anticuerpos intactos utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

25 Expresión recombinante de anticuerpos anti-TNF.

30 Los anticuerpos recombinantes y/o quiméricos de múrido-humano o humano-humano que inhiben TNF pueden producirse utilizando técnicas conocidas basadas en las enseñanzas proporcionadas en la patente de EE.UU. n° 6,284,471 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,656,272 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,919,452 (solicitada el 4 de febrero de 1994), la patente de EE.UU. n° 5,698,195 (solicitada el 18 de octubre de 1994), y por Le J. *et al.* (publicación internacional n° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992)). Véanse también, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience, Nueva York (1987, 1992, 1993) y Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989). Véanse también, por ejemplo, Knight, D.M. *et al.*, Mol. Immunol. 30: 1443-1453 (1993) y Siegel, S.A., *et al.*, Cytokine 7 (1): 15-25 (1995).

35 El ADN que codifica un anticuerpo anti-TNF puede ser ADN genómico o ADNc que codifica al menos una de la región constante de cadena pesada (Hc), la región variable de cadena pesada (Hv), la región variable de cadena ligera (Lv) y las región constante de cadena ligera (Lc). Es una alternativa conveniente al uso de fragmentos génicos cromosómicos como fuente de ADN que codifica el segmento de unión a antígeno de región V de múrido, el uso de ADNc para la construcción de genes de inmunoglobulina quimérica, por ejemplo, como reseñan Liu *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439 (1987) y J. Immunology 139: 3521 (1987)). El uso de ADNc requiere que los elementos de expresión génica apropiados para la célula hospedadora se combinen con el gen para conseguir la síntesis de la proteína deseada. El uso de secuencias de ADNc es ventajoso frente a secuencias genómicas (que contienen intrones) porque las secuencias de ADNc pueden expresarse en bacterias u otros hospedadores que carecen de los sistemas de ajuste de ARN apropiados. Se indica un ejemplo de dicha preparación a continuación.

40 Debido a que el código genético está degenerado, puede utilizarse más de un codón para codificar un aminoácido particular. Utilizando el código genético, puede identificarse uno o más oligonucleótidos diferentes, cada uno de los cuales sería capaz de codificar el aminoácido. La probabilidad de que un oligonucleótido particular constituya, de hecho, la secuencia de codificación XXX real puede estimarse considerando las relaciones de apareamiento anormal de bases y la frecuencia con que se utiliza realmente un codón particular (para codificar un aminoácido particular) en células eucarióticas o procarióticas que expresan un anticuerpo anti-TNF o fragmento. Dichas "normas de uso de codón" se dan a conocer por Lathe *et al.*, J. Mol. Biol. 183: 1-12, (1985). Utilizando las "normas de uso de codón" de Lathe, se identifica un solo oligonucleótido, o un conjunto de oligonucleótidos, que contiene la secuencia nucleotídica teórica "más probable" capaz de codificar secuencias de región variable o constante anti-TNF.

45 Aunque ocasionalmente una secuencia aminoacídica puede codificarse sólo por un único oligonucleótido, frecuentemente la secuencia aminoacídica puede codificarse por cualquiera de un conjunto de oligonucleótidos similares. De forma importante, mientras que todos los miembros de este conjunto contienen oligonucleótidos que son capaces de codificar el fragmento peptídico y, por tanto, contener potencialmente la misma secuencia oligonucleotídica que el gen que codifica el fragmento peptídico, sólo un miembro del conjunto contiene la secuencia

nucleotídica que es idéntica a la secuencia nucleotídica del gen. Debido a que este miembro está presente en el conjunto, y es capaz de hibridar con ADN incluso en presencia de los otros miembros del conjunto, es posible emplear el conjunto no fraccionado de oligonucleótidos de la misma manera en que se emplearía un oligonucleótido único para clonar el gen que codifica la proteína.

5 El oligonucleótido, o conjunto de oligonucleótidos, que contiene la secuencia teórica "más probable" capaz de codificar un anticuerpo anti-TNF o fragmento que incluye una región variable o constante, se utiliza para identificar la secuencia de un oligonucleótido complementario o conjunto de oligonucleótidos que es capaz de hibridar con la secuencia "más probable", o conjunto de secuencias. Puede emplearse un oligonucleótido que contiene dicha secuencia complementaria como sonda para identificar y aislar la región variable o constante del gen anti-TNF
10 (Sambrook *et al.*, *infra*).

Se identifica (utilizando el procedimiento anteriormente descrito) un oligonucleótido adecuado, o conjunto de oligonucleótidos, que es capaz de codificar un fragmento de la región variable o constante de anti-TNF (o que es complementario de dicho oligonucleótido, o conjunto de oligonucleótidos) y se sintetiza y se hibrida por medios bien conocidos en la técnica frente a ADN o, más preferiblemente, una preparación de ADNc derivada de células que son capaces de expresar anticuerpos anti-TNF o regiones variables o constantes de los mismos. Las moléculas oligonucleotídicas monocatenarias complementarias de las secuencias de codificación de la región anti-TNF variable o constante "más probable" pueden sintetizarse utilizando procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica (Belagaje, *et al.*, J. Biol. Chem. 254: 5765-5780 (1979); Maniatis *et al.*, en: "Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression", Nierlich, *et al.*, eds., Acad. Press, Nueva York (1976); Wu, *et al.*, Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol. 21: 101-141 (1978); Khorana, Science 203: 614-625 (1979)). Adicionalmente, la síntesis de ADN puede conseguirse mediante el uso de sintetizadores automatizados. Se dan a conocer técnicas de hibridación de ácido nucleico por Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989); y por Haynes, *et al.*, en: "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach", IRL Press, Washington, DC (1985). Técnicas tales como, o similares a, las descritas anteriormente han permitido la clonación con éxito de genes de aldehído deshidrogenasa humana (Hsu, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3771-3775 (1985)), fibronectina (Suzuki, *et al.*, Bur. Mol. Biol. Organ. J. 4: 2519-2524 (1985)), el gen receptor de estrógeno humano (Walter, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7889-7893 (1985)), activador de plasminógeno de tipo tejido (Pennica, *et al.*, Nature 301: 214-221 (1983)) y ADN complementario de fosfatasa alcalina de placenta humana (Keun, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8715-8719 (1985)).

30 En un modo de clonación alternativo de un polinucleótido que codifica una región variable o constante de anti-TNF, se prepara una biblioteca de vectores de expresión clonando ADN o, más preferiblemente, ADNc (de una célula capaz de expresar un anticuerpo anti-TNF o región variable o constante) en un vector de expresión. En la biblioteca se examinan después los miembros capaces de expresar una proteína que inhiba competitivamente la unión de un anticuerpo anti-TNF, tal como A2 o cA2, y que tenga una secuencia nucleotídica que sea capaz de codificar polipéptidos que tienen la misma secuencia aminoacídica que anticuerpos anti-TNF o fragmentos de los mismos. En esta realización, se extrae el ADN, o más preferiblemente ADNc, de una célula que es capaz de expresar un anticuerpo anti-TNF o fragmento y se purifica. Se fragmenta el ADNc purificado (mediante corte, digestión con endonucleasa, etc.) para producir una agrupación de fragmentos de ADN o ADNc. Los fragmentos de ADN o ADNc de esta agrupación se clonan después en un vector de expresión para producir una biblioteca genómica de vectores de expresión, cuyos miembros contienen cada uno un fragmento de ADN o ADNc clonado único tal como en una biblioteca de fago lambda, para expresión en células procarióticas (por ejemplo bacterias) o células eucarióticas (por ejemplo células de mamífero, levadura, insecto u hongo). Véanse, por ejemplo, Ausubel, *infra*, Harlow, *infra*, Colligan, *infra*, Nyyssonen *et al.*, Bio/Technology 11: 591-595 (1993); Marks *et al.*, Bio/Technology 11: 1145-1149 (octubre de 1993). Una vez aislado el ácido nucleico que codifica dichas regiones de anti-TNF variables o constantes, el ácido nucleico puede expresarse apropiadamente en una célula hospedadora, junto con otro ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera constante o variable, para proporcionar anticuerpos monoclonales recombinantes que se unen a TNF con actividad inhibidora. Dichos anticuerpos incluyen preferiblemente una región variable anti-TNF de murino o humana que contiene un residuo estructural que tiene residuos determinantes de la complementariedad que son responsables de la unión a antígeno.

50 Los genes humanos que codifican las regiones constantes (C) de los anticuerpos quiméricos, fragmentos y regiones de la presente invención pueden derivar de una biblioteca hepática fetal humana mediante métodos conocidos. Los genes de la región C humana pueden derivar de cualquier célula humana, incluyendo aquellas que expresan y producen inmunoglobulinas humanas. La región CH humana puede derivar de cualquiera de las clases o isotipos conocidos de las cadenas H humanas, incluyendo gamma, μ , α , δ o ϵ , y subtipos de los mismos, tales como G1, G2, G3 y G4. Puesto que el isotipo de cadena H es responsable de las diversas funciones efectoras de un anticuerpo, la elección de la región CH estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación de complemento o actividad en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). Preferiblemente, la región CH deriva de gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3), gamma 4 (IgG4) o μ (IgM). La región CL humana puede derivar del isotipo de cadena L humana, kappa o lambda.

60 Los genes que codifican las regiones C de inmunoglobulina humana se obtienen a partir de células humanas mediante técnicas de clonación estándar (Sambrook, *et al.*, ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) y Ausubel *et al.*, eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience, Nueva York (1987-1993)). Los genes de la región C humana están fácilmente

disponibles a partir de clones conocidos que contienen genes que representan las dos clases de cadenas L, las cinco clases de cadenas H y subclases de las mismas. Los fragmentos de anticuerpo quimérico, tales como F(ab')₂ y Fab, pueden prepararse diseñando un gen de cadena H quimérico que está apropiadamente truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de cadena H de un fragmento F(ab')₂, incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas por un codón de detención traduccional, proporcionando la molécula truncada.

Generalmente, los anticuerpos, fragmentos y regiones de murido, humanos y quiméricos, se producen clonando segmentos de ADN que codifican las regiones de unión a antígeno de cadena H y L de un anticuerpo específico de TNF, y uniendo estos segmentos de ADN a segmentos de ADN que codifican regiones CH y CL, respectivamente, para producir genes que codifican inmunoglobulina de murido, humana o quimérica. Por tanto, en una realización preferida, se crea un gen quimérico fusionado que comprende un primer segmento de ADN que codifica al menos la región de unión a antígeno de origen no humano, tal como una región V redispuesta funcionalmente con el segmento de unión (J), ligado a un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de una región C humana.

Por lo tanto, el ADNc que codifica las regiones V y C del anticuerpo y el método de producción de un anticuerpo quimérico puede implicar diversas etapas, descritas a continuación:

1. aislamiento de ARN mensajero (ARNm) a partir de la estirpe celular productora de un anticuerpo anti-TNF y a partir de anticuerpos adicionales opcionales que suministran regiones constantes pesadas y ligeras; clonación y producción de ADNc a partir del mismo;
2. preparación de una biblioteca de ADNc de longitud completa a partir de ARNm purificado, de la que los segmentos génicos de región V y/o C apropiados de los genes de cadena L y H pueden: (i) identificarse con sondas apropiadas; (ii) secuenciarse y (iii) compatibilizarse con un segmento génico C o V de otro anticuerpo quimérico;
3. construcción de secuencias de codificación de cadena H o L completa mediante ligamiento de los segmentos génicos de la región V específicos clonados con el gen de la región C clonado, como se describe anteriormente;
4. expresión y producción de las cadenas L y H en hospedadores seleccionados, incluyendo células procarióticas y eucarióticas, para proporcionar anticuerpos murido-murido, humano-murido, humano-humano o humano-murido.

Una característica común de todos los genes de cadena H y L de inmunoglobulina y sus ARNm codificados es la región J. Las regiones J de la cadena H y L tienen diferentes secuencias, pero existe un alto grado de homología de secuencia (mayor de 80%) entre cada grupo, especialmente cerca de la región C. Esta homología es explotada en este método, y pueden utilizarse secuencias consenso de las regiones J de la cadena H y L para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para el ligamiento posterior de segmentos de la región V a segmentos de la región C humana.

Los vectores de ADNc de la región C preparados a partir de células humanas pueden modificarse mediante mutagénesis dirigida a sitio para disponer un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana. Por ejemplo, puede clonarse la región C de cadena kappa humana completa (Ck) y la región C de gamma-1 humana completa (C gamma-1). En este caso, el método alternativo basado en clones de la región C genómica como fuente de vectores de la región C no permitiría que estos genes se expresasen en sistemas bacterianos cuando las enzimas necesarias para retirar las secuencias participantes estuvieran ausentes. Los segmentos de región V clonada se escinden y se ligan con vectores de región C de cadena L o H. Como alternativa, la región C gamma-1 humana puede modificarse introduciendo un codón de terminación, generando así una secuencia génica que codifica la porción de cadena H de una molécula Fab. Las secuencias de codificación con regiones V y C ligadas se transfieren después a vehículos de expresión apropiados para expresión en hospedadores apropiados, procarióticos o eucarióticos.

Se dice que dos secuencias de ADN de codificación están "ligadas operativamente" si el ligamiento da como resultado una secuencia traducible continua sin alteración o interrupción del marco de lectura de triplete. Una secuencia de ADN de codificación está ligada operativamente a un elemento de expresión génica si el ligamiento da como resultado el funcionamiento apropiado de ese elemento de expresión génica, dando como resultado la expresión de la secuencia de codificación.

Los vehículos de expresión incluyen plásmidos u otros vectores. Se prefiere entre estos vehículos que portan una secuencia de cadena CH o CL humana funcionalmente completa, que tengan sitios de restricción apropiados introducidos por ingeniería genética de modo que cualquier secuencia de cadena VH o VL con extremos cohesivos apropiados pueda insertarse fácilmente en los mismos. Los vehículos que contienen la secuencia de cadena CH o CL humana sirven por tanto como intermedios para la expresión de cualquier cadena H o L completa deseada en cualquier hospedador apropiado.

Un anticuerpo quimérico, tal como uno de ratón-humano o humano-humano, se sintetizará típicamente a partir de genes activados por promotores génicos cromosómicos nativos de las regiones V de cadena H y L de ratón utilizadas en los constructos; el ajuste ocurre habitualmente entre el sitio donante de ajuste en la región J de ratón y

el sitio aceptor de ajuste que precede a la región C humana, y también en las regiones de ajuste que aparecen en la región C humana; la poliadenilación y terminación de la transcripción aparecen en sitios cromosómicos nativos cadena abajo de las regiones de codificación humanas.

5 Puede recombinarse una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un fragmento de anticuerpo anti-TNF con ADN de vector según técnicas convencionales, incluyendo terminaciones de extremos romos o extremos escalonados para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar terminaciones apropiadas, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligamiento con ligasas apropiadas. Las técnicas para dichas manipulaciones se dan a conocer, por ejemplo, por Ausubel, *supra*, Sambrook, *supra*, y son bien conocidas en la técnica.

10 Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, es "capaz de expresar" un polipéptido si contiene secuencias nucleotídicas que contengan información regulatoria transcripcional y traduccional y dichas secuencias están "operativamente ligadas" a secuencias nucleotídicas que codifican el polipéptido. Un ligamiento operativo es un ligamiento en el que las secuencias de ADN regulatorias y la secuencia de ADN que se busca expresar están conectadas de tal manera que permitan la expresión génica en forma de péptidos anti-TNF o fragmentos de anticuerpo en cantidades recuperables. La naturaleza precisa de las regiones regulatorias necesarias para la expresión génica puede variar de organismo a organismo, y es bien conocida en la técnica análoga. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989); y Ausubel, eds., "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Intersciences, Nueva York (1987, 1993).

20 Están disponibles muchos sistemas de vector para la expresión de genes de cadena H y L de péptido anti-TNF clonado en células de mamífero (véanse Glover, ed., "DNA Cloning", vol. II, pág. 143-238, IRL Press, Washington, DC, 1985). Pueden seguirse diferentes enfoques para obtener anticuerpos H2L2 completos. Es posible coexpresar cadenas H y L en las mismas células para conseguir la asociación y ligamiento intracelular de cadenas H y L en anticuerpos H2L2 tetraméricos completos. La coexpresión puede aparecer utilizando el mismo o diferentes plásmidos en el mismo hospedador. Los genes para ambas cadenas H y L pueden disponerse en el mismo plásmido, que se transfecta después en células, seleccionado directamente así las células que expresan ambas cadenas. Como alternativa, las células pueden transfectarse primero con un plásmido que codifica una cadena, por ejemplo la cadena L, seguido de transfección de la estirpe celular resultante con un plásmido de cadena H que contiene un segundo marcador detectable. Las estirpes celulares productoras de moléculas H2L2 mediante cualquier ruta podrían transfectarse con plásmidos que codifican copias adicionales de péptidos, cadenas H, L o H más L junto con marcadores detectables adicionales para generar estirpes celulares con propiedades potenciadas, tales como mayor producción de moléculas de anticuerpos H2L2 ensamblados o estabilidad potenciada de las estirpes celulares transfectadas.

Moléculas receptoras.

35 Las moléculas receptoras (también designadas en la presente memoria como receptores solubles de TNF) útiles en los métodos y composiciones de la presente invención son aquellas que se unen a TNF con alta afinidad (véase, por ejemplo, Feldmann *et al.*, publicación internacional n° WO 92/07076 (publicada el 30 de abril de 1992), y poseen una baja inmunogenicidad. En particular, los receptores de TNF de superficie celular de 55 kDa (TNF-R p55) y de 75 kDa (TNF-R p75) son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares (DEC) de los receptores o porciones funcionales de los mismos, son también útiles en la presente invención. Se han detectado formas truncadas de los receptores de TNF que comprenden los DEC en orina y suero en forma de proteínas de unión inhibitoras de 30 kDa y 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 1531-1536 (1990)). Las moléculas multiméricas receptoras de TNF y moléculas de fusión inmunoreceptoras de TNF, y derivados y fragmentos o porciones de las mismas, son ejemplos adicionales de moléculas receptoras que son útiles en los métodos y composiciones de la presente invención. Las moléculas receptoras que pueden utilizarse en la invención se caracterizan por su capacidad de tratar pacientes durante periodos extensos con un buen a excelente alivio de síntomas y baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos.

50 Las moléculas multiméricas receptoras de TNF útiles en la presente invención comprenden todo o una porción funcional del DEC de dos o más receptores de TNF ligados mediante uno o más engarces polipeptídicos. Las moléculas multiméricas pueden comprender adicionalmente un péptido señal de una proteína secretada para dirigir la expresión de la molécula multimérica. Se han descrito estas moléculas multiméricas y métodos para su producción en la patente de EE.UU. n° 7,070,783 (presentada el 9 de mayo de 1995), cuyo contenido se incorpora enteramente por referencia.

55 Las moléculas de fusión inmunoreceptoras útiles en los métodos y composiciones de la presente invención comprenden al menos una porción de una o más moléculas de inmunoglobulina o una porción funcional de uno o más receptores de TNF. Estas moléculas de fusión inmunoreceptoras pueden ensamblarse como monómeros o hetero- u homomultímeros. Las moléculas de fusión inmunoreceptoras pueden ser también monovalentes o multivalentes. Es un ejemplo de dicha molécula de fusión inmunoreceptora la proteína de fusión receptor de TNF/IgG.

Se han descrito en la técnica moléculas de fusión inmunoreceptoras de TNF y métodos para su producción (Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 21: 2883-2886 (1991); Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Poppel et al., J. Exp. Med. 174: 1483-1489 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215-219 (1994); Butler et al., Cytokine 6(6): 616-623 (1994); Baker et al., Eur. J. Immunol. 24: 2040-2048 (1994); Beutler et al., patente de EE.UU. nº 5.447.851 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 08/442.133 (presentada el 16 de mayo de 1995)) . Pueden encontrarse también métodos para producir moléculas de fusión inmunoreceptoras en Capon et al., patente de EE.UU. nº 5.116.964, Capon et al., patente de EE.UU. nº 5.225.538 y Capon et al., Nature 337: 525-531 (1989).

Los derivados, fragmentos, regiones y porciones funcionales de las moléculas receptoras se asemejan funcionalmente a las moléculas receptoras que pueden utilizarse en la presente invención (concretamente, se unen a TNF con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad) . Un equivalente funcional o derivado de la molécula receptora designa la porción de la molécula receptora, o la porción de secuencia de molécula receptora que codifica la molécula receptora, que es de suficiente tamaño y secuencia para asemejarse funcionalmente a las moléculas receptoras que pueden utilizarse en la presente invención (concretamente, se une a TNF con alta afinidad y posee baja inmunogenicidad). Un equivalente funcional de la molécula receptora incluye también moléculas receptoras modificadas que se asemejan funcionalmente a las moléculas receptoras que pueden utilizarse en la presente invención (concretamente, se unen a TNF con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad). Por ejemplo, un equivalente funcional de la molécula receptora puede contener un codón "silencioso" o una o más sustituciones, deleciones o adiciones aminoácidas (por ejemplo, sustitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido; o sustitución por un codón que codifica el mismo o diferente aminoácido hidrofóbico de otro codón que codifica un aminoácido hidrofóbico). Véase Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, Nueva York (1989).

Metotrexato.

Las formulaciones orales e intravenosas disponibles actualmente de metotrexato incluyen el paquete de dosis de metotrexato Rheumatrex® (Lederle Laboratories, Wayne, NJ); comprimidos de metotrexato (Mylan Pharmaceuticals Inc., Morgantown, WV; Roxane Laboratories, Inc., Columbus, OH); y comprimidos de metotrexato de sodio para inyección (Immunex Corporation, Seattle, WA) y metotrexato de sodio LPF® (metotrexato de sodio de inyección) (Immunex Corporation, Seattle, WA). El metotrexato está también disponible en Pharmacochemie (Países Bajos). Pueden utilizarse también profármacos, homólogos y/o análogos de metotrexato (por ejemplo, antagonistas de folato) en los métodos y composiciones de la presente invención. Como alternativa, pueden utilizarse otros agentes inmunosupresores (o fármacos que suprimen el sistema inmune) en los métodos y composiciones de la presente invención.

Administración.

Los antagonistas de TNF, metotrexato y las composiciones de la presente descripción pueden administrarse a un individuo en una variedad de modos. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo en polímeros de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, tópica, epidural, bucal, rectal, vaginal e intranasal. Puede utilizarse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, infusión o inyección intravenosa rápida, absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos o mediante terapia génica, en la que se administra una molécula de ADN que codifica la proteína o péptido terapéutico al paciente, por ejemplo, mediante un vector que causa que la proteína o péptido se exprese y secrete a niveles terapéuticos *in vivo*. Además, los antagonistas de TNF, metotrexato y composiciones de la presente descripción 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, pueden añadirse también ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes y/o colorantes.

Los antagonistas de TNF y metotrexato pueden administrarse profiláctica o terapéuticamente a un individuo. Los antagonistas de TNF pueden administrarse antes de o simultáneamente con (en la misma o diferentes composiciones) o secuencialmente con la administración de metotrexato, de tal manera que los antagonistas de TNF son administrados como terapia coadyuvante de la terapia con metotrexato.

Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), los antagonistas de TNF, metotrexato y las composiciones de la presente descripción pueden formularse en forma de una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de dichos vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5%. Pueden utilizarse también 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 la estabilidad química (por ejemplo tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas utilizadas habitualmente.

Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo de la técnica.

Por ejemplo, se prepara una composición parenteral adecuada para administración mediante inyección disolviendo 1,5% en peso de ingrediente activo en una solución de 0,9% de cloruro de sodio.

Los antagonistas de TNF y metotrexato se administran en cantidades terapéuticamente eficaces; las composiciones de la presente invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella en la que la administración de antagonista de TNF y metotrexato, o la administración de una composición de la presente invención, da como resultado la inhibición de la actividad biológica del TNF respecto a la actividad biológica del TNF cuando no se administran cantidades terapéuticamente eficaces de antagonista y metotrexato, o respecto a la actividad biológica del TNF cuando no se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. Una cantidad terapéuticamente eficaz es preferiblemente la cantidad de antagonista de TNF y metotrexato necesaria para reducir significativamente o eliminar los signos y síntomas asociados a una enfermedad mediada por TNF particular. Como se utiliza en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz no es necesariamente una cantidad tal que la administración del antagonista de TNF solo, o la administración del metotrexato solo, deba dar necesariamente como resultado la inhibición de la actividad biológica del TNF.

Una vez se ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz, puede administrarse al individuo una cantidad de mantenimiento de antagonista de TNF solo, o metotrexato solo, o de una combinación de antagonista de TNF y metotrexato. Una cantidad de mantenimiento es la cantidad de antagonista de TNF, metotrexato o combinación de antagonista de TNF y metotrexato necesaria para mantener la reducción o eliminación de los signos y síntomas asociados a una enfermedad mediada por TNF particular conseguida por la dosis terapéuticamente eficaz. La cantidad de mantenimiento puede administrarse en forma de una dosis única, o una serie de dosis separadas por intervalos de días o semanas.

La dosificación administrada a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las características farmacodinámicas de los antagonistas particulares y su modo y vía de administración; el tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor, la naturaleza y extensión de los síntomas de la enfermedad que se está tratando, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. Los métodos *in vitro* e *in vivo* de determinación de la inhibición del TNF en un individuo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos ensayos *in vitro* pueden incluir un ensayo de citotoxicidad de TNF (por ejemplo, el ensayo WEHI o un radioinmunoensayo ELISA). Los métodos *in vivo* pueden incluir ensayos de letalidad en roedores y/o sistemas de modelo patológico en primates (Mathison et al., J. Clin. Invest., 81: 1925-1937 (1988); Beutler et al., Science 229: 869-871 (1985); Tracey et al., Nature 330: 662-664 (1987); Shimamoto et al., Immunol. Lett 17: 311-318 (1988); Silva et al., J. Infect. Dis. 162: 421-427 (1990); Opal et al., J. Infect. Dis. 161: 1148-1152 (1990); Hinshaw et al., Circ. Shock 30: 279-292 (1990)).

El antagonista de TNF y el metotrexato pueden administrarse cada uno en dosis únicas o múltiples dependiendo de factores tales como la naturaleza y extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente y el efecto deseado. Por tanto, pueden utilizarse otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de fármacos múltiples) en combinación con la coadministración terapéutica de antagonistas de TNF y metotrexato. En una realización particular, se administra un antagonista de TNF en dosis múltiples. En otra realización, se administra el metotrexato en forma de una serie de dosis bajas separadas por intervalos de días o semanas. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosificación establecidos está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Habitualmente, una dosificación diaria de ingrediente activo puede ser de aproximadamente 0,01 a 100 mg por kg de peso corporal. Ordinariamente, 1 a 40 mg por kg al día administrados en dosis divididas 1 a 6 veces al día o en forma de liberación sostenida son eficaces para obtener los resultados deseados. Las segundas o posteriores administraciones pueden administrarse a una dosificación que es la misma, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo.

La segunda o posterior administración es preferiblemente durante o inmediatamente antes de la recaída o exacerbación de la enfermedad o síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, la segunda y posteriores administraciones puede administrarse entre aproximadamente un día a 30 semanas desde la administración previa. Pueden suministrarse 2, 3, 4 ó más administraciones totales al individuo, según sea necesario.

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

La presente invención se ilustrará ahora mediante el siguiente ejemplo, que no se pretende que sea limitante en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1. Tratamiento clínico de artritis reumatoide mediante infusiones múltiples de un anticuerpo anti-TNF con y sin metotrexato

Se realizó un estudio aleatorizado de doble ciego controlado por placebo para evaluar la seguridad y eficacia de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF (cA2) después de múltiples infusiones de 1, 3 ó 10 mg/kg de cA2, solo o en combinación con metotrexato, comparado con múltiples infusiones de placebo en combinación con metotrexato en el tratamiento de artritis reumatoide (AR) en pacientes.

Pacientes

Se inscribieron en el estudio ciento un (101) pacientes de seis centros europeos que habían estado utilizando metotrexato durante al menos 6 meses, habían estado a una dosis estable de 7,5 mg/semana durante al menos 4 semanas, y tenían enfermedad activa (según los criterios del Colegio Americano de Reumatología) con cambios erosivos según rayos X en manos y pies. La enfermedad activa se definió mediante la presencia de seis o más articulaciones inflamadas más al menos tres de cuatro criterios secundarios (duración de la rigidez matutina ≥ 45 minutos; ≥ 6 articulaciones sensibles o dolorosas; velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE) ≥ 28 mm/hora; proteína C reactiva (PCR) ≥ 20 mg/l).

En pacientes que utilizan corticosteroides ($\leq 7,5$ mg/día) o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), las dosis habían sido estables durante 4 semanas antes del examen. La dosis de corticosteroides permaneció estable durante la participación en el ensayo. La dosis de AINE permaneció típicamente estable también durante la participación en el ensayo.

Infusiones de estudio

Se suministró el anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF (cA2) en forma de una solución estéril que contenía 5 mg de cA2 por ml de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M en cloruro de sodio 0,15 M con 0,01% de polisorbato 80, pH 7,2. Los viales de placebo contenían albúmina sérica humana al 0,1% en el mismo tampón. Antes del uso, se diluyó la cantidad apropiada de cA2 o placebo en 300 ml de solución salina estéril por el farmacéutico, y se administró por vía intravenosa mediante un filtro en línea de 0,2 μ m durante 2 horas. Las características de las bolsas de infusión de placebo y cA2 eran idénticas, y los investigadores y pacientes no sabían cuál infusión se estaba administrando.

Valoraciones

Los pacientes se asignaron aleatoriamente a uno de siete grupos de tratamiento. El número de pacientes en cada dosis (o tratamiento) se indica en la Tabla 1. Cada uno de los 101 pacientes recibió infusiones múltiples de, o bien, 0, 1, 3 o 10 mg/kg de cA2. Las infusiones se administraron en las semanas 0, 2, 6, 10 y 14. Empezando en la semana 0, los pacientes recibieron 7,5 mg/semana de metotrexato (Pharmacochemie, Países Bajos) o 3 comprimidos de placebo/semana (Pharmacochemie, Países Bajos). Los pacientes fueron vigilados por si aparecían efectos adversos durante las infusiones y regularmente después de ellas mediante entrevista, examen físico y ensayos de laboratorio.

Se eligieron las seis valoraciones primarias de enfermedad-actividad para permitir el análisis de la respuesta en pacientes individuales según el índice de Paulus (Paulus et al., *Arthritis Rheumatism* 33: 477-484 (1990)). Las valoraciones contribuyentes a este índice fueron las puntuaciones de articulaciones sensibles y articulaciones inflamadas (60 y 58 articulaciones, respectivamente, caderas no evaluadas para inflamación, graduadas 0-3), la duración de la rigidez matutina (minutos), la valoración de paciente y médico de la gravedad de la enfermedad (en una escala de 5 puntos, en el intervalo desde 1 (sin síntomas) a 5 (muy grave)), y la velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE). Se consideró que los pacientes habían respondido si al menos cuatro de las seis variables mejoraban, definido como una mejora de al menos un 20% en las variables continuas y al menos dos grados de mejora o mejora del grado 2 a 1 en las dos valoraciones de gravedad de la enfermedad (respuestas de Paulus del 20%). Se utilizaron también mejoras de al menos un 50% en las variables continuas (respuestas de Paulus del 50%).

Otras valoraciones de enfermedad-actividad incluyeron la puntuación de dolor (0-10 cm en una escala análoga visual (EAV)), una valoración de fatiga (0-10 cm EAV) y de fuerza de agarre (0-40 kPa, media de tres medidas por mano mediante un esfigmomanómetro de manguito).

Se midió la VSE en cada sitio de estudio con un método estándar (Westergen). Se midió la proteína C reactiva (PCR) mediante nefelometría cinética (inmunoensayo polarizante fluorescente de Abbott). Véanse también Elliott et al., *Lancet* 344: 1105-1110 (1994); Elliott et al., *Lancet* 34: 1125-1127 (1994) y Elliott et al., *Arthritis Rheum.* 36(12): 1681-1690 (1993).

Las evaluaciones se realizaron en las semanas 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 23 y 26.

Resultados

Se distribuyeron aleatoriamente los 101 pacientes en uno de siete grupos de tratamiento (o dosis). Los pacientes inscritos en cada grupo de tratamiento se equilibraron bien para una demografía de línea base. La duración de la enfermedad y los recuentos de articulaciones inflamadas y sensibles en la línea base se equilibraron bien también entre los grupos (Tabla 1) . La Tabla 1 muestra la dosis máxima de metotrexato administrada 6 meses antes de la distribución aleatoria. Las dosis máximas medianas para cada grupo estaban en el intervalo entre 10 y 15 mg/semana; no hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ($p = 0,404$).

TABLA 1. Recuentos de articulaciones característicos de la enfermedad en línea base

	Grupos de tratamiento		
	Placebo	1 mg/kg de cA2	
	MTX+	MTX+	MTX-
Duración de la enfermedad (años)			
Pacientes evaluados	14	14	15
Media ± DE	7,6±4,0	14,3±12,1	7,6±6,0
Mediana	6,9	11,4	5,2
Intervalo IQ	(4,3, 11,5)	(3,3, 24,7)	(3,4, 9,0)
Intervalo	(1,8, 14,2)	(0,7, 37,3)	(2,5, 21,3)
Número de articulaciones inflamadas, conjunto de articulaciones Paulus (0-58)			
Pacientes evaluados	14	14	15
Media ± DE	18,1±8,6	16,9±7,8	21,2±11,2
Mediana	16,5	15,5	20,0
Intervalo IQ	(12,0, 25,0)	(10,0, 25,0)	(10,0, 33,0)
Intervalo	(6,0, 38,0)	(6,0, 29,0)	(7,0, 40,0)
Número de articulaciones sensibles, conjunto de articulaciones Paulus (0-60)			
Pacientes evaluados	14	14	15
Media ± DE	31,5±14,2	19,1±10,7	29,9±17,1
Mediana	27,0	16,0	30,0
Intervalo IQ	(22,0, 44,0)	(13,0, 30,0)	(14,0, 45,0)
Intervalo	(8,0, 52,0)	(2,0, 39,0)	(6,0, 58,0)
Dosis máxima de DTX los 6 meses previos (mg/kg)			
Pacientes evaluados	14	14	15
Media ± DE	13,8±3,9	11,6±3,5	12,8±5,6
Mediana	15,0	11,3	12,5
Intervalo IQ	(10,0, 15,0)	(10,0, 12,5)	(10,0, 15,0)
Intervalo	(7,5, 20,0)	(7,5, 20,0)	(7,5, 30,0)

MTX= metotrexato.

TABLA 1 (continuación)

	Grupos de tratamiento	
	3 mg/kg de cA2	
	MTX+	MTX-
Duración de la enfermedad (años)		
Pacientes evaluados	15	14
Media ± DE	12,1 ± 9,0	7,8 ± 4,3
Mediana	11,9	7,7
Intervalo IQ	(4,3, 16,4)	(4,6, 9,8)
Intervalo	(0,7, 30,5)	(1,4, 17,4)
Número de articulaciones inflamadas, conjunto de articulaciones Paulus (0-58)		
Pacientes evaluados	15	14
Media ± DE	17,7 ± 5,9	19,7 ± 9,9
Mediana	16,0	17,0
Intervalo IQ	(13,0, 22,0)	(11,0, 32,0)
Intervalo	(10,0, 29,0)	(8,0, 34,0)
Número de articulaciones sensibles, conjunto de articulaciones Paulus (0-60)		
Pacientes evaluados	15	14
Media ± DE	24,5 ± 14,4	31,2 ± 11,7
Mediana	21,0	31,0
Intervalo IQ	(12,0, 32,0)	(23,0, 39,0)
Intervalo	(10,0, 52,0)	(9,0, 52,0)
Dosis máxima de DTX los 6 meses previos (mg/kg)		
Pacientes evaluados	14	13
Media ± DE	11,6 ± 3,3	11,7 ± 4,8
Mediana	10,0	10,0
Intervalo IQ	(10,0, 15,0)	(7,5, 12,5)
Intervalo	(7,5, 17,5)	(7,5, 25,0)

MTX= metotrexato

TABLA 1 (continuación)

Grupos de tratamiento

	10 mg/kg de cA2		Todos los pacientes	Valor de p del efecto del tratamiento
	MTX+	MTX-		
Duración de la enfermedad (años)				
Pacientes evaluados	14	15	101	0,634
Media ± DE	11,1 ± 7,4	9,7 ± 7,4	10,0 ± 7,8	
Mediana	10,7	7,6	7,6	
Intervalo IQ	(4,5, 15,5)	(4,9, 14,9)	(4,3, 14,4)	
Intervalo	(1,4, 24,1)	(1,1, 24,3)	(0,7, 37,3)	
Número de articulaciones inflamadas, conjunto de articulaciones Paulus (0-58)				
Pacientes evaluados	14	15	101	0,643
Media ± DE	21,1 ± 8,2	17,8 ± 8,7	18,9 ± 8,7	
Mediana	19,5	17,0	18,0	
Intervalo IQ	(15,0, 31,0)	(11,0, 21,0)	(12,0, 25,0)	
Intervalo	(10,0, 34,0)	(7,0, 41,0)	(6,0, 41,0)	
Número de articulaciones sensibles, conjunto de articulaciones Paulus (0-60)				
Pacientes evaluados	14	15	101	0,135
Media ± DE	26,5 ± 12,0	26,2 ± 11,7	27,0 ± 13,5	
Mediana	25,5	23,0	25,0	
Intervalo IQ	(21,0, 38,0)	(17,0, 35,0)	(15,0, 38,0)	
Intervalo	(8,0, 44,0)	(11,0, 48,0)	(2,0, 58,0)	
Dosis máxima de DTX los 6 meses previos (mg/kg)				
Pacientes evaluados	14	15	99	0,404
Media ± DE	12,7 ± 5,0	12,5 ± 3,0	12,4 ± 4,2	
Mediana	10,0	12,5	12,5	
Intervalo IQ	(10,0, 15,0)	(10,0, 15,0)	(10,0, 15,0)	
Intervalo	(7,5, 25,0)	(7,5, 20,0)	(7,5, 30,0)	

MTX= metotrexato

5 El análisis primario preespecificado en este ensayo fue la comparación del tiempo total de respuesta clínica durante el periodo de seguimiento de 26 semanas. Los resultados del análisis primario se muestran en la Tabla 2. La duración de la respuesta de todos los grupos tratados con cA2, con la excepción del grupo de 1 mg/kg que no recibe metotrexato, mejoró significativamente ($p < 0,001$) comparada con el grupo placebo que recibía metotrexato solo.

TABLA 2. Tiempo total de respuesta* basado en el criterio de Paulus del 20%
Grupos de tratamiento

	Placebo (n= 14)		1 mg/kg de cA2 (n= 15)		3 mg/kg de cA2 (n= 15)		10 mg/kg de cA2 (n= 15)		Valor de p del tratamiento
	MTX+ (n= 14)	MTX- (n= 14)	MTX+ (n= 15)	MTX- (n= 15)	MTX+ (n= 15)	MTX- (n= 14)	MTX+ (n= 13)	MTX- (n= 15)	
Tiempo total de respuesta en semanas	0	16,6	2,6	16,5	17,2	>23,1	10,4	<0,001	
Mediana	0	0	0	0	0	0	0		
Mínimo	0,0	6,2	2,0	7,0	4,0	2,6	6,9		
Percentil 25	0,0	22,5	8,0	>20,1	20,7	>24,6	>23,1		
Percentil 75	>15,1	>26,9	15,1	>24,9	>25,9	>25,6	>26,4		
Máximo		<0,001	0,119	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
Valor de p: frente a MTX solo									

* Los pacientes se siguieron a lo largo de 26 semanas después de la infusión inicial de cA2

5 Las tasas de respuesta a Paulus del 20% se muestran en la Tabla 3. Los retirados se consideraron como sin respuesta posteriormente a su retirada del estudio. Con la excepción del grupo de 1 mg/kg que no recibe metotrexato, todos los grupos tratados con cA2 demostraron beneficio clínico durante 14 semanas cuando recibieron la última dosis de cA2. Se observó un beneficio clínico sostenido durante 26 semanas (la última visita de seguimiento) en pacientes que recibieron 3 ó 10 mg/kg de cA2 con metotrexato. Aproximadamente la mitad de los pacientes que recibieron 3 mg/kg de cA2 con metotrexato demostraron un beneficio clínico continuado a las 26 semanas.

TABLA 3. Número de pacientes que responden según el criterio de Paulus del 20% en cada visita de evaluación

Pacientes con cualquier respuesta	Grupos de tratamiento		
	Placebo	1 mg/kg de cA2	
	MTX+ (n= 14)	MTX+ (n= 14)	MTX- (n= 15)
	21% (3/14)	93% 13/14	80% 12/15
Valor de p frente a MTX solo		<0,001	0,006
Tiempo después de la infusión			
1 semana	0% (0/14)	31% (4/13)	53% (8/15)
2 semanas	7% (1/14)	64% (9/14)	57% (8/14)
4 semanas*	0% (0/14)	79% 11/14	33% (5/15)
6 semanas	0% (0/14)	71% 10/14	27% (4/15)
8 semanas*	14% (2/14)	64% (9/14)	20% (3/15)
10 semanas	7% (1/14)	71% 10/14	20% (3/15)
12 semanas*	7% (1/14)	57% (8/14)	13% (2/15)
14 semanas	0% (0/14)	71% 10/14	7% (1/15)
16 semanas*	14% (2/14)	64% (9/14)	7% (1/15)
18 semanas	21% (3/14)	50% (7/14)	13% (2/15)
20 semanas	7% (1/14)	54% (7/13)	13% (2/15)
22 semanas	7% (1/14)	46% (6/13)	0% (0/15)
26 semanas*	7% (1/14)	21% (3/14)	7% (1/15)

*Visitas de evaluación preespecificadas para análisis.

Tabla 3 (continuación)
Grupos de tratamiento

	3 mg/kg de cA2		10 mg/kg de cA2		Valor de p del efecto del tratamiento
	MTX+ n= 15	MTX- n= 14	MTX+ n= 13	MTX- n= 15	
Pacientes con cualquier respuesta	80% 12/15	79% 11/14	85% 11/13	80% 12/15	<0,001
Valor de p frente a MTX solo	0,002	0,002	0,001	0,004	
Tiempo después de infusión					
1 semana	27% (4/15)	43% (6/14)	31% (4/13)	60% (9/15)	
2 semanas	27% (4/15)	43% (6/14)	62% (8/13)	53% (8/15)	
4 semanas*	40% (6/15)	64% (9/14)	54% (7/13)	53% (8/15)	0,002
6 semanas	47% (7/15)	50% (7/14)	54% (7/13)	47% (7/15)	
8 semanas*	60% (9/15)	71% 10/14	69% (9/13)	40% (6/15)	0,003
10 semanas	67% 10/15	64% (9/14)	69% (9/13)	53% (8/15)	
12 semanas*	67% (10/15)	64% (9/14)	62% (8/13)	60% (8/13)	<0,001
14 semanas	60% (9/15)	57% (8/14)	77% 10/13	53% (8/15)	
16 semanas*	67% 10/15	64% (9/14)	54% (7/13)	67% 10/15	<0,001
18 semanas	71% 10/14	69% (9/13)	62% (8/13)	57% (8/14)	
20 semanas	53% (8/15)	43% (6/14)	54% (7/13)	53% (8/15)	
22 semanas	47% (7/15)	36% (5/14)	54% (7/13)	33% (5/15)	
26 semanas*	47% (7/15)	21% (3/14)	54% (7/13)	33% (5/15)	0,013

*Visitas de evaluación preespecificadas para análisis.

Se muestran las tasas de respuesta a Paulus del 50% en la Tabla 4. La magnitud del beneficio clínico del tratamiento con cA2 fue sustancial. La mayoría de los

5 pacientes respondieron al tratamiento con cA2 según el criterio de Paulus del 50%.

TABLA 4. Número de pacientes que responden según el criterio de Paulus del 50% en cada visita de evaluación

Grupos de tratamiento

	Placebo	1 mg/kg de cA2	
	MTX+ (n =14)	MTX+ (n= 14)	MTX- (n= 15)
Pacientes con cualquier respuesta	14,3% (2/14)	85,7% (12/14)	40,0% (6/15)
Valor de p frente a MTX solo		<0,001	0,079
Tiempo después de infusión			
1 semana	0,0% (0/14)	7,7% (1/13)	26,7% (4/15)
2 semanas	0,0% (0/14)	21,4% (3/14)	28,6% (4/14)
4 semanas*	0,0% (0/14)	57,1% (8/14)	13,3% (2/15)
6 semanas	0,0% (0/14)	57,1% (8/14)	0,0% (0/15)
8 semanas*	7,1% (1/14)	50,0% (7/14)	0,0% (0,15)
10 semanas	0,0% (0/14)	57,1% (8/14)	0,0% (0/15)
12 semanas*	7,1% (1/14)	50,0% (7/14)	6,7% (1/15)
14 semanas	0,0% (0/14)	57,1% (8/14)	6,7% (1/15)
16 semanas*	0,0% (0/14)	64,3% (9/14)	6,7% (1/15)
18 semanas	7,1% (1/14)	50,0% (7/14)	6,7% (1/15)
20 semanas	7,1% (1/14)	53,8% (7/13)	0,0% (0/15)
22 semanas	0,0% (0/14)	38,5% (5/13)	0,0% (0/15)
26 semanas*	0,0% (0/14)	21,4% (3/14)	6,7% (1/15)

*Visitas de evaluación preespecificadas para análisis.

TABLA 4 (continuación)
Grupos de tratamiento

	3 mg/kg de cA2		10 mg/kg de cA2		Valor de p del efecto del tratamiento
	MTX + (n= 15)	MTX- (n= 14)	MTX+ (n= 13)	MTX- (n= 15)	
Pacientes con cualquier respuesta	73,3% (11/15)	64,3% (9/14)	76,9% (10/13)	66,7% (10/15)	<0,001
Valor de p frente MTX solo	0,001	0,008	0,002	0,009	
Tiempo después de infusión					
1 semana	0,0% (0/15)	35,7% (5/14)	7,7% (1/13)	26,7% (4/15)	
2 semanas	6,7% (1/15)	28,6% (4/14)	15,4% (2/13)	20,0% (3/15)	
4 semanas*	13,3% (2/15)	28,6% (4/14)	46,2% (6/13)	40,0% (6/15)	0,006
6 semanas	26,7% (4/15)	42,9% (6/14)	38,5% (5/13)	33,3% (5/15)	
8 semanas*	40,0% (6/15)	50,0% (7/14)	69,2% (9/13)	33,3% (5/15)	<0,001
10 semanas	40,0% (6/15)	50,0% (7/14)	69,2% (9/13)	40,0% (6/15)	
12 semanas*	60,0% (9/15)	35,7% (5/14)	61,5% (8/13)	40,0% (6/15)	<0,001
14 semanas	40,0% (6/15)	35,7% (5/14)	61,5% (8/13)	40,0% (6/15)	
16 semanas*	60,0% (9/15)	50,0% (7/14)	53,8% (7/13)	40,0% (6/15)	<0,001
18 semanas	71,4% (10/14)	46,2% (6/13)	61,5% (8/13)	57,1% (8/14)	
20 semanas	53,3% (8/15)	35,7% (5/14)	46,2% (6/13)	40,0% (6/15)	
22 semanas	46,7% (7/15)	14,3% (2/14)	53,8% (7/13)	26,7% (4/15)	
26 semanas*	40,0% (6/15)	14,3% (2/14)	46,2% (6/13)	20,0% (3/15)	0,008

*Visitas de evaluación preespecificadas para análisis.

5 Proporcionalmente a las tasas de respuesta clínica mostradas en las Tablas 2-4, la mayoría de los pacientes en los grupos de tratamiento que demuestran la eficacia del tratamiento con cA2 recibieron todos 5 infusiones de cA2 (Tabla 5) . La razón principal para que los pacientes no recibieran el régimen de dosis completo fue debido a la falta de eficacia en el grupo placebo (metotrexato solo) y en el grupo de 1 mg/kg que no recibía metotrexato. Los 15 pacientes del grupo de 3 mg/kg que recibieron metotrexato completaron el régimen de dosis de 5 infusiones.

TABLA 5. Número de infusiones completadas

		Grupos de tratamiento						Valor de p	
		1 mg/kg de cA2		3 mg/kg de cA2		10 mg/kg de cA2			
		MTX+ n= 14	MTX+ n= 14	MTX- n= 15	MTX+ n= 15	MTX- n= 14	MTX+ n= 14	MTX- n= 15	del efecto del trat.
Pacientes con infusiones completas*									
5 infusiones	6	12	8	15	12	12	12	12	0,003
	42,86%	85,71%	53,33%	100,0%	85,71%	85,71%	80,00%		
4 infusiones	0	1	0	0	1	1	0		
	0,00%	7,14%	0,00%	0,00%	7,14%	7,14%	0,00%		
3 infusiones	2	1	6	0	0	1	1		
	14,29%	7,14%	40,00%	0,00%	0,00%	7,14%	6,67%		
2 infusiones	5	0	1	0	1	0	2		
	35,71%	0,00%	6,67%	0,00%	7,14%	0,00%	13,33%		
1 infusión	1	0	0	0	0	0	0		
	7,14%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		

* Los pacientes se cuentan sólo una vez para el primer grupo para el que se califican (5 infusiones > 4 infusiones, etc...). Los pacientes se contaron sólo si habían completado la infusión entera.

5 Los resultados de las medidas de recuentos de articulaciones inflamadas y sensibles y las valoraciones globales por médico y paciente se muestran en las Figuras 1-4. Se reseñaron los resultados medianos en la Figuras 1-4 para cada visita de evaluación basada sólo en los pacientes con los datos recogidos. Es decir, no se utilizó el enfoque avanzado a la última observación realizada para pacientes que se retiraron. En lugar de ello, el número de pacientes con datos que comprende cada punto de la gráfica se reseñó en la parte inferior de las figuras.

10 A pesar del número de retiradas en el grupo de placebo y el grupo de 1 mg/kg que no recibe metotrexato, los resultados en las Figuras 1-4 demuestran que el tratamiento con cA2 en combinación con metotrexato reduce profundamente la actividad patológica para todas las medidas tradicionales de actividad patológica, aproximándose a la remisión completa en muchos pacientes.

15 Los resultados para un marcador sérico de actividad inflamatoria utilizado habitualmente, proteína C reactiva (PCR) se muestran en la Figura 5. El tratamiento con cA2 produjo una rápida reducción de la concentración de PCR, que se mantuvo durante 2 6 semanas en los pacientes que recibieron 3 ó 10 mg/kg de cA2.

20 Los resultados del cuestionario de evaluación de la salud (CES) se muestran en la Figura 6. Esta medida de la calidad de vida/incapacidad demostró la mejora frente al tiempo correspondiente con la mejora clínica observada en pacientes tratados con cA2. En los pacientes tratados con 3 mg/kg de cA2 y metotrexato, el CES se redujo de 2,0 en la línea base a 1,1 a las 22 semanas.

Farmacocinética del cA2

25 Se obtuvieron las concentraciones séricas de cA2 en todos los pacientes de este estudio. Se muestra la concentración sérica en cada paciente representada frente al tiempo según el grupo de dosis de cA2 en la Figura 7. Los datos representados son las concentraciones séricas de cA2 obtenidas justo antes de la administración de cA2 en las semanas 2, 6, 10 y 14 y después en las semanas 18 y 26. Estos tiempos de muestreo se seleccionaron para demostrar mejor la estabilidad de la concentración de cA2 durante el régimen de dosis múltiples y la reducción de la concentración sérica de cA2 después de administrar la última dosis. Con fines de presentación de datos, se condensan las escalas de la concentración de cA2 para cada gráfica a medida que se aumentó la dosis de cA2.

Se observaron diferencias sustanciales para la concentración sérica de cA2 frente al tiempo en los grupos de dosis de 1 mg/kg según si los pacientes recibieron metotrexato. La mayoría de los pacientes que recibieron 1 mg/kg de cA2 con metotrexato demostraron concentraciones mensurables de cA2 durante 18 semanas, aunque parecía que había una tendencia a que la concentración se redujera con el tiempo. En marcado contraste, la mayoría de los pacientes que recibieron 1 mg/kg de cA2 sin metotrexato no fueron capaces de mantener concentraciones séricas mensurables de cA2 frente al tiempo. Como se discute en la presente memoria, la incapacidad de mantener el cA2 sérico en estos pacientes estaba asociada a una alta tasa de formación de anticuerpo neutralizante.

En contraposición con los grupos de 1 mg/kg, los pacientes que recibieron 3 mg/kg de cA2 o 10 mg/kg de cA2 fueron capaces de mantener las concentraciones séricas de cA2 durante el régimen de dosis múltiples. Sin embargo, incluso en estos grupos de dosis, había evidencia de que el tratamiento concomitante con metotrexato estaba asociado a altas concentraciones séricas de cA2. Como se muestra en la Figura 8, la concentración sérica mediana de cA2 en ambos grupos de 3 y 10 mg/kg que reciben metotrexato fue mayor que en los correspondientes grupos que no reciben metotrexato.

Respuestas inmunes a cA2

Se recogieron muestras séricas durante 26 semanas de todos los pacientes, y se analizaron los anticuerpos antiquméricos humanos (HACA) contra cA2. Los resultados de las respuestas HACA para cada grupo de tratamiento con cA2 se muestran en la Tabla 6. Debe observarse que en diversos pacientes en el grupo de 3 mg/kg, y en la mayoría de los pacientes en el grupo de 10 mg/kg, el cA2 seguía presente en la muestra de 26 semanas y podría interferir potencialmente con la detección de HACA en el ensayo. Sin embargo, podría razonarse también que si estuvieran presentes anticuerpos neutralizantes a las 26 semanas, entonces no debería estar presente cA2. Por lo tanto, al presentar los datos en la Tabla 6, los resultados para la tasa de respuesta inmune se muestran sin incluir los pacientes con cA2 sérico a las 26 semanas e incluyendo los pacientes con cA2 sérico a las 26 semanas, suponiendo que si estaba presente cA2 a las 26 semanas, el paciente no tenía una respuesta HACA positiva.

TABLA 6. Respuestas HACA

Respuestas HACA sin	1 mg/kg		3 mg/kg		10 mg/kg	
	MTX+	MTX-	MTX+	MTX-	MTX+	MTX-
incluir pacientes con cA2 sérico a las 26 semanas	2/13	8/15	0/10	3/12	0/2	1/10
	15,4%	53,3%	0%	25,0%	0%	10%
Respuestas HACA incluyendo pacientes con cA2 ¹ sérico a las 26 semanas	2/13	8/15	0/15	3/14	0/14	1/15
	15,4%	53,3%	0%	21,4%	0%	6,7%

Los pacientes con una concentración sérica de cA2 mensurable a las 26 semanas se consideraron negativos para respuesta HACA para este análisis

Los resultados de la Tabla 6 demuestran que el tratamiento concomitante con metotrexato suprime la respuesta inmune ante cA2, posibilitando conseguir una farmacocinética estable en un régimen de dosis múltiples de cA2. Se encontró también este efecto después del tratamiento combinado de anticuerpo anti-CD4/anti-TNF en ratones con artritis inducida por colágeno, y se describió en la patente de EE.UU. nº 6.270.766, presentada el 28 de febrero de 1996.

Seguridad clínica

Dos de 86 pacientes (recibiendo la mayoría de los pacientes 5 tratamientos) experimentaron reacciones multisistemáticas relacionadas con la infusión con retratamiento. Las reacciones multisistemáticas relacionadas con la infusión incluyen dolor de cabeza, fiebre, sofocos faciales, prurito, mialgia, náusea, opresión torácica, disnea, vómitos, eritema, incomodidad abdominal, diaforesis, escalofríos, hipertensión, mareo, hipotensión, palpitations y somnolencia.

Pueden aparecer reacciones de hipersensibilidad, como se describe en la presente memoria, siempre que se administran materiales que contienen proteína, tal como cA2. Por tanto, no está claro si estos síntomas representan un evento inmunológico o factores físicos tales como la velocidad de infusión y la agregación de inmunoglobulina. Los investigadores han reseñado que los síntomas se solucionan en algunos pacientes reduciendo la velocidad de infusión. Los informes de la bibliografía previa indican que se han observado síntomas vasomotores en pacientes que reciben terapia de inmunoglobulina intravenosa (Berkman et al., *Ann. Intern Med.* 112: 278-292 (1990); Ochs et al., *Lancet* 2: 1158-1159 (1980)).

Un paciente desarrolló hipotensión durante las tres infusiones de 10 mg/kg de cA2. El paciente no presentó signos clínicos de hipotensión y no requirió tratamiento médico pero, para mantener los criterios de seguridad predefinidos, se interrumpió el esquema de tratamiento de este paciente.

5 Una paciente tratada con 3 infusiones de 10 mg/kg de cA2 y con 7,5 mg/semana de metotrexato desarrolló síntomas de sepsis como resultado de neumonía estafilocócica 2 semanas después de su última visita del estudio, y 14 semanas después de su última infusión con cA2. Seis días después de desarrollar los síntomas, fue admitida en el hospital y tratada. Murió un día después. (Esta paciente no había procedido con la cuarta infusión por razones no relacionadas con la sepsis). Los pacientes con AR que desarrollan infecciones tienen un resultado peor del esperado. Wolfe y colaboradores han reseñado una relación observado:esperado para muerte debida a
10 neumonía de 5,3 07 y una relación de observado:esperado para muerte debida a infecciones (excluyendo neumonía) de 6,213 en pacientes con AR a partir de la base de datos ARAMIS (Wolfe et al., *Arthritis Rheumatism* 4: 481-494 (1994)).

15 Un paciente experimentó una grave infección postoperatoria después de cirugía de cataratas 9 semanas después de la quinta y última infusión de 3 mg/kg de cA2 (con 7,5 mg/semana de metotrexato), que condujo a la extirpación del ojo. Este paciente estaba recibiendo prednisolona (7 mg/día). La incidencia de endoftalmitis después de la extracción de cataratas se ha reseñado que está entre 0,072 y 0,093% (Kattan et al., *Ophthalmology*, 98(9): 1147-1148 (1991), y puede elevarse en pacientes que reciben terapia con corticosteroides.

20 Ocho de los 87 pacientes (9%) desarrollaron anticuerpos de ADN bicatenario (bc) después de múltiples infusiones de cA2. Las medidas se realizaron en la línea base, la semana 8, 16 y 26 (12 semanas después de la última infusión). En estos pacientes con anticuerpos contra ADN-bc, había una tendencia hacia un nivel menor de anticuerpos en la última evaluación, siendo negativos dos pacientes.

25 Una paciente desarrolló disnea, dolor torácico pleurítico y un rebrote de actividad artrítica en la semana de estudio 14 (4 semanas después de la cuarta infusión de 3 mg/kg de cA2). Los síntomas se solucionaron y recibió la quinta dosis de cA2. Los síntomas volvieron 3 semanas después. El examen de las muestras de sangre en serie reveló que el ensayo de anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti-ADN bc era negativo antes del tratamiento, pero se volvió positivo en la semana 6 del estudio. Los síntomas de la paciente respondieron a prednisolona oral 20-30 mg diarios. El diagnóstico de trabajo fue lupus sistémico eritematoso (LSE). La paciente no tiene actualmente síntomas de LSE, pero tiene AR activa.

30 Hasta la fecha, aunque se han detectado anticuerpos contra ADN-bc en pacientes tratados con cA2, generalmente representan aumentos transitorios y sólo un paciente ha sido sintomático. En pacientes que han tenido suficiente seguimiento, los anticuerpos anti-ADN bc se han solucionado con la interrupción del tratamiento.

35 En resumen, el tratamiento con cA2 es bien tolerado. Las reducciones de la actividad patológica producidas por cA2 son significativas, como apoyan los descubrimientos de una baja tasa de respuesta a placebo. Se obtienen altas tasas de respuesta clínica con un régimen de dosis múltiples de 3 mg/kg de cA2 en combinación con 7,5 mg/semana de metotrexato, y pueden mantenerse durante 2 6 semanas. Este régimen de dosis se considera preferible al régimen de 1 mg/kg más metotrexato debido a que se obtiene una mejor farmacocinética, virtualmente no se detectó respuesta inmune y la respuesta clínica se sostiene mejor después del último tratamiento con cA2. El beneficio clínico obtenido aumentando el régimen de dosis a 10 mg/kg de cA2 más metotrexato es similar al observado con el régimen de 3 mg/kg de cA2 más metotrexato.

40 Por tanto, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con un régimen de dosis múltiples de cA2 como terapia coadyuvante de y/o concomitante con la terapia de metotrexato en pacientes con AR cuya enfermedad está controlada incompletamente por metotrexato, produce una respuesta clínica altamente beneficiosa o sinérgica que puede sostenerse durante 26 semanas. El beneficio producido por cA2 generalmente supera reducciones del 50% de las medidas tradicionales de artritis reumatoide (articulaciones inflamadas y sensibles, valoraciones globales de la enfermedad por paciente y médico) y consigue casi la remisión clínica en muchos pacientes. En consecuencia, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con múltiples infusiones de cA2 como terapia coadyuvante de y/o concomitante con la terapia de metotrexato es un enfoque terapéutico importante y eficaz para tratar la AR en
45 pacientes.

50 EJEMPLO 2. Tratamiento clínico de artritis reumatoide mediante infusión única de un anticuerpo anti-TNF en pacientes que reciben metotrexato

Se realizó un estudio aleatorizado de doble ciego controlado por placebo para evaluar los efectos de una infusión única de placebo, 5, 10 ó 2 0 mg/kg de cA2 en combinación con metotrexato administrado una dosis de 10 mg/semana, en el tratamiento de artritis reumatoide (AR) en pacientes.

Pacientes

55 Se inscribieron en el estudio veintiocho (28) pacientes de AR de tres centros en los Estados Unidos que, a pesar de recibir tres meses de terapia con metotrexato administrado a una dosis estable de 10 mg/semana durante al menos 4 semanas antes del examen, tenían todavía enfermedad activa según los criterios del Colegio Americano de

Reumatología. La enfermedad activa se definió por la presencia de seis o más articulaciones inflamadas más al menos tres de cuatro criterios secundarios (duración de la rigidez matutina ≥ 45 minutos; ≥ 6 articulaciones sensibles o dolorosas; velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE) > 28 mm/hora; proteína C reactiva (PCR) ≥ 20 mg/l).

- 5 Se permitió a los pacientes que tomaban AINE y corticosteroides (prednisona) en el examen continuar a dosis estables (7,5 mg/día).

Infusiones de estudio

- 10 Se suministró el anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF (cA2) en forma de una solución estéril que contenía 5 mg de cA2 por ml de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M en cloruro de sodio 0,15 M con 0,01% de polisorbato 80, pH 7,2. Los viales de placebo contenían albúmina sérica humana al 0,1% en el mismo tampón. Antes del uso, se diluyó la cantidad apropiada de cA2 o placebo en 3 00 ml de solución salina estéril por el farmacéutico, y se administró por vía intravenosa mediante un filtro en línea de 0,2 μ m durante 2 horas. Las características de las bolsas de infusión de placebo y cA2 eran idénticas, y los investigadores y pacientes no sabían cuál infusión se estaba administrando.

Valoraciones

- 15 Se distribuyeron aleatoriamente los pacientes en uno de cuatro grupos de tratamiento (7 pacientes por grupo). Cada uno de los 28 pacientes recibió una dosis única de 0, 5, 10 ó 20 mg/kg de cA2, y se siguieron durante 12 semanas. Los pacientes continuaron el tratamiento con metotrexato (Pharmacochemie, Países Bajos) administrado a 10 mg/semana durante el estudio. Se monitorizaron los efectos adversos en los pacientes durante las infusiones y regularmente después de ellas mediante entrevista, examen físico y ensayos de laboratorio.
- 20 La medida primaria de la respuesta clínica se definió mediante la definición preliminar de respuesta del CAR (Felson et al., *Arthritis Rheumatism* 38(6): 727-735 (1995)). Se consideró que los pacientes tenían respuesta si tenían un 20% de reducción del recuento de articulaciones inflamadas y sensibles y habían experimentado una reducción del 20% en 3 de las 5 valoraciones siguientes: valoración de dolor del paciente (EAV), valoración global de actividad patológica por el paciente (EAV), valoración global de actividad patológica por el médico (EAV), valoración de la función física por el paciente (CES) y un reactivo de fase aguda (VSE) . La VSE se midió en cada sitio de estudio
- 25 con un método estándar (Westergen).

Las evaluaciones se realizaron el día 3, y las semanas 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12.

Resultados

Se distribuyeron aleatoriamente los 28 pacientes en uno de cuatro grupos de tratamiento (o dosis).

- 30 Las tasas de respuesta clínica frente al tiempo mediante el criterio del 20% del CAR en cada uno de los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7. Tasas de respuesta clínica (por el criterio del 20% del CAR) en pacientes que reciben 10 mg/kg de metotrexato

Pacientes evaluados	Placebo	Dosis de cA2			Pacientes tratados con cA2
		5 mg/kg	10 mg/kg	2 0 mg/kg	
	7	7	7	7	21
Pacientes con cualquier respuesta	1 (14,3%)	6 (85,7%)	5 (71,4%)	6 (85,7%)	17 (81,0%)
1 semana	0 (0,0%)	4 (57,1%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	11 (52,4%)
2 semanas	0 (0,0%)	4 (57,1%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)	14 (66,7%)
4 semanas	1 (14,3%)	3 (42,9%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)	13 (61,9%)
6 semanas	0 (0,0%)	3 (42,9%)	5 (71,4%)	4 (57,1%)	12 (57,1%)
8 semanas	1 (14,3%)	3 (42,9%)	4 (57,1%)	4 (57,1%)	11 (52,4%)
10 semanas	1 (14,3%)	1 (14,3%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	8 (38,1%)
12 semanas	1 (14,3%)	2 (28,6%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	9 (42,9%)

El beneficio clínico del tratamiento con cA2 fue evidente en la primera visita de evaluación en la semana uno. Aunque cada una de las 3 dosis de cA2 produjo respuestas clínicas en la mayoría de pacientes tratados, la duración de la respuesta clínica pareció estar mejor sostenida durante 12 semanas en los grupos que recibían 10 ó 20 mg/kg de cA2. La respuesta clínica se consiguió mucho más frecuentemente entre pacientes que recibían cA2 comparado con placebo. Es decir, 17/21 (81%) pacientes en los 3 grupos de cA2 consiguieron una respuesta, comparado con sólo 1/7 (14%) pacientes tratados con placebo. La magnitud de la respuesta clínica fue notable. El recuento medio de articulaciones sensibles entre pacientes tratados con cA2 se redujo de 3 0,1 en la línea base a 13,3 en la semana 12, y la PCR se redujo de 3,0 en la línea base a 1,1 en la semana 12.

La duración de la respuesta clínica parecía ser dependiente de la dosis. 2/6 (33%) de los pacientes que respondían tratados con 5 mg/kg de cA2 sostuvieron una respuesta durante 12 semanas de seguimiento, comparado con 7/11 (64%) de los pacientes que respondían que recibieron 10 ó 20 mg/kg. El tratamiento en todos los grupos fue generalmente bien tolerado.

En resumen, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con cA2 como terapia coadyuvante de y lo concomitante con la terapia de metotrexato es eficaz en la reducción de los signos y síntomas de artritis reumatoide en pacientes cuya enfermedad está controlada incompletamente por metotrexato. Además, la respuesta clínica conseguida mediante este enfoque puede sostenerse durante más de 12 semanas después de un tratamiento único. En consecuencia, los resultados de este estudio indican que el tratamiento con cA2 como terapia coadyuvante de y/o concomitante con la terapia de metotrexato es un enfoque terapéutico importante y eficaz para tratar AR en pacientes.

EJEMPLO 3. Tratamiento clínico de artritis reumatoide mediante la administración repetida de dosis de un anticuerpo anti-TNF en pacientes después de una dosis única. Ensayo de doble ciego controlado por placebo

Se realizó un estudio de etiqueta abierta para evaluar los efectos de infusiones repetidas de cA2 10 mg/kg en combinación con metotrexato administrado a una dosis de 10 mg/semana en el tratamiento de artritis reumatoide en

25 Pacientes

Como se describe en el ejemplo 2, se realizó un estudio de cA2 de 12 semanas aleatorizado de doble ciego controlado por placebo en pacientes de AR que tenían enfermedad activa a pesar de recibir tres meses de terapia con metotrexato administrado a una dosis estable de 10 mg/sem durante al menos 4 semanas antes del examen.

En la semana 12, se ofreció a pacientes que hubieran completado el periodo de evaluación de 12 semanas y no hubieran experimentado eventos adversos que prohibieran infusiones adicionales de cA2, 3 infusiones de etiqueta abierta de cA2 adicionales, administradas a una dosis de 10 mg/kg a intervalos de 8 semanas (semanas 12, 20, 28). Se inscribieron en este estudio veintitrés (23) pacientes del estudio de 12 semanas.

Valoraciones

Se evaluaron 11/23 pacientes que entraron en este estudio de etiqueta abierta en 1 de 3 centros en los Estados Unidos, y se siguieron hasta 40 semanas después de la entrada inicial. Los pacientes continuaron el tratamiento con metotrexato administrado a 10 mg/sem durante el estudio. Los tratamientos repetidos con cA2 fueron generalmente bien tolerados. Tres pacientes tuvieron síntomas transitorios relacionados con la infusión (urticaria, somnolencia).

La medida primaria de respuesta clínica se definió mediante la definición preliminar de respuesta del CAR (Felson et al., *Arthritis Rheumatism* 38(6), 727-735 (1995). Se consideró que los pacientes tenían respuesta si tenían un 20% de reducción del recuento de articulaciones inflamadas y sensibles, y habían experimentado una reducción del 20% en 3 de las 5 valoraciones siguientes: valoración de dolor por el paciente (EAV), valoración global de actividad patológica por el paciente (EAV), valoración global de actividad patológica por el médico (EAV), valoración de la función física por el paciente (CES) y reactivo de fase aguda (VSE). La VSE se midió en cada sitio de estudio con un método estándar (Westergen).

Resultados

De seis pacientes que habían recibido todos cA2 durante el estudio de doble ciego descrito en el ejemplo 2 y respondido durante las 12 semanas de ese estudio, cuatro pacientes sostuvieron una respuesta durante el seguimiento de 40 semanas. De los dos pacientes restantes, un paciente sigue respondiendo en la semana 28, y un paciente entró recientemente en este ensayo de etiqueta abierta. Para los 4 pacientes que completaron las 40 semanas de seguimiento y el paciente en la semana 28, los recuentos finales de articulaciones sensibles fueron 2 y los recuentos de articulaciones inflamadas 1, comparado con una media de 23 y 29, respectivamente, en la entrada en el estudio de doble ciego descrito en el ejemplo 2. Para 4 de estos 5 pacientes, las VSR fueron de 18 mm/h y la PCR 0,7, comparado con una media de 27 y 3,9, respectivamente, a la entrada en el estudio de doble ciego descrito en el ejemplo 2.

De los dos pacientes que habían recibido cA2 durante el estudio de doble ciego descrito en el ejemplo 2 y respondido sólo hasta la semana 10 de ese estudio, un paciente respondió durante 3 6 semanas y un paciente sigue respondiendo en la semana 20.

5 De los tres pacientes que no respondieron durante el estudio de doble ciego descrito en el ejemplo 2 (2 recibieron placebo, 1 recibió 5 mg/kg de cA2), dos de estos pacientes experimentaron una respuesta clínica transitoria, y un paciente sigue respondiendo en la semana 20.

10 En resumen, los resultados preliminares de este estudio sugieren que la terapia coadyuvante y/o concomitante repetida con cA2 en pacientes de AR cuya enfermedad está incompletamente controlada por metotrexato puede dar como resultado una mejora clínica sustancial para una mayoría de los pacientes. Además, la respuesta clínica conseguida por este enfoque puede sostenerse durante hasta 40 semanas de seguimiento. En consecuencia, los resultados de este estudio indican que el tratamiento repetido con cA2 como terapia coadyuvante de y/o concomitante con la terapia de metotrexato es un enfoque terapéutico importante y eficaz para tratar AR en pacientes.

Las realizaciones de la descripción pueden incluir las características de los siguientes puntos numerados.

- 15 1. Un método para tratar o prevenir una enfermedad mediada por el factor de necrosis tumoral en un individuo en necesidad de ello, que comprende co-administrar metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o fragmento del mismo al individuo, en cantidades terapéuticamente eficaces.
2. Un método del punto 1, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y el metotrexato se administran simultáneamente.
- 20 3. Un método del punto 1, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y el metotrexato se administran secuencialmente.
4. Un método del punto 1, en donde la enfermedad mediada por el factor de necrosis tumoral se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad autoinmune, enfermedad inmune aguda o crónica, enfermedad inflamatoria y enfermedad neurodegenerativa.
- 25 5. Un método del punto 4, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral se administra en dosis múltiples.
6. Un método del punto 5, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es un anticuerpo quimérico.
7. Un método del punto 6, en donde el anticuerpo quimérico se une a uno o más aminoácidos de hTNF α seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente los 87-108 y aproximadamente los 59-80.
8. Un método del punto 6, en donde el anticuerpo quimérico se une al epítipo de cA2.
- 30 9. Un método del punto 8, en donde el anticuerpo quimérico es cA2.
10. Un método para tratar o prevenir artritis reumatoide en un individuo con necesidad de ello, que comprende administrar conjuntamente metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral al individuo, en cantidades terapéuticamente eficaces.
- 35 11. Un método del punto 10, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y el metotrexato se administran simultáneamente.
12. Un método del punto 10, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y el metotrexato se administran secuencialmente.
13. Un método del punto 10, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral se administra en dosis múltiples.
14. Un método del punto 13, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es un anticuerpo quimérico.
- 40 15. Un método del punto 14, en donde el anticuerpo quimérico se une a uno o más aminoácidos de hTNF α seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente los 87-108 y aproximadamente los 59-80.
16. Un método del punto 14, en donde el anticuerpo quimérico se une al epítipo de cA2.
17. Un método del punto 16, en donde el anticuerpo quimérico es cA2.
- 45 18. Un método para tratar o prevenir enfermedad de Crohn en un individuo con necesidad de ello, que comprende administrar conjuntamente metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral al individuo, en cantidades terapéuticamente eficaces.
19. Un método del punto 18, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y el metotrexato se administran simultáneamente.

20. Un método del punto 18, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y el metotrexato se administran secuencialmente.
21. Un método del punto 18, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral se administra en dosis múltiples.
22. Un método del punto 21, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es un anticuerpo quimérico.
- 5 23. Un método del punto 22, en donde el anticuerpo quimérico se une a uno o más aminoácidos de hTNF α seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente los 87-108 y aproximadamente los 59-80.
24. Un método del punto 22, en donde el anticuerpo quimérico se une al epítipo de cA2.
25. Un método del punto 22, en donde el anticuerpo quimérico es cA2.
- 10 26. Una composición que comprende metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o fragmento del mismo.
27. Una composición del punto 26, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es un anticuerpo quimérico.
28. Una composición del punto 27, en donde el anticuerpo quimérico se une a uno o más aminoácidos de hTNF α seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente los 87-108 y aproximadamente los 59-80.
- 15 29. Una composición del punto 27, en donde el anticuerpo quimérico se une al epítipo de cA2.
30. Una composición del punto 29, en donde el anticuerpo quimérico es cA2.
31. Un método para tratar o prevenir una enfermedad mediada por factor de necrosis tumoral en un individuo con necesidad de ello, que comprende administrar conjuntamente metotrexato y un antagonista del factor de necrosis tumoral al individuo, en cantidades terapéuticamente eficaces.
- 20 32. Uso de metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o fragmento del mismo para la fabricación de medicamentos administrables conjunta o secuencialmente, para tratar o prevenir una enfermedad mediada por factor de necrosis tumoral en un individuo.
- 25 33. El uso del punto 32, para el tratamiento de enfermedades mediadas por factor de necrosis tumoral seleccionadas de enfermedad autoinmune, enfermedad inmune aguda o crónica, enfermedad inflamatoria y enfermedad neurodegenerativa.
34. Uso de metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o fragmento del mismo para la fabricación de medicamentos administrables conjunta o secuencialmente, para tratar o prevenir artritis reumatoide en un individuo.
- 30 35. Uso de metotrexato y un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral o fragmento del mismo para la fabricación de medicamentos administrables conjunta o secuencialmente, para tratar o prevenir la enfermedad de Crohn en un individuo.
36. El uso del punto 32, 34 o 35, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es un anticuerpo quimérico.
37. El uso del punto 32, 34 o 35, en donde el anticuerpo quimérico se une a uno o más aminoácidos de hTNF α seleccionados del grupo que consiste en aproximadamente los 87-108 y aproximadamente los 59-80.
38. El uso del punto 32, 34 o 35, en donde el anticuerpo quimérico se une al epítipo de cA2.
- 35 39. El uso del punto 32, 34 o 35, en donde el anticuerpo quimérico es cA2.
40. Uso de metotrexato y un antagonista de factor de necrosis tumoral para la fabricación de medicamentos para tratar o prevenir una enfermedad mediada por factor de necrosis tumoral en un individuo con necesidad de ello.
- 40 41. Uso de metotrexato y un anticuerpo monoclonal anti-factor de necrosis tumoral o fragmento del mismo para la fabricación de medicamentos separados administrables conjuntamente para tratar una enfermedad mediada por el factor de necrosis tumoral humano en un individuo, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo (a) se une a un epítipo sobre factor de necrosis tumoral- α humano y (b) inhibe la unión de factor de necrosis tumoral- α humano a los receptores de factor de necrosis tumoral- α humano situados en la superficie de la célula.
- 45 42. El uso del punto 41, en donde los medicamentos administrables conjuntamente son para uso en un régimen terapéutico para tratar artritis reumatoide en un individuo, en donde en el régimen terapéutico (a) el medicamento que contiene metotrexato es para administrarse semanalmente, y (b) el medicamento que contiene el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α humano o un fragmento del mismo es para administrarse múltiples veces, donde cada una de estas administraciones (i) está separada de la administración previa por un intervalo de dos a ocho

semanas, y (ii) libera 10 mg o menos por kg de peso corporal del individuo del anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo.

- 5 43. Uso de un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α humano o fragmento del mismo para la fabricación de un medicamento para efectuar terapia coadyuvante con metotrexato en un individuo que padece artritis reumatoide y que recibe semanalmente un medicamento que contiene metotrexato, en donde en la terapia coadyuvante el medicamento que contiene anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α humano o un fragmento de dicho anticuerpo es para administrarlo al individuo múltiples veces, donde cada una de estas administraciones (i) está separada de la administración previa por un intervalo de dos a ocho semanas, y (ii) libera 10 mg o menos por kg de peso corporal del individuo del anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo.
- 10 44. El uso del punto 43, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo (a) se une a un epítipo sobre factor de necrosis tumoral- α humano y (b) inhibe la unión de factor de necrosis tumoral- α humano a los receptores de factor de necrosis tumoral- α humano situados en la superficie de la célula.
- 15 45. El uso de cualquiera de los puntos 41-44, en donde cada administración del medicamento que contiene metotrexato suministra 7,5 mg o más de metotrexato; opcionalmente, en donde cada administración del medicamento que contiene metotrexato suministra 10 mg o más de metotrexato; y más opcionalmente en donde cada administración del medicamento que contiene metotrexato suministra de 10 mg a 15 mg de metotrexato.
- 20 46. El uso de cualquiera de los puntos 41, 44, o 45, en donde cada administración del medicamento que contiene anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo suministra 10 mg o menos por kg de peso corporal del individuo del anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo; y opcionalmente en donde cada administración del medicamento que contiene anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo suministra 3 mg por kg o menos por kg de peso corporal del individuo del anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo.
- 25 47. El uso de cualquiera de los puntos 41 a 46, en donde una administración previa del medicamento que contiene anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo está separada de dicha administración posterior por:
- (a) un intervalo de dos a cuatro semanas; o
 - (b) un intervalo de dos semanas; o
 - (c) un intervalo de cuatro semanas.
- 30 48. El uso de cualquiera de los puntos 41-47, en donde cada administración del medicamento que contiene anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo (a) suministra 10 mg por kg de peso corporal del individuo del anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo, y (b) está separada por un intervalo de cuatro a ocho semanas desde la administración previa.
- 35 49. Uso de metotrexato y un factor de necrosis tumoral- α humano receptor o fragmento funcional del mismo soluble para la fabricación de medicamentos separados administrables conjuntamente para tratar una enfermedad mediada por el factor de necrosis tumoral humano en un individuo, en donde el factor de necrosis tumoral- α humano receptor o fragmento funcional del mismo soluble (a) se une a un epítipo sobre factor de necrosis tumoral- α humano y (b) inhibe la unión de factor de necrosis tumoral- α humano a los receptores de factor de necrosis tumoral- α situados en la superficie de la célula.
- 40 50. El uso según el punto 49, en donde el receptor de factor- α de necrosis tumoral p75 soluble es una molécula multimérica.
- 45 51. El uso de cualquiera de los puntos 49 o 50, en donde el receptor de factor- α de necrosis tumoral soluble es:
- (a) una proteína de fusión de factor- α de necrosis tumoral soluble-inmunorreceptor fusion protein; y/o
 - (b) el receptor p55 o p75; y/o
 - (c) una proteína de fusión receptor de factor- α de necrosis tumoral p75 /IgG.
- 50 52. El uso del punto 41 a 51, en donde la enfermedad mediada por factor de necrosis tumoral es:
- (a) una enfermedad neurodegenerativa, psoriasis, o espondilitis anquilosante; o
 - (b) una artritis y en cuyo caso opcionalmente es artritis reumatoide o se selecciona de artritis crónica juvenil, artritis de células gigantes, artritis psoriática, artritis enteropática, artritis reactiva y artritis asociada con la enfermedad inflamatoria intestinal; o
 - (c) es enfermedad de Crohn; o

(d) es una enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante.

53. El uso de cualquiera de los puntos 41 a 52, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α o fragmento del mismo es:

(a) un anticuerpo; y/o

5 (b) un anticuerpo quimérico; y/o

(c) un anticuerpo quimérico que se une a uno o más aminoácidos de un factor de necrosis tumoral- α humano seleccionado del grupo de aminoácidos consecutivos en aproximadamente las posiciones 87-108 o en aproximadamente las posiciones 59-80; y/o

(d) un anticuerpo quimérico que se una al epítipo reconocido por cA2; y/o

10 (e) un anticuerpo quimérico que es cA2.

54. El uso de cualquiera de los puntos 41 to 52, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.

55. El uso de cualquiera de los puntos 41 a 54, en donde el medicamento que contiene el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral- α humano o un fragmento de dicho anticuerpo o el receptor del factor de necrosis tumoral- α humano soluble se administra vía infusión.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista del factor de necrosis tumoral para la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral está indicado para su administración como terapia coadyuvante de terapia metotrexato, y donde el antagonista del factor de necrosis tumoral es
- 5 i) un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral, o
- ii) un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral es un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es monoclonal.
4. Uso según la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es quimérico.
5. Uso según la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral es humanizado.
6. Uso según la reivindicación 1, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral es un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.
- 15 7. Uso según la reivindicación 1, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral comprende una forma truncada del receptor de TNF p55 que comprende los dominios extracelulares, o una forma truncada del receptor de TNF p75 que comprende los dominios extracelulares.
8. Uso según la reivindicación 6, en donde el receptor soluble o el fragmento del mismo es una molécula multimérica que comprende todo a una porción del dominio extracelular de dos o más receptores de TNF unidos a través de uno o más enlazadores polipeptídicos.
- 20 9. Uso según la reivindicación 6, en donde el receptor soluble o el fragmento del mismo es una molécula de fusión inmunorreceptor de TNF, o un fragmento o una porción de la misma, que comprende al menos una porción de una o más moléculas de inmunoglobulina y todo o una porción funcional de uno o más receptores de TNF.
- 25 10. Uso según la reivindicación 1, para tratamiento de artritis reumatoide.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antagonista de TNF está indicado para administración en dosis múltiples.
12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antagonista de TNF está indicado para administración en una dosis única.
- 30 13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el metotrexato está indicado para administración en dosis múltiples.
14. Uso según la reivindicación 13, en donde el metotrexato está indicado para administración en forma de una serie de dosis bajas separadas por intervalos de días o semanas.
- 35 15. Un antagonista del factor de necrosis tumoral para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, o artritis psoriática, en donde el antagonista del factor de necrosis tumoral está indicado para su administración como terapia coadyuvante de terapia metotrexato, y donde el antagonista del factor de necrosis tumoral es
- i) un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral, o
- 40 ii) un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.
16. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 15, que es un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.
- 45 17. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 16, que es un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y es monoclonal.
18. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 16, que es un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y es quimérico.

19. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 16, que es un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral y es humanizado.
20. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 15, que es un receptor de factor de necrosis tumoral soluble, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a factor de necrosis tumoral.
- 5 21. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 20, en donde el receptor del factor de necrosis tumoral soluble, o el fragmento del mismo, comprende una forma truncada del receptor de TNF p55 que comprende los dominios extracelulares, o una forma truncada del receptor de TNF p75 que comprende los dominios extracelulares.
- 10 22. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 20, en donde el receptor del factor de necrosis tumoral soluble, o el fragmento del mismo, es una molécula multimérica que comprende todo o una porción funcional del dominio extracelular de dos o más receptores de TNF unido por uno o más enlazadores polipeptídicos.
- 15 23. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 20, en donde el receptor del factor de necrosis tumoral soluble, o el fragmento del mismo, es una molécula de fusión inmunorreceptor de TNF, o un fragmento o una porción de la misma, que comprende al menos una porción de una o más moléculas de inmunoglobulina y todo o una porción funcional de uno o más receptores de TNF.
24. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 15, para uso en el tratamiento de artritis reumatoide.
25. El antagonista del factor de necrosis tumoral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, para administración en múltiples dosis.
- 20 26. El antagonista del factor de necrosis tumoral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, para administración en una dosis única.
27. El antagonista del factor de necrosis tumoral según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, en donde el metotrexato está indicado para administración en múltiples dosis.
- 25 28. El antagonista del factor de necrosis tumoral según la reivindicación 27, en donde el metotrexato está indicado para administración en forma de una serie de dosis bajas separadas por intervalos de días o semanas

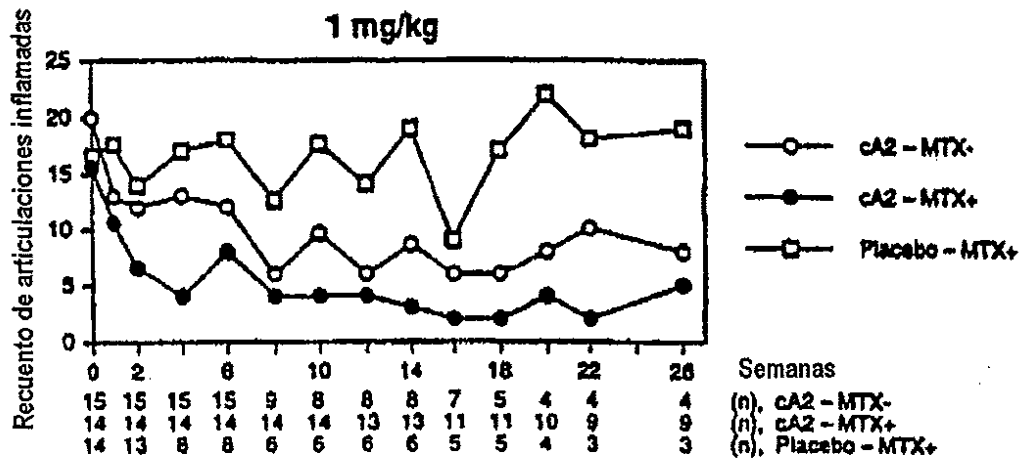


FIGURA 1A

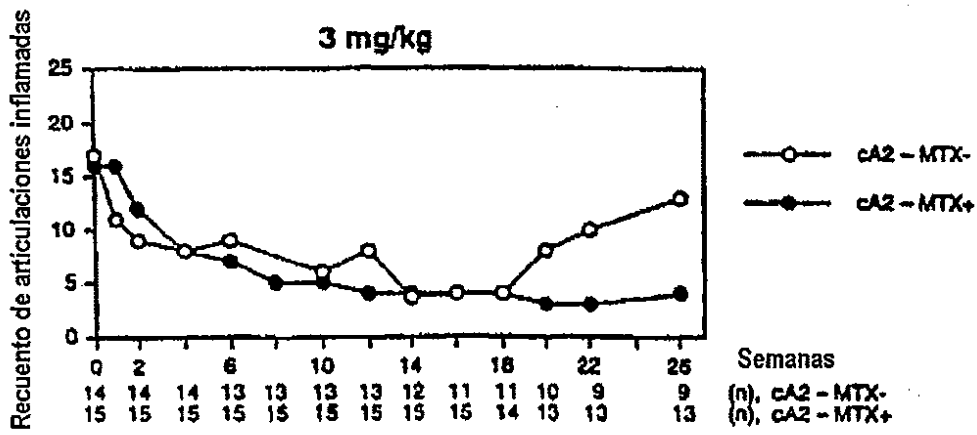


FIGURA 1B

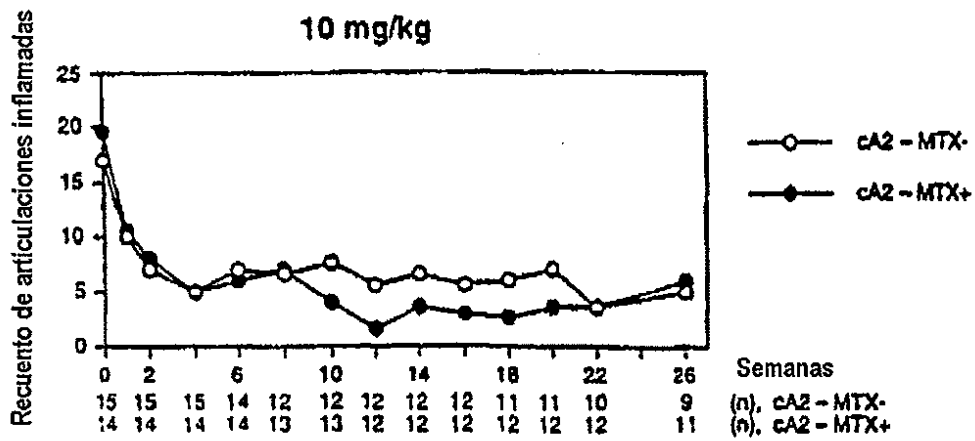


FIGURA 1C

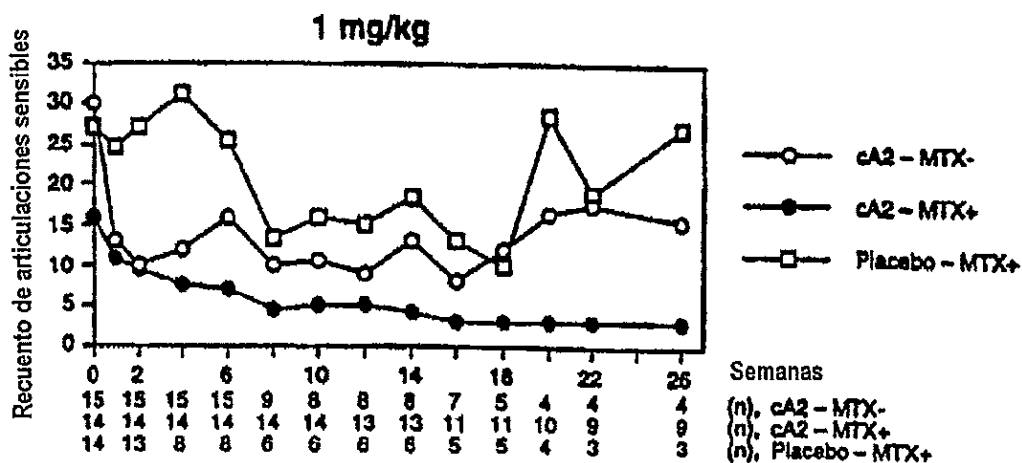


FIGURA 2A

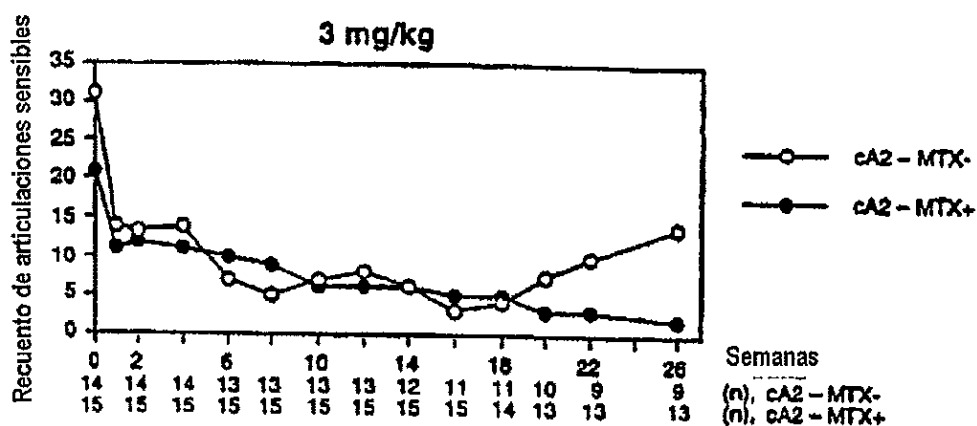


FIGURA 2B

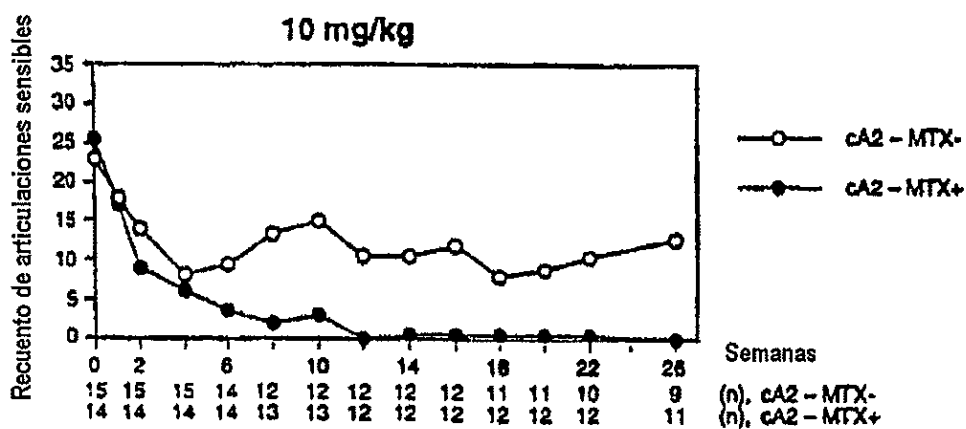


FIGURA 2C

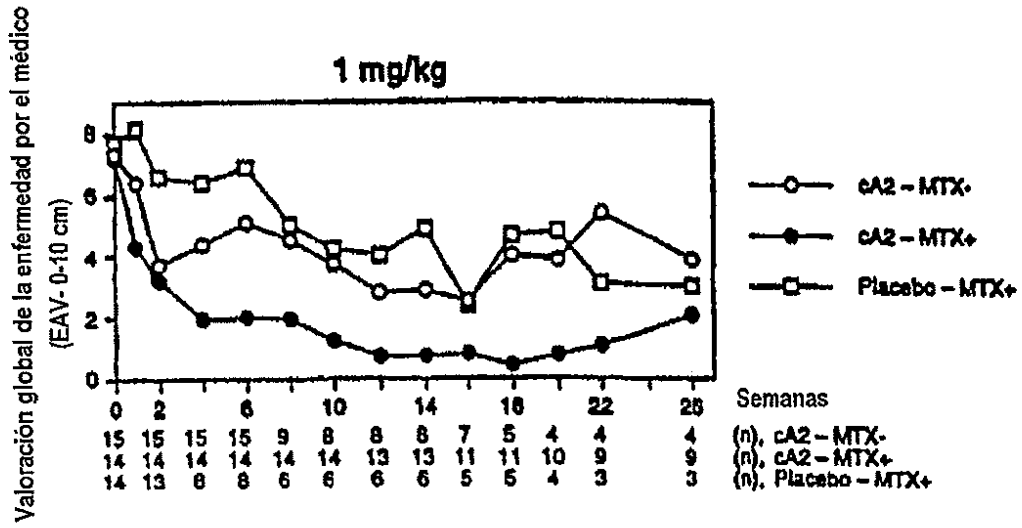


FIGURA 3A

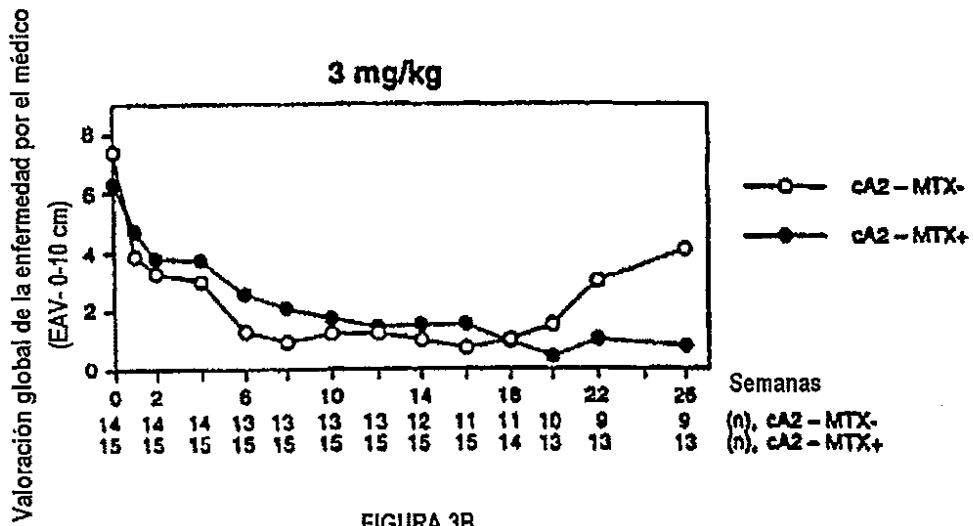


FIGURA 3B

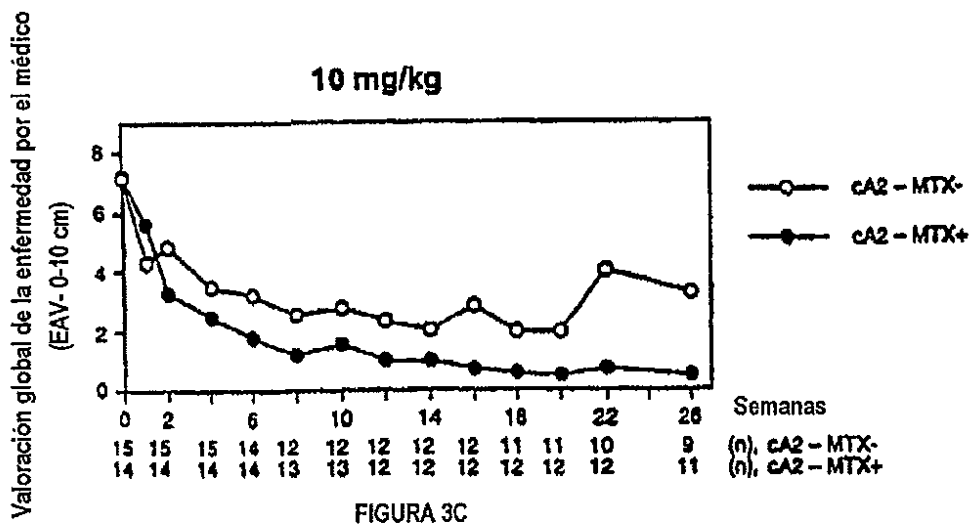


FIGURA 3C

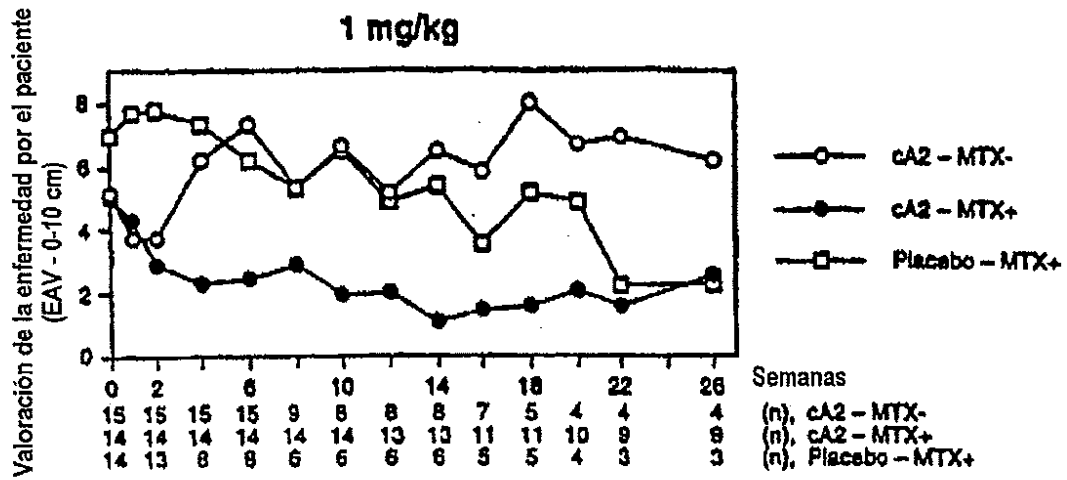


FIGURA 4A

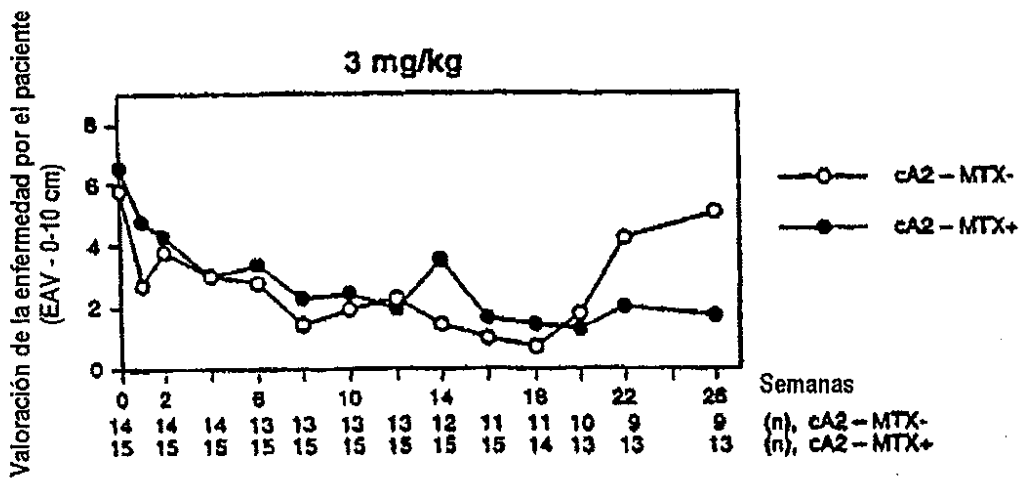


FIGURA 4B

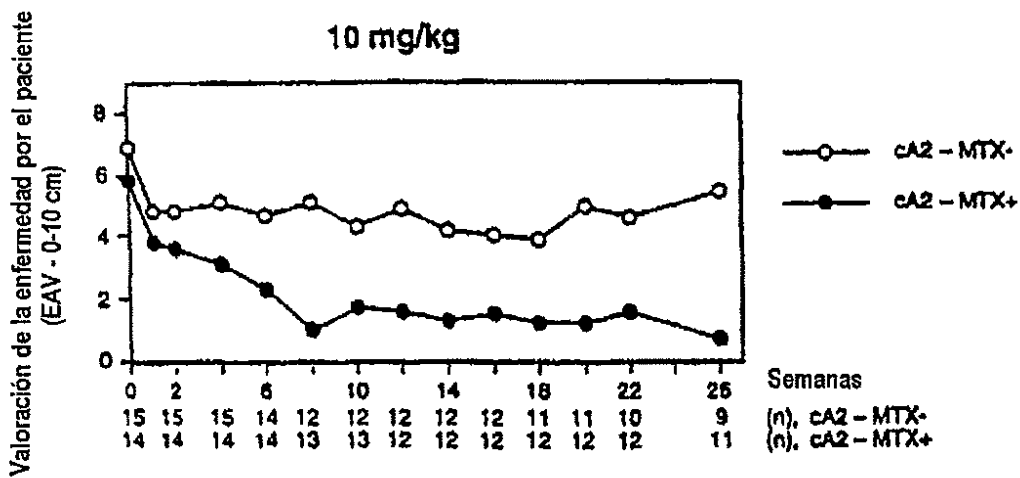


FIGURA 4C

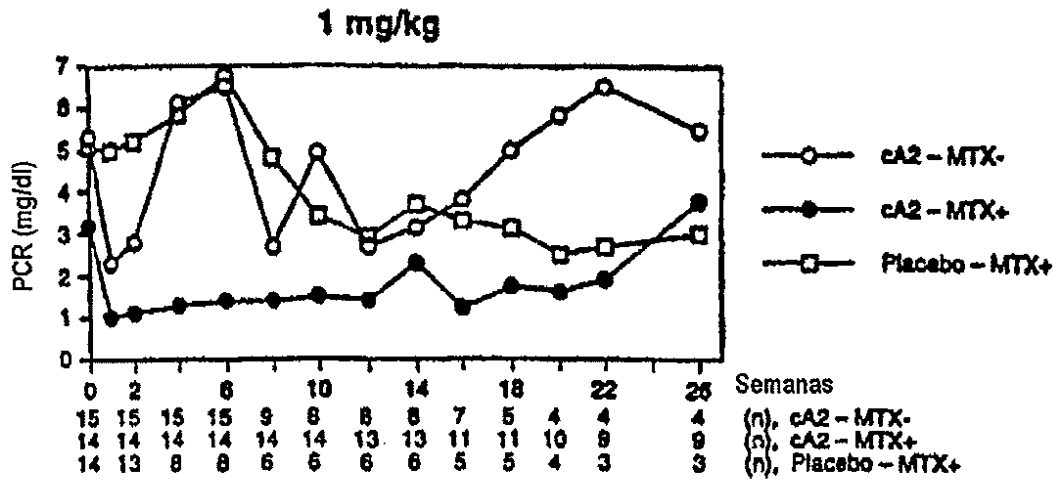


FIGURA 5A

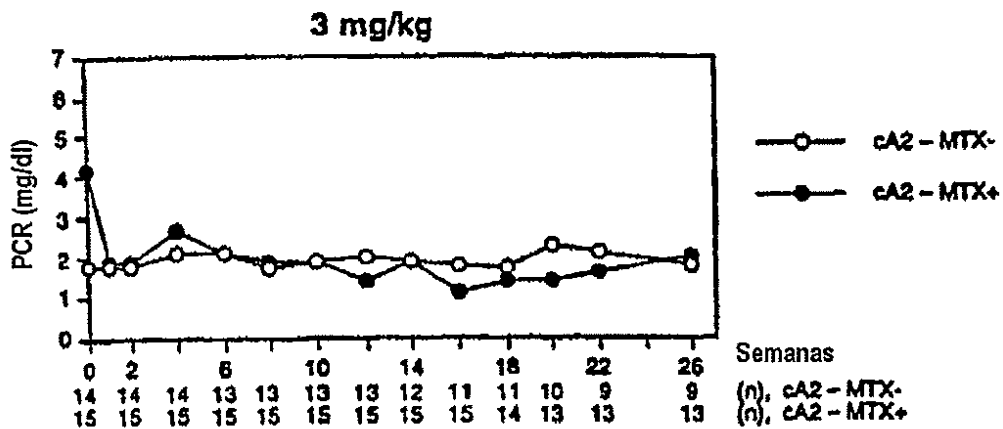


FIGURA 5B

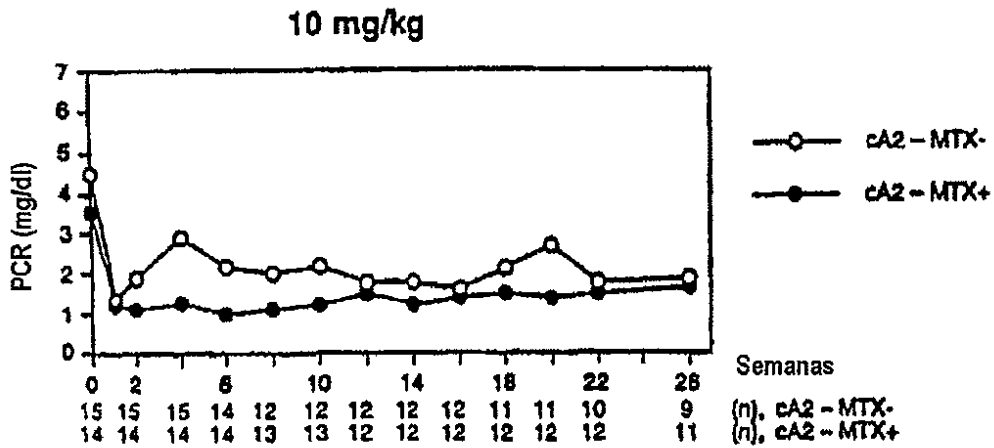


FIGURA 5C

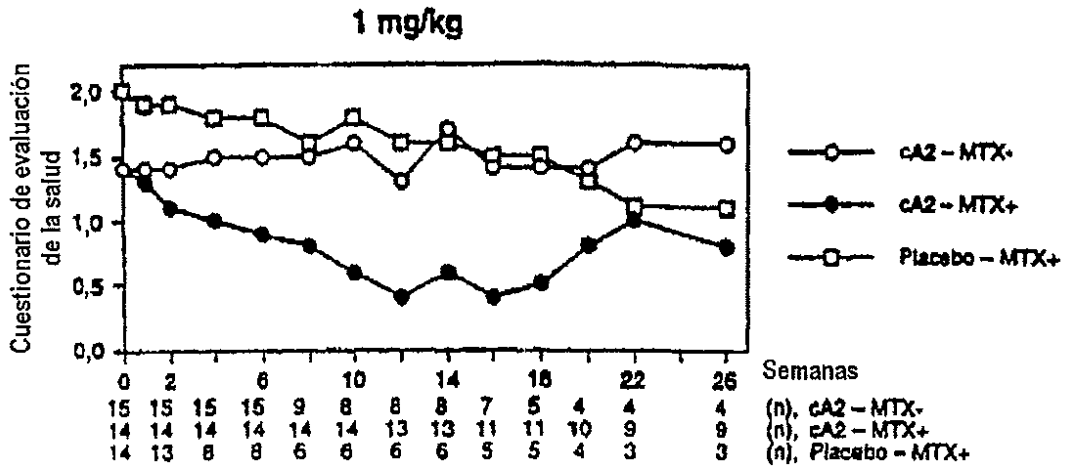


FIGURA 6A

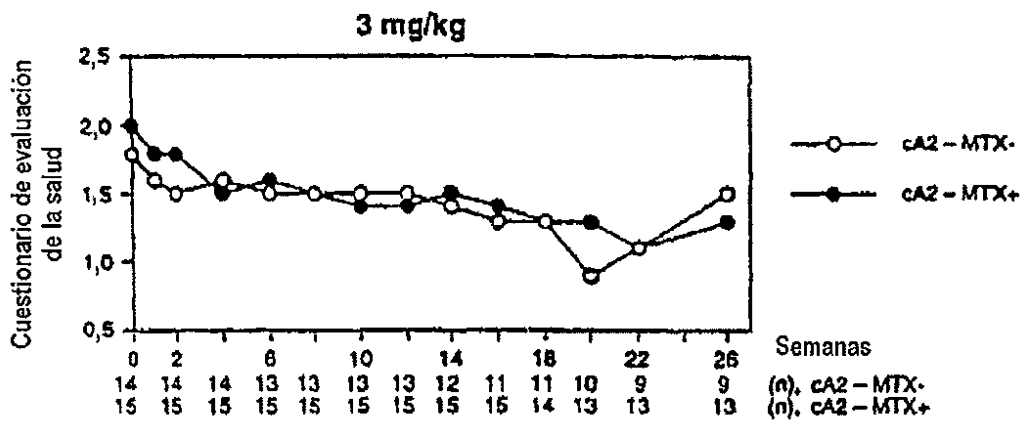


FIGURA 6B

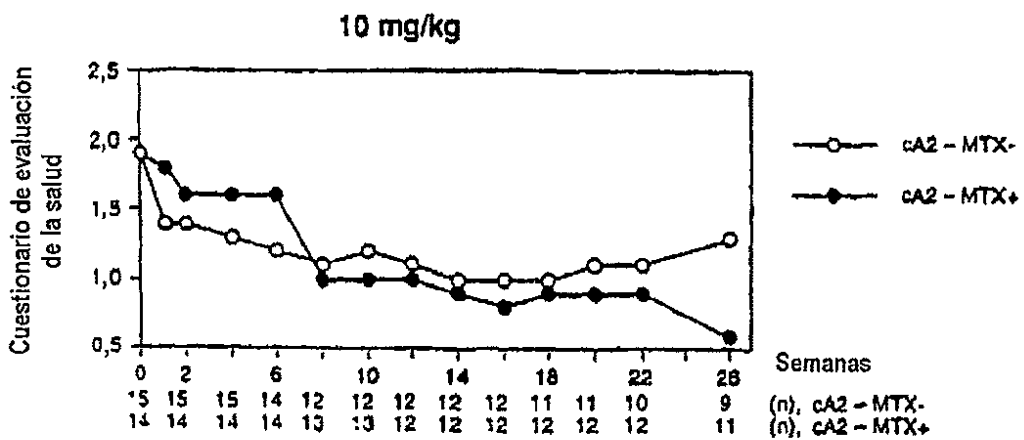


FIGURA 6C

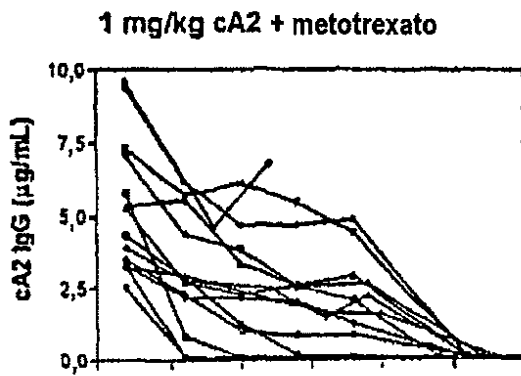


FIGURA 7A

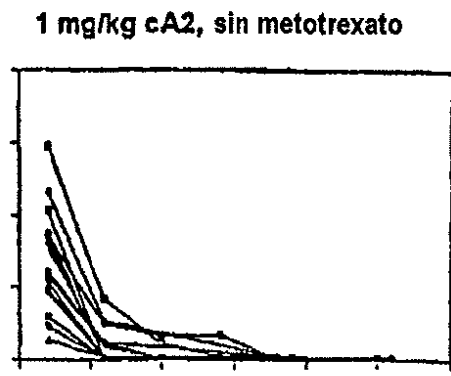


FIGURA 7B

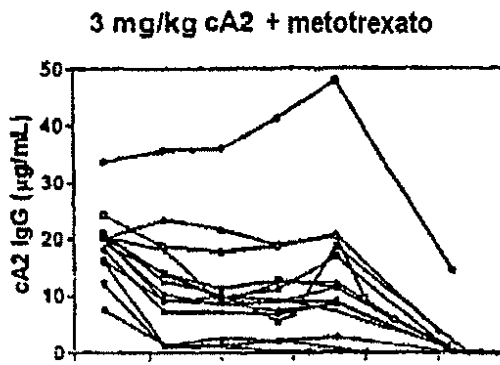


FIGURA 7C

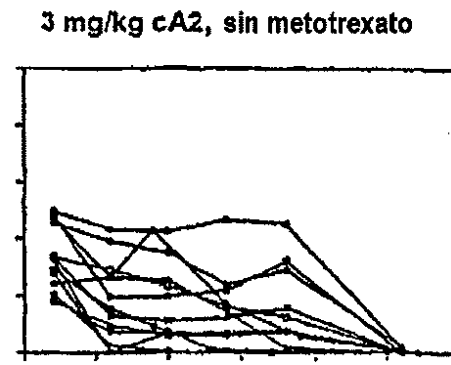
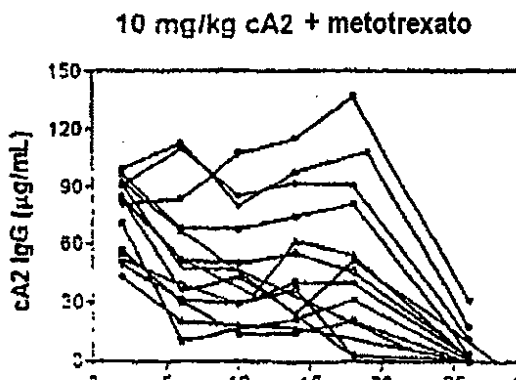
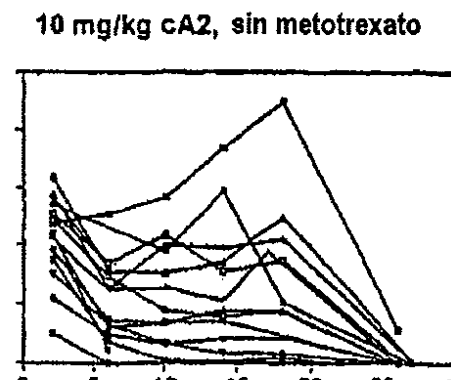


FIGURA 7D



Infusiones: ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
Semanas después de infusión nº 1

FIGURA 7E



Infusiones: ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
Semanas después de infusión nº 1

FIGURA 7F

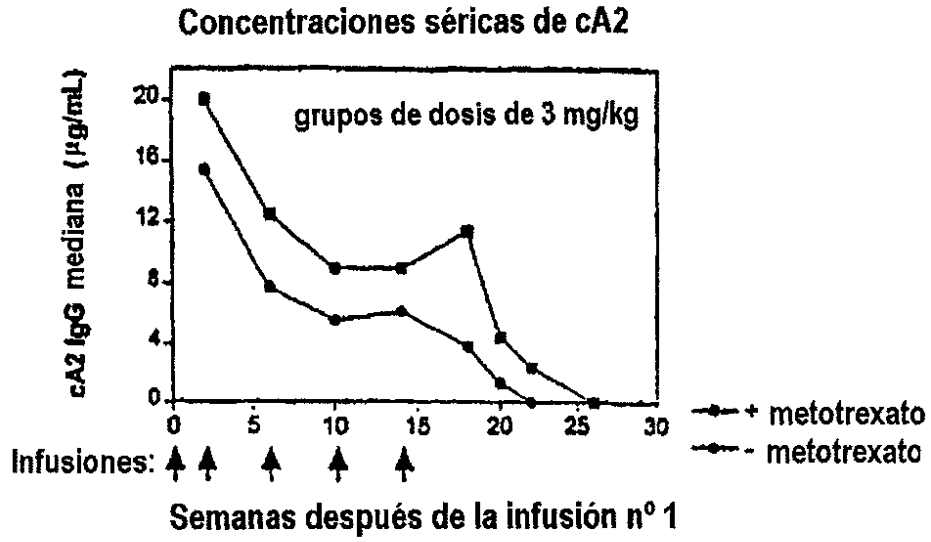


FIGURA 8A

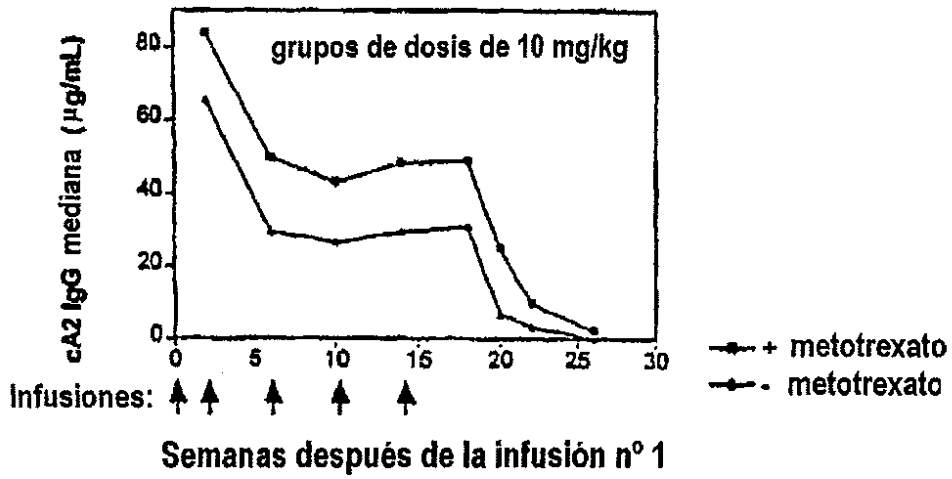


FIGURA 8B