

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 458**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2002 E 02741849 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1406656**

54 Título: **Métodos de administración de anticuerpos anti-TNF-alfa**

30 Prioridad:

08.06.2001 US 296961 P

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

10.04.2013

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD (100.0%)
CLARENDON HOUSE, 2 CHURCH STREET
HM 11 HAMILTON, BM**

72 Inventor/es:

**KEMPENI, JOACHIM;
WEISS, ROBERTA y
FISCHKOFF, STEVEN, A.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 400 458 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

Métodos de administración de anticuerpos anti-TNF-alfa.

5 **Antecedentes de la invención**

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citoquina producida por numerosos tipos celulares, incluyendo monocitos y macrófagos, que fue originalmente identificada en base a su capacidad para inducir la necrosis de ciertos tumores murinos (véase, *v.g.*, Old, L. (1985), *Science* 230: 630-632). Posteriormente, se vio que un factor denominado caquectina, asociado a caquexia, era la misma molécula que el TNF α . Se ha implicado al TNF α en la mediación del shock (véanse, *v.g.*, Beutler, B. y Cerami, A. (1988), *Annu. Rev. Biochem.* 57: 505-518, y Beutler, B. y Cerami, A. (1989), *Annu. Rev. Immunol.* 7: 625-655). Más aún, se ha implicado al TNF α en la fisiopatología de una variedad de otras enfermedades y trastornos humanos, incluyendo la sepsis, las infecciones, las enfermedades autoinmunes, el rechazo de trasplantes y la enfermedad del injerto frente al huésped (véanse, *v.g.*, Vasilli, P. (1992), *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452, y Tracey, K.J. y Cerami, A. (1994), *Annu. Rev. Med.* 45: 491-503).

Debido al papel perjudicial del TNF α humano (hTNF α) en una variedad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad del hTNF α . En particular, se han buscado anticuerpos que se unan al hTNF α y lo neutralicen como medio para inhibir la actividad del hTNF α . Algunos de los primeros de esos anticuerpos eran anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón, segregados por hibridomas preparados a partir de linfocitos de ratones inmunizados con hTNF α (véanse *v.g.*, Hahn T. *et al.* (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3814-3818; Liang, C-M. *et al.* (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 847-854; Hirai, M. *et al.* (1987), *J. Immunol. Methods* 96: 57-62; Fendly, B.M. *et al.* (1987), *Hybridoma* 6: 359-370; Möller, A. *et al.* (1990), *Cytokine* 2: 162-169; Patente EE.UU. N° 5.231.024 de Moeller *et al.*; Publicación de Patente Europea N° 186.833 B1 de Wallach, D.; Publicación de Solicitud de Patente Europea N° 218.868 A1 de Old *et al.*; y Publicación de Patente Europea N° 260.610 B1 de Moeller, A. *et al.*). Aunque estos anticuerpos anti-hTNF α de ratón con frecuencia exhibían una alta afinidad por el hTNF α (*v.g.*, $K_d \leq 10^{-9}$ M) y eran capaces de neutralizar la actividad del hTNF α , su uso *in vivo* puede verse limitado por problemas asociados a la administración de anticuerpos murinos a humanos, tales como una corta vida media en suero, una incapacidad para disparar ciertas funciones efectoras humanas y provocación de una respuesta inmune no deseada frente al anticuerpo murino en un humano (la reacción del "anticuerpo humano antirratón" (HAMA)).

En un intento de solventar los problemas asociados al uso de anticuerpos totalmente murinos en humanos, se han producido anticuerpos murinos anti-hTNF α por ingeniería genética para que sean más "de tipo humano". Por ejemplo, se han preparado anticuerpos quiméricos, en donde las regiones variables de las cadenas del anticuerpo derivan de ratón y las regiones constantes de las cadenas del anticuerpo derivan de humano (Knight, D.M. *et al.* (1993), *Mol. Immunol.* 30: 1443-1453; Publicación PCT N° WO 92/16553 de Daddona, P.E. *et al.*). Adicionalmente, se han preparado también anticuerpos humanizados, en donde los dominios hipervariables de las regiones variables del anticuerpo derivan de ratón, pero el resto de las regiones variables y las regiones constantes del anticuerpo derivan de humano (Publicación PCT N° WO 92/11383 de Adair, J.R. *et al.*). Sin embargo, dado que estos anticuerpos quiméricos y humanizados aún conservan algunas secuencias murinas, aún pueden provocar una reacción inmune no deseada, la reacción del anticuerpo humano anti-quimérico (HACA), especialmente cuando se administran durante períodos de tiempo prolongados, *v.g.*, para indicaciones crónicas, tales como la artritis reumatoide (véanse, *v.g.*, Elliott, M.J. *et al.* (1994), *Lancet* 344: 1125-1127; Elliot, M.J. *et al.* (1994), *Lancet* 344: 1105-1110).

Un agente inhibidor del hTNF α preferido para mAb murinos o sus derivados (*v.g.*, anticuerpos quiméricos o humanizados) sería un anticuerpo anti-hTNF α enteramente humano, ya que dicho agente no debería provocar la reacción HAMA, incluso al utilizarlo durante períodos de tiempo prolongados. Se han preparado autoanticuerpos monoclonales humanos frente al hTNF α usando técnicas de hibridomas humanos (Boyle, P. *et al.* (1993), *Cell. Immunol.* 152: 556-568; Boyle, P. *et al.* (1993), *Cell. Immunol.* 152: 569-581; Publicación de Solicitud de Patente Europea N° 614.984 A2 de Boyle *et al.*). Sin embargo, se dijo que estos autoanticuerpos monoclonales derivados de hibridoma tenían una afinidad por el hTNF α demasiado baja como para calcularla por métodos convencionales, que no eran capaces de unirse al hTNF α soluble y que no eran capaces de neutralizar la citotoxicidad inducida por el hTNF α (véase Boyle *et al.*, antes citado). Más aún, el éxito de la técnica de hibridomas humanos depende de la presencia natural en la sangre periférica humana de linfocitos productores de autoanticuerpos específicos para hTNF α . Ciertos estudios han detectado autoanticuerpos séricos frente al hTNF α en sujetos humanos (Fomsgaard, A. *et al.* (1989), *Scand. J. Immunol.* 30: 219-223; Bendtzen, K. *et al.* (1990), *Prog. Leukocyte Biol.* 10B: 447-452), mientras que otros no lo han hecho (Leusch, H-G. *et al.* (1991), *J. Immunol. Methods* 139: 145-147).

Una alternativa a los anticuerpos humanos anti-hTNF α naturales sería un anticuerpo hTNF α recombinante. Se han

descrito anticuerpos humanos recombinantes que se unen a hTNF α con relativamente baja afinidad (es decir, con una $K_d \sim 10^{-7}$ M) y una rápida velocidad de disociación (es decir, $K_{off} \sim 10^{-2}$ s $^{-1}$) (Griffiths, A.D. *et al.* (1993), EMBO J. 12: 725-734). Sin embargo, debido a su relativamente rápida cinética de disociación, estos anticuerpos pueden no ser adecuados para uso terapéutico. Adicionalmente, se ha descrito un anti-hTNF α humano recombinante que no neutraliza la actividad hTNF α , sino que más bien aumenta la unión del hTNF α a la superficie de las células y aumenta la interiorización del hTNF α (Lidbury, A. *et al.* (1994), Biotechnol. Ther. 5: 27-45; Publicación PCT N° WO 92/03145 de Aston, R. *et al.*)

También se han descrito anticuerpos humanos recombinantes que se unen al hTNF α soluble con una alta afinidad y una lenta cinética de disociación y que tienen la capacidad de neutralizar la actividad hTNF α , incluyendo la citotoxicidad inducida por el hTNF α (*in vitro* e *in vivo*) y la activación celular inducida por el hTNF α (véase la Patente EE.UU. N° 6.090.382). Los protocolos típicos para la administración de anticuerpos son realizados intravenosamente sobre una base semanal. La dosificación semanal con anticuerpos y/o cualquier fármaco puede ser costosa e incómoda y dar como resultado un aumento en el número de efectos colaterales debidos a la frecuencia de administración. La administración intravenosa también tiene limitaciones, en el sentido de que la administración es habitualmente proporcionada por alguien con entrenamiento médico.

Schattenkirchner *et al.* (ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 43, número S9, Suplemento: ACR, Septiembre de 2000, página S228, resumen 968) describen el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide activa utilizando 1 mg/kg de D2E7 por vía subcutánea generalmente en semanas alternas.

Rau *et al.* (ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 42, n° 9, supl., Septiembre de 1999, página S400, resumen 1978) describen el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide activa utilizando de 0,5 a 10 mg/kg de D2E7 por vía intravenosa generalmente en semanas alternas.

Rau *et al.* (AKTUELLE RHEUMATOLOGIE, vol. 25, n° 3, 2000, páginas 83-88) describen el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide activa utilizando 0,5 y 1 mg/kg de D2E7 subcutáneamente cada semana.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones que contienen una cantidad de 40 mg de un anticuerpo anti-TNF α humano para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes por vía subcutánea mediante regímenes de dosificación quincenales. La cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva que se ha de utilizar es de 40 mg. La dosificación quincenal tiene muchas ventajas sobre la dosificación semanal, incluyendo, aunque sin limitación, un menor número de inyecciones totales, un menor número de reacciones en el sitio de inyección (*v.g.*, dolor e hinchazón locales), un mayor cumplimiento del paciente (es decir, debido a inyecciones menos frecuentes) y un menor coste para el paciente, así como para el profesional sanitario. La dosificación subcutánea es ventajosa, ya que el paciente puede autoadministrarse una sustancia terapéutica, *v.g.*, un anticuerpo para el TNF α humano, lo cual es conveniente tanto para el paciente como para el profesional sanitario.

Esta descripción proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial. La invención incluye la administración quincenal, por inyecciones subcutáneas, de anticuerpos anti-TNF α a un sujeto. Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos humanos recombinantes que se unen específicamente al TNF α humano. Estas composiciones pueden ser utilizadas para una terapia de combinación en la que se administran anticuerpos humanos a un sujeto con otro agente terapéutico, tal como uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros blancos (*v.g.*, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular), una o más citoquinas, receptor de TNF α soluble (véase, *v.g.*, la Publicación PCT N° WO 94/06476) y/o uno o más agentes químicos que inhiben la producción o la actividad del hTNF α (como derivados de ciclohexanilideno, tal como se describe en la Publicación PCT N° WO 93/19751), preferiblemente el metotrexato. Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos humanos recombinantes que se unen específicamente al TNF α humano. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por unirse al hTNF α con una alta afinidad y una lenta cinética de disociación y por neutralizar la actividad del hTNF α , incluyendo la citotoxicidad inducida por el hTNF α (*in vitro* e *in vivo*) y la activación celular inducida por el hTNF α . Los anticuerpos pueden ser de longitud total (*v.g.*, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender sólo una porción de unión a antígeno (*v.g.*, un fragmento o dominio único Fab, F(ab') $_2$ o scFv). El anticuerpo recombinante más preferido de la invención, denominado D2E7, tiene un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 y un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 (expuesta en el Apéndice B). Preferiblemente, el anticuerpo D2E7 tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. Estos anticuerpos están descritos en la Patente EE.UU. N° 6.090.382.

En una realización, la invención proporciona combinaciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial. Estas composiciones inhiben la actividad del TNF α humano por administración subcutánea quincenal de un anticuerpo anti-TNF α , de tal modo que se trata el trastorno autoinmune. El trastorno autoinmune puede ser, por ejemplo, la artritis reumatoide, la alergia, la esclerosis múltiple, la diabetes autoinmune, la uveítis autoinmune y el síndrome nefrótico.

En otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial. Estas composiciones inhiben la actividad del TNF α humano por administración subcutánea quincenal de una cantidad de 40 mg de anticuerpo anti-TNF α y metotrexato, de tal modo que se trata el trastorno autoinmune. En un aspecto, se administra metotrexato junto con un anticuerpo anti-TNF α . En otro aspecto, se administra metotrexato antes de la administración de un anticuerpo anti-TNF α . En aún otro aspecto, se administra metotrexato tras la administración de un anticuerpo anti-TNF α .

El anticuerpo anti-TNF α utilizado para tratar trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial es un anticuerpo anti-TNF α humano. Se realiza el tratamiento mediante la administración subcutánea quincenal de un anticuerpo humano aislado o de una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo preferiblemente se disocia del TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o inferior y una constante de velocidad de disociación K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ o inferior, determinadas ambas por resonancia de plasmones superficiales, y neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 *in vitro* estándar con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o inferior. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-TNF α humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia del TNF α humano con una K_{off} de 5×10^{-4} s $^{-1}$ o inferior, o incluso más preferiblemente con una K_{off} de 1×10^{-4} s $^{-1}$ o inferior. El anticuerpo humano aislado o porción de unión a antígeno del mismo neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 *in vitro* estándar con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o inferior, preferiblemente con una CI_{50} de 1×10^{-10} M o inferior.

En otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial mediante la administración subcutánea quincenal al sujeto de un anticuerpo anti-TNF α humano o de una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-TNF α o porción de unión a antígeno del mismo preferiblemente se disocia del TNF α humano con una K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ o inferior, según se determina por resonancia de plasmones superficiales.

Más preferiblemente, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se disocia del TNF α humano con una K_{off} de 5×10^{-4} s $^{-1}$ o inferior. Aún más preferiblemente, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se disocia del TNF α humano con una K_{off} de 1×10^{-4} s $^{-1}$ o inferior.

En aún otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial. Estas composiciones que contienen un anticuerpo humano o una porción de unión a antígeno del mismo deben ser administradas quincenalmente por vía subcutánea al sujeto. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo contiene una LCVR que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 y una HCVR que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

La LCVR tiene además un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5 y la HCVR tiene además un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6. La LCVR tiene además un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7 y la HCVR tiene un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

En aún otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la actividad del TNF α es perjudicial por administración subcutánea al sujeto quincenalmente de un anticuerpo anti-TNF α humano aislado o una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo preferiblemente contiene una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada IgG1 o una región constante de cadena pesada IgG4. En aún otras realizaciones, el anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento F(ab') $_2$ o un fragmento Fv de cadena única.

En aún otras realizaciones, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α es beneficiosa por administración subcutánea al sujeto quincenalmente de uno o más anticuerpos anti-TNF α humanos o porciones de unión a antígeno de los mismos. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo contiene una LCVR que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 y una HCVR que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

También se describen aquí kits que contienen una formulación que incluye una composición farmacéutica. Los kits incluyen un anticuerpo anti-TNF α y un soporte farmacéuticamente aceptable. Los kits contienen instrucciones para la dosificación subcutánea quincenal de la composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno autoinmune en el que la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa. En otro aspecto, la descripción se relaciona con kits que contienen una formulación que incluye una composición farmacéutica y que incluye además un anticuerpo anti-TNF α , metotrexato y un soporte farmacéuticamente aceptable. Los kits contienen instrucciones para la dosificación subcutánea de la composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno autoinmune en el que la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa. Otro aspecto de la invención proporciona una jeringa precargada que contiene una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-TNF α que se ha de administrar subcutáneamente en un régimen de dosificación quincenal y un soporte farmacéuticamente aceptable. La jeringa precargada que contiene la composición farmacéutica de la invención que se ha de administrar subcutáneamente en un régimen de dosificación quincenal puede incluir un anticuerpo anti-TNF α , metotrexato y un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se define la materia objeto de la invención en las reivindicaciones 1 a 15.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B representan las respuestas 20 (ACR20) y ACR50 del American College of Rheumatology para pacientes que sufren de artritis reumatoide (AR) tras dosificación subcutánea con el anticuerpo D2E7 cada semana durante un total de doce semanas (1A), o dosificación subcutánea con el anticuerpo D2E7 y metotrexato en semanas alternas (1B) durante un total de veinticuatro semanas. Estos datos indican que la dosificación en semanas alternas es tan efectiva como la dosificación semanal.

La Figura 2 representa las respuestas ACR20, ACR50 y ACR70 para pacientes que sufren de AR tras dosificación subcutánea con el anticuerpo D2E7 y metotrexato en semanas alternas a las veinticuatro semanas.

Las Figuras 3A y 3B representan los cursos temporales del recuento de articulaciones sensibles (3A) y del recuento de articulaciones hinchadas (3B) a lo largo de veinticuatro semanas para pacientes que sufren de AR tras dosificación subcutánea con D2E7 y metotrexato en semanas alternas a las veinticuatro semanas.

La Figura 4 representa los resultados de un seguimiento de salud en forma corta (SF-36) de pacientes que sufren de AR tras dosificación subcutánea con el anticuerpo D2E7 y metotrexato en semanas alternas a las veinticuatro semanas. RF, rol físico; FF, función física; DC, dolor corporal; SG, salud general; V, vitalidad; FS, funcionamiento social, RE, rol emocional; y SM, salud mental.

La Figura 5 representa el porcentaje de respondedores ACR después de una sola inyección intravenosa del anticuerpo D2E7 y metotrexato en pacientes que sufren de AR.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se relaciona con composiciones para uso en el tratamiento de trastornos en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α es beneficiosa mediante la administración de anticuerpos anti-TNF α humanos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen al TNF α humano con una elevada afinidad, una baja velocidad de disociación y una elevada capacidad de neutralización, de tal modo que se trata el trastorno. Diversos aspectos de la invención se relacionan con composiciones farmacéuticas que incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-TNF α .

Con objeto de poder entender más fácilmente la presente invención, se definen primeramente determinados términos.

El término "dosificación", tal como se utiliza aquí, se refiere a la administración de una sustancia (v.g., un anticuerpo anti-TNF α) para alcanzar un objetivo terapéutico (v.g., el tratamiento de un trastorno autoinmune).

Los términos "régimen de dosificación quincenal", "dosificación quincenal" y "administración quincenal", tal como se utilizan aquí, se refieren al curso temporal de administración de una sustancia (v.g., un anticuerpo anti-TNF α) a un sujeto para alcanzar un objetivo terapéutico (v.g., el tratamiento de un trastorno autoinmune). El régimen de dosificación quincenal no pretende incluir un régimen de dosificación semanal. Según el régimen de dosificación quincenal, se administra la sustancia cada 13-15 días, preferiblemente cada 14 días.

El término "terapia de combinación", tal como se utiliza aquí, se refiere a la administración de dos o más sustancias

terapéuticas, *v.g.*, un anticuerpo anti-TNF α y el fármaco metotrexato. Se puede administrar el metotrexato concomitantemente con, con anterioridad a, o con posterioridad a, la administración de un anticuerpo anti-TNF α .

Con el término "TNF α humano" (aquí abreviado como hTNF α , o simplemente hTNF), tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a una citoquina humana que existe como una forma segregada de 17 kD y una forma asociada a membrana de 26 kD, cuya forma biológicamente activa está compuesta por un trímero de moléculas de 17 kD unidas de manera no covalente. Se describe aún más la estructura del TNF α en, por ejemplo, Pennica, D. *et al.* (1984), *Nature* 312: 724-729; Davis, J.M. *et al.* (1987), *Biochemistry* 26: 1322-1326; y Jones, E.Y. *et al.* (1989), *Nature* 338: 225-228. Con el término TNF α humano, se pretende incluir el TNF α humano recombinante (rhTNF α), que puede ser preparado por métodos de expresión recombinante estándar o comprado comercialmente (R & D Systems, N° de Catálogo 210-TA, Minneapolis, MN).

Con el término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulinas compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (aquí abreviada como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (aquí abreviada como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse aún en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), tal como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (*v.g.*, hTNF α). Se ha visto que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Como ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd consistente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989), *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Más aún, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes independientes, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite producirlos como una única cadena proteica en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocida como Fv de cadena simple (scFv); véanse, *v.g.*, Bird *et al.* (1988), *Science* 242: 423-426, y Huston *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). También se pretende incluir tales anticuerpos de una sola cadena en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de una sola cadena, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en donde los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véanse, *v.g.*, Holliger, P. *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R.J. *et al.* (1994), *Structure* 2: 1121-1123).

Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede formar parte de una molécula de inmunoadhesión de mayor tamaño, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Como ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión, se incluyen el uso de la región del núcleo de la estreptavidina para construir una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M. *et al.* (1995), *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y un marcaje de polihistidina C-terminal para construir moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M. *et al.* (1994), *Mol. Immunol.* 31: 1047-1058). Se pueden preparar porciones de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tal como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aún, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión utilizando técnicas de ADN recombinante estándar, tal como se describe aquí.

Con el término "anticuerpo humano", tal como se utiliza aquí, se pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (*v.g.*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR, y en particular en CDR3. Sin embargo, con el término "anticuerpo humano", tal como se utiliza aquí, no se pretende incluir anticuerpos en donde se han

inertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, sobre secuencias de marco humanas.

Con el término "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza aquí, se pretende incluir todos los anticuerpos humanos preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descritos con más detalle en la Sección II más adelante), anticuerpos aislados de una librería de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes (descritos con más detalle en la Sección III más adelante), anticuerpos aislados de un animal (*v.g.*, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulinas humanas (véase, *v.g.*, Taylor, L.D. *et al.* (1992), Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que incluya el ajustamiento de secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, se someten dichos anticuerpos humanos recombinantes a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de, y se relacionan con, las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal de los anticuerpos humanos *in vivo*.

Con un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a un anticuerpo que está substancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (*v.g.*, un anticuerpo aislado que se une específicamente al hTNF α está substancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del hTNF α). Un anticuerpo aislado que se une específicamente al hTNF α puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de hTNF α de otras especies (como se discute con mayor detalle más adelante). Más aún, un anticuerpo aislado puede estar substancialmente libre de otros materiales celulares y/o agentes químicos.

Con un "anticuerpo neutralizante", tal como se utiliza aquí (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad del hTNF α "), se pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión al hTNF α da lugar a inhibición de la actividad biológica del hTNF α . Se puede valorar esta inhibición de la actividad biológica del hTNF α midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica del hTNF α , tales como la citotoxicidad inducida por el hTNF α (*in vitro* o *in vivo*), la activación celular inducida por el hTNF α y la unión del hTNF α a los receptores de hTNF α . Estos indicadores de la actividad biológica del hTNF α pueden ser valorados mediante uno o más de varios ensayos *in vitro* o *in vivo* estándar conocidos en la técnica (véase el Ejemplo 4). Preferiblemente, se valora la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad del hTNF α mediante la inhibición de la citotoxicidad inducida por el hTNF α de células L929. Como parámetro adicional o alternativo de la actividad del hTNF α , se puede valorar la capacidad de un anticuerpo para inhibir la expresión inducida por hTNF α de ELAM-1 en HUVEC, como medida de la activación celular inducida por el hTNF α .

El término "resonancia de plasmones superficiales", tal como se utiliza aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante detección de alteraciones en las concentraciones de proteína en una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia, y Piscataway, NJ). Para más descripciones, véanse el Ejemplo 1 y Jönsson, U. *et al.* (1993), Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jönsson, U. *et al.* (1991), Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B. *et al.* (1995), J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnsson, B. *et al.* (1991), Anal. Biochem. 198: 268-277.

Con el término " K_{off} ", tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a la constante de la velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo con respecto al complejo anticuerpo/antígeno.

Con el término " K_d ", tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Con el término "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, se pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de una sola cadena o de doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

Con el término "molécula de ácido nucleico aislada", tal como se utiliza aquí en relación a ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos o de porciones de anticuerpos (*v.g.*, VH, VL, CDR3) que se unen al hTNF α , se pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias nucleotídicas codificantes del anticuerpo o de la porción de anticuerpo están libres de otras secuencias nucleotídicas codificantes de anticuerpos o de porciones de anticuerpos que se unen a antígenos distintos del hTNF α , pudiendo estas otras secuencias flanquear de forma natural al ácido nucleico en el ADN genómico humano. Así, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región VH de un anticuerpo anti-hTNF α no contiene otras secuencias codificantes de

otras regiones VH que se unen a antígenos distintos del hTNF α .

Con el término "vector", tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, donde pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (v.g., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (v.g., vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en la célula huésped, y se replican así junto con el genoma huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Se hace aquí referencia a tales vectores como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, se pueden usar "plásmido" y "vector" indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (v.g., retrovirus defectuosos en cuanto a replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que realizan funciones equivalentes.

Con el término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se utiliza aquí, se pretende hacer referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Habría que entender que con dichos términos se pretende hacer referencia no sólo a la célula objeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido ya sea a mutación o a influencias medioambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aún así se incluye en el alcance del término "célula huésped" tal como aquí se utiliza.

Se describen diversos aspectos de la invención con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

I. Anticuerpos humanos que se unen al TNF α humano

Esta invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa. La administración de estas composiciones incluye la administración subcutánea quincenal de anticuerpos anti-TNF α humanos aislados, o de porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen al TNF α humano con una elevada afinidad, una baja velocidad de disociación y una elevada capacidad neutralizante. Preferiblemente, los anticuerpos humanos de la invención son anticuerpos anti-hTNF α humanos neutralizantes recombinantes. Se hace aquí referencia al anticuerpo neutralizante recombinante más preferido de la invención como D2E7 (se muestra la secuencia de aminoácidos de la región VL de D2E7 en la SEC ID N° 1; se muestra la secuencia de aminoácidos de la región VH de D2E7 en la SEC ID N° 2). Se han descrito las propiedades de D2E7 en Salfeld *et al.*, patente EE.UU. N° 6.090.382. En un aspecto, la invención se relaciona con composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa. La administración de estas composiciones incluye la administración subcutánea quincenal de anticuerpos y porciones de anticuerpos D2E7, anticuerpos y porciones de anticuerpos relacionados con D2E7 y otros anticuerpos y porciones de anticuerpos humanos con propiedades equivalentes al D2E7, tales como unión de alta afinidad al hTNF α con baja cinética de disociación y alta capacidad neutralizante. En una realización, la invención proporciona composiciones que contienen un anticuerpo anti-TNF α humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se disocia del TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o inferior y una constante de velocidad K_{off} de 1×10^{-3} s $^{-1}$ o inferior, ambas determinadas por resonancia de plasmones superficiales, y neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 *in vitro* estándar con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o inferior. Más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia del TNF α humano con una K_{off} de 5×10^{-4} s $^{-1}$ o inferior, o incluso más preferiblemente con una K_{off} de 1×10^{-4} s $^{-1}$ o inferior.

El anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 *in vitro* estándar con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o inferior, preferiblemente con una CI_{50} de 1×10^{-10} M o inferior. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante anti-TNF α humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo.

Es bien sabido en la técnica que los dominios CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo desempeñan un importante papel en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se relaciona con composiciones para el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α es beneficiosa mediante administración quincenal subcutánea de anticuerpos anti-TNF α humanos que tienen una lenta cinética de disociación para la asociación con el hTNF α y que tienen dominios CDR3 de cadenas ligeras y pesadas que estructuralmente son idénticos a, o están relacionados con, los de D2E7. La posición 9 de la CDR3 VL de D2E7 puede estar ocupada por Ala o Thr sin afectar

substancialmente a la K_{off} . En consecuencia, una unidad consenso para la CDR3 VL de D2E7 comprende la secuencia de aminoácidos: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEC ID N° 3). Adicionalmente, la posición 12 de la CDR3 VH de D2E7 puede estar ocupada por Tyr o Asn, sin afectar substancialmente a la K_{off} . Por consiguiente, una unidad consenso para la CDR3 VH de D2E7 comprende la secuencia de aminoácidos: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEC ID N° 4). Más aún, tal como se demuestra en el Ejemplo comparativo 2, el dominio CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de D2E7 es susceptible de sustitución con un solo residuo de alanina (en la posición 1, 4, 5, 7 ó 8 en la CDR3 VL o en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ó 11 en la CDR3 VH) sin afectar substancialmente a la K_{off} . Aún más, el experto en la técnica apreciará que, dada la susceptibilidad de los dominios CDR3 VL y VH de D2E7 a sustituciones con alanina, puede ser posible la sustitución de otros aminoácidos en los dominios CDR3 conservando aún, no obstante, la baja constante de velocidad de disociación del anticuerpo, en particular sustituciones con aminoácidos conservadores. Una "sustitución con aminoácidos conservadores", tal como se utiliza aquí, es una en la que se reemplaza un residuo de aminoácido con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (v.g., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (v.g., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (v.g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (v.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (v.g., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (v.g., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Según la presente descripción comparativa, preferiblemente, no se hacen más de una a cinco sustituciones con aminoácidos conservadores en los dominios CDR3 VL y/o VH de D2E7. Más preferiblemente, no se hacen más de una a tres sustituciones con aminoácidos conservadores en los dominios CDR3 VL y/o VH de D2E7. Adicionalmente, no se deberían hacer sustituciones con aminoácidos conservadores en posiciones de aminoácidos críticas para la unión al hTNF α . Las posiciones 2 y 5 de la CDR3 VL de D2E7 y las posiciones 1 y 7 de la CDR3 VH de D2E7 parecen ser críticas para la interacción con hTNF α y, por lo tanto, preferiblemente no se hacen sustituciones con aminoácidos conservadores en estas posiciones (aunque es aceptable una sustitución con alanina en la posición 5 de la CDR3 VL de D2E7, según se ha descrito anteriormente) (véase la Patente EE.UU. N° 6.090.382). En otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α es beneficiosa mediante la administración subcutánea quincenal de un anticuerpo anti-TNF α humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-TNF α o porción de unión a antígeno del mismo preferiblemente se disocia del TNF α humano con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o inferior, según se determina por resonancia de plasmones superficiales.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia del TNF α humano con una K_{off} de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia del TNF α humano con una K_{off} de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior.

En aún otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa mediante la administración subcutánea quincenal de un anticuerpo humano anti-TNF α aislado, o de una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-TNF α o la porción de unión a antígeno del mismo contiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

La LCVR tiene además un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5 (es decir, la CDR2 VL de D2E7) y la HCVR tiene además un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6 (es decir, la CDR2 VH de D2E7). La LCVR tiene además un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7 (es decir, la CDR1 VL de D2E7) y la HCVR tiene un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8 (es decir, la CDR1 VH de D2E7). Las regiones de marco para VL son preferiblemente de la familia de la línea germinal humana $V_{\kappa 1}$, más preferiblemente del gen V_{κ} de la línea germinal humana A20 y más preferiblemente de las secuencias de marco VL de D2E7 mostradas en las Figuras 1A y 1B de la Patente EE.UU. N° 6.090.382. Las regiones de marco para VH son preferiblemente de la familia de la línea germinal humana V_{H3} , más preferiblemente del gen VH de la línea germinal humana DP-31 y más preferiblemente de las secuencias de marco VH de D2E7 mostradas en las Figuras 2A y 2B de la Patente EE.UU. N° 6.090.382.

En aún otra realización, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa mediante la administración subcutánea quincenal de un anticuerpo humano anti-TNF α aislado, o de una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo preferiblemente contiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 (es decir, la VL de D2E7) y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 (es decir, la VH

de D2E7). En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada IgG1 o una región constante de cadena pesada IgG4. Más aún, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de una sola cadena.

En aún otras realizaciones, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa mediante la administración subcutánea quincenal de un anticuerpo humano aislado anti-TNF α , o de una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo contiene dominios CDR3 VL y VH de D2E7, con una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3, y una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

Un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede ser derivatizado o unirse a otra molécula funcional (v.g., otro péptido o proteína). Por consiguiente, se pretende incluir en los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención formas derivatizadas y de algún otro modo modificadas de los anticuerpos anti-hTNF α humanos aquí descritos, incluyendo moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por copulación química, fusión genética, asociación no covalente o de algún otro modo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (v.g., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido, que pueden mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (como una región del núcleo de la estreptavidina o un marcaje de polihistidina).

Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado entrecruzando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, v.g., para crear anticuerpos biespecíficos). Como entrecruzantes adecuados, se incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos que reaccionan de manera distinta separados por un espaciador apropiado (v.g., éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), u homobifuncionales (v.g., suberato de disuccinimidilo). Dichos conectores pueden ser adquiridos de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Como agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, se incluyen compuestos fluorescentes. Como ejemplos de agentes detectables fluorescentes, se incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. También se puede derivatizar un anticuerpo con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando se derivatiza un anticuerpo con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y de diaminobenzidina da lugar a un producto de reacción coloreado, que es detectable. También se puede derivatizar un anticuerpo con biotina y detectarlo por medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

II. Expresión de anticuerpos

Se puede preparar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención por expresión recombinante de genes de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de manera recombinante, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinante portadores de fragmentos de ADN codificantes de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas del anticuerpo, de forma que las cadenas ligeras y pesadas se expresan en la célula huésped y, preferiblemente, se segregan al medio en el que se cultivan las células huésped, de cuyo medio se pueden recuperar los anticuerpos. Se utilizan metodologías de ADN recombinante estándar para obtener genes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989); Ausubel, F.M. *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1989), y Patente EE.UU. N° 4.816.397 de Boss *et al.*

Para expresar D2E7 o un anticuerpo relacionado con D2E7, se obtienen primeramente fragmentos de ADN codificantes de las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas. Se pueden obtener estos ADN por amplificación y modificación de secuencias variables de cadenas ligeras y pesadas de la línea germinal utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica secuencias de ADN de la línea germinal para genes de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras humanos (véase, v.g., la base de datos de secuencias de línea germinal humanas "Vbase"; véanse también Kabat, E.A. *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological*

Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242; Tomlinson, I.M. *et al.* (1992), "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops", *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; y Cox, J.P.L. *et al.* (1994), "A Directory of Human Germ-line V78 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage", *Eur. J. Immunol.* 24: 827-836). Para obtener un fragmento de ADN codificante de la región variable de cadena pesada de D2E7, o de un anticuerpo relacionado con D2E7, se amplifica un miembro de la familia V_{H3} de los genes VH de la línea germinal humana por PCR estándar. Más preferiblemente, se amplifica la secuencia de la línea germinal VH de DP-31. Para obtener un fragmento de ADN codificante de la región variable de cadena ligera de D2E7, o de un anticuerpo relacionado con D2E7, se amplifica un miembro de la familia V_{L1} de los genes VL de la línea germinal humana por PCR estándar. Más preferiblemente, se amplifica la secuencia de la línea germinal VL de A20 VL. Se pueden diseñar cebadores de PCR adecuados para uso en la amplificación de las secuencias VH de la línea germinal DP-31 y VL de la línea germinal A20 en base a las secuencias nucleotídicas expuestas en las referencias antes citadas, utilizando métodos estándar.

Una vez obtenidos los fragmentos VH y VL de la línea germinal, estas secuencias pueden ser mutadas para que codifiquen las secuencias de aminoácidos D2E7 o relacionadas con D2E7 aquí descritas. Se comparan primeramente las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN VH y VL de la línea germinal con las secuencias de aminoácidos VH y VL de D2E7 o relacionadas con D2E7 para identificar residuos de aminoácidos en la secuencia D2E7 o relacionada con D2E7 que difieren de la línea germinal. Se mutan entonces los nucleótidos apropiados de las secuencias de ADN de la línea germinal de forma que la secuencia de la línea germinal mutada codifique la secuencia de aminoácidos D2E7 o relacionada con D2E7, utilizando el código genético para determinar qué cambios de nucleótidos habría que realizar. Se realiza la mutagénesis de las secuencias de la línea germinal por métodos estándar, tales como mutagénesis mediada por PCR (en donde se incorporan los nucleótidos mutados en los cebadores de PCR, de forma que el producto de la PCR contiene las mutaciones) o mutagénesis dirigida a sitio.

Una vez obtenidos fragmentos de ADN codificantes de segmentos VH y VL de D2E7 o relacionados con D2E7 (por amplificación y mutagénesis de genes VH y VL de la línea germinal, tal como se ha descrito anteriormente), estos fragmentos de ADN pueden ser además manipulados por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de las regiones variables en genes de cadenas de anticuerpos de longitud total, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, se une operativamente un fragmento de ADN codificante de VL o VH a otro fragmento de ADN codificante de otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. El término "operativamente unido", tal como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

El ADN aislado codificante de la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud total uniendo operativamente el ADN codificante de VH a otra molécula de ADN codificante de regiones constantes de cadenas pesadas (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de regiones constantes de cadenas pesadas humanas son conocidos en la técnica (véase, *v.g.*, Kabat, E.A. *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que incluyen estas regiones por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN codificante de VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN codificante sólo de la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado codificante de la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud total (así como un gen de cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN codificante de VL a otra molécula de ADN codificante de la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de regiones constantes de cadenas ligeras humanas son conocidos en la técnica (véase, *v.g.*, Kabat, E.A. *et al.* (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que incluyen estas regiones por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN codificantes de VH y VL se unen operativamente a otro fragmento codificante de un conector flexible, *v.g.*, codificante de la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de forma que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína de una sola cadena contigua, con las regiones VL y VH unidas por el conector flexible (véanse, *v.g.*, Bird *et al.* (1988), *Science* 242: 423-426; Huston *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348: 552-554).

Para expresar los anticuerpos, o porciones de anticuerpo, de la invención, se insertan ADN codificantes de cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o total, obtenidas como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión,

de forma que los genes se unen operativamente a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, el término "operativamente unido" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de forma que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción en el vector realizan su función pretendida de regulación de la transcripción y de la traducción del gen de anticuerpo. Las secuencias del vector de expresión y de control de expresión son seleccionadas de manera que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden ser insertados en un vector independiente o, más típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos son insertados en el vector de expresión por métodos estándar (*v.g.*, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no hay presencia de sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadenas ligeras o pesadas de D2E7 o relacionadas con D2E7, el vector de expresión puede llevar ya secuencias de región constante de anticuerpos. Por ejemplo, una aproximación a la conversión de las secuencias VH y VL de D2E7 o relacionadas con D2E7 en genes de anticuerpo de longitud total consiste en insertarlas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera, respectivamente, de forma que el segmento VH se une operativamente al/a los segmento(s) CH en el vector y el segmento VL se une operativamente al segmento CL en el vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo por una célula huésped. Se puede clonar el gen de la cadena de anticuerpo en el vector de tal modo que el péptido señal se una en marco al extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína distinta de una inmunoglobulina).

Además de los genes de cadenas de anticuerpos, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (*v.g.*, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Dichas secuencias reguladoras están descritas, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores como la elección de la célula huésped que se ha de transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Como secuencias reguladoras preferidas para expresión en células huésped de mamíferos, se incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (como el promotor/potenciador de CMV), de Virus Simiano 40 (SV40) (como el promotor/potenciador de SV40), de adenovirus, (*v.g.*, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP)) y de polioma. Para una mayor descripción de elementos reguladores víricos y secuencias de los mismos, véanse, *v.g.*, la Patente EE.UU. N° 5.168.062 de Stinski, la Patente EE.UU. N° 4.510.245 de Bell *et al.* y la Patente EE.UU. N° 4.968.615 de Schaffner *et al.*

Además de los genes de cadenas de anticuerpos y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la descripción pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (*v.g.*, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, *v.g.*, las Patentes EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Como genes marcadores seleccionables preferidos, se incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped *dhfr*⁻ con selección con metotrexato/amplificación) y el gen *neo* (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, se transfecta(n) el/los vector(es) de expresión codificante(s) de las cadenas pesadas y ligeras en una célula huésped por técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente empleadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, *v.g.*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y más preferiblemente en células huésped de mamíferos, es la más preferida, ya que dichas células eucarióticas, y en particular las células de mamíferos, tienen más probabilidad que las células procarióticas de reunirse y segregar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha dicho que la expresión procariótica de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M.A. y Wood, C. R. (1985), *Immunology Today* 6: 12-13).

Como células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, se incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO *dhfr*⁻, descritas en Urlaub y Chasin, (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, *v.g.*, tal como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982), *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células

COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante codificantes de genes de anticuerpos en células huésped de mamíferos, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Se pueden recuperar los anticuerpos del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas estándar.

También se pueden utilizar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones en el procedimiento anterior quedan dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN codificante bien de la cadena ligera, bien de la cadena pesada (pero no de ambas) de un anticuerpo de esta invención. También se puede emplear tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o todo del ADN codificante de una o de ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a hTNF α . Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas quedan también incluidas en los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en donde una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y la otra ligera son específicas para un antígeno distinto del hTNF α por entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de entrecruzamiento químico estándar.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante codificante tanto de la cadena pesada del anticuerpo como de la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr- por transfección mediada por fosfato de calcio. En el vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente unidos a elementos reguladores potenciador CMV/promotor AdMLP para dirigir la producción de altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante lleva también un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando selección con metotrexato/amplificación. Se cultivan las células huésped transformantes seleccionadas para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

III. Selección de anticuerpos humanos recombinantes

Se pueden aislar anticuerpos humanos recombinantes según esta descripción, además del D2E7 o una porción de unión a antígeno del mismo, o de los anticuerpos relacionados con D2E7 aquí descritos, por cribado de una librería de anticuerpos combinatoria recombinante, preferiblemente una librería de exhibición de fagos scFv, preparada utilizando ADNc VL y VH humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y cribar dichas librerías son conocidas en la técnica. Además de kits comerciales para la generación de librerías de exhibición de fagos (v.g., el Recombinant Phage Antibody System de Pharmacia, n° de catálogo 27-9400-01, y el kit de exhibición de fagos SurfZAP™ de Stratagene, n° de catálogo 240612), se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente aplicables a su uso en la generación y el cribado de librerías de exhibición de anticuerpos en, por ejemplo, Ladner *et al.*, Patente EE.UU. N° 5.223.409; Kang *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/18619; Dower *et al.*, Publicación PCT N° WO 91/17271; Winter *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/20791; Markland *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/15679; Breitling *et al.*, Publicación PCT N° WO 93/01288; McCafferty *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/01047; Garrard *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991), *BiolTechnology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992), *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989), *Science* 246: 1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348: 552-554; Griffiths *et al.* (1993), *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992), *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson *et al.* (1991), *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992), *PNAS* 89: 3576-3580; Garrard *et al.* (1991), *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991), *Nuc. Acid Res.* 19: 4133-4137; y Barbas *et al.* (1991), *PNAS* 88: 7978-7982.

En una realización preferida, para aislar anticuerpos humanos con alta afinidad y baja constante de velocidad de disociación para hTNF α , se utiliza primeramente un anticuerpo anti-hTNF α murino que tiene alta afinidad y baja constante de velocidad de disociación para hTNF α (v.g., MAK 195, el hibridoma que tiene el número de depósito ECACC 87 050801) para seleccionar secuencias de cadenas pesadas y ligeras humanas que tienen una actividad de unión similar hacia el hTNF α , utilizando los métodos de impronta de epitopos descritos en Hoogenboom *et al.*, Publicación PCT N° WO 93/06213. Las librerías de anticuerpos utilizadas en este método son preferiblemente librerías scFv preparadas y cribadas como se describe en McCafferty *et al.*, Publicación PCT N° WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *Nature* (1990), 348: 552-554; y Griffiths *et al.* (1993), *EMBO J* 12: 725-734. Las librerías de anticuerpos scFv son preferiblemente cribadas utilizando TNF α humano recombinante como antígeno.

Una vez seleccionados los segmentos VL y VH humanos iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y correspondencia", en donde se criban diferentes pares de los segmentos VL y VH inicialmente seleccionados en cuanto a la unión al hTNF α , para seleccionar combinaciones preferidas de pares VL/VH. Adicionalmente, para

mejorar aún más la afinidad y/o disminuir la constante de velocidad de disociación para la unión al hTNF α , se pueden mutar aleatoriamente los segmentos VL y VH del/de los par(es) VL/VH preferido(s), preferiblemente en la región CDR3 de VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Se puede conseguir esta maduración de la afinidad *in vitro* amplificando regiones VH y VL mediante el uso de cebadores de PCR complementarios a la CDR3 de VH o a la CDR3 de VL, respectivamente, cuyos cebadores han sido "contaminados" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones, de forma que los productos de PCR resultantes codifican segmentos VH y VL en donde se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 VH y/o VL. Estos segmentos VH y VL aleatoriamente mutados pueden ser cribados de nuevo en cuanto a la unión al hTNF α y se pueden seleccionar secuencias que exhiben una elevada afinidad y una baja velocidad de disociación para la unión al hTNF α .

Después del cribado y del aislamiento de un anticuerpo anti-hTNF α de la invención a partir de una librería de exhibición de inmunoglobulinas recombinante, se puede recuperar el ácido nucleico codificante del anticuerpo seleccionado a partir del paquete de exhibición (*v.g.*, del genoma del fago) y subclonarlo en otros vectores de expresión por técnicas de ADN recombinante estándar. Si se desea, el ácido nucleico puede ser además manipulado para crear otras formas de anticuerpo de la invención (*v.g.*, unido a ácido nucleico codificante de dominios de inmunoglobulinas adicionales, tales como regiones constantes adicionales). Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por cribado de una librería combinatoria, se clona el ADN codificante del anticuerpo en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula huésped de mamífero, tal como se describe con más detalle en la Sección II anterior.

IV. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención pueden ser incorporados a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto sobre una base de dosificación subcutánea quincenal. Típicamente, la composición farmacéutica incluye un anticuerpo (o porción de anticuerpo) de la invención y/o metotrexato y un soporte farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles y que sean adecuados para administración a un sujeto para los métodos aquí descritos. Como ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables, se incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfatos, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como sus combinaciones. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol y sorbitol, o cloruro de sodio, en la composición. Los soportes farmacéuticamente aceptables pueden además incluir cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que incrementan la vida útil o efectividad del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, soluciones líquidas (*v.g.*, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, polvos y liposomas.

La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica deseada. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración es subcutáneo.

El anticuerpo es administrado por inyección subcutánea (una inyección subcutánea quincenal). La dosificación utilizada es una cantidad de 40 mg.

Las composiciones terapéuticas deben típicamente ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y de almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (es decir, el anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son la desecación a vacío y la liofilización, que dan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada de una solución, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. Se puede provocar la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo sales de monoestearato y gelatina. En ciertas realizaciones, se puede preparar el compuesto activo con un

soporte que protegerá el compuesto frente a una rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada.

Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polietilenglicol (PEG), polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica. Véase, *v.g.*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones. En ciertas realizaciones, se coformula y/o coadministra un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, se puede coformular y/o coadministrar un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-hTNF α de la invención con metotrexato, uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos (*v.g.*, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular), una o más citoquinas, receptor de TNF α soluble (véase, *v.g.*, la Publicación PCT N $^{\circ}$ WO 94/06476) y/o uno o más agentes químicos que inhiben la producción o actividad del hTNF α (como derivados de ciclohexanilideno, tal como se describe en la Publicación PCT N $^{\circ}$ WO 93/19751). Más aún, se pueden usar uno o más anticuerpos de la invención en combinación con dos o más de los anteriores agentes terapéuticos. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias. El uso de los anticuerpos, o porciones de anticuerpos, de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos es discutido con más detalle en la subsección IV.

Como ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la artritis reumatoide con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: fármaco(s) antiinflamatorio(s) no esteroideo(s) (FAINE); fármaco(s) antiinflamatorio(s) supresor(es) de citoquinas (FAISC); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 75 kD-IgG; Immunex; véanse, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1994), Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996), Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 55 kD-IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado no deplecionante; IDEC/SmithKline; véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1995), Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión de IL-2; Seragen; véanse, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1993), Vol. 36, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2R α humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-4; agonistas de IL-10 y/o IL-4 (*v.g.*, anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista de los receptores de IL-1; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (proteína de unión a TNF soluble; véanse, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S284; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995), Vol. 268, pp. 37-42); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV; véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S282); MK-966 (inhibidor de COX-2; véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S81); Iloprost (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S82); metotrexato; talidomida (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S282) y fármacos relacionados con la talidomida (*v.g.*, Celgen); leflunomida (antiinflamatorio e inhibidor de citoquinas; véanse, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S131; Inflammation Research (1996), Vol. 45, pp. 103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación del plasminógeno; véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S284); T-614 (inhibidor de citoquinas; véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S282); prostaglandina E1 (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S282); Tenidap (fármaco antiinflamatorio no esteroideo; véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S280); Naproxeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo; véase, *v.g.*, Neuro Report (1996), Vol. 7, pp. 1209-1213); Meloxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Ibuprofeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Sulfasalazina (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S281); Azatioprina (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S281); inhibidor de la ICE (inhibidor de la enzima convertora de la interleuquina-1 β); inhibidor de zap-70 y/o Ick (inhibidor de la tirosina kinasa zap-70 o Ick); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares o del receptor del factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares; inhibidores de la angiogénesis); fármacos antiinflamatorios corticosteroides (*v.g.*, SB203580); inhibidores de la TNFconvertasa; anticuerpos anti-IL-12; interleuquina-11 (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, No. 9 (suplemento), S296); interleuquina-13 (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S308); inhibidores de la interleuquina-17 (véase, *v.g.*, Arthritis & Rheumatism (1996), Vol. 39, N $^{\circ}$ 9 (suplemento), S120); oro; penicilamina; cloroquina; hidroxicloroquina; clorambucilo; ciclofosfamida; ciclosporina; irradiación linfoide total; globulina antitimocitos; anticuerpos anti-CD4; toxinas CD5; péptidos y colágeno administrados por vía oral; lobenzarit disódico; los Agentes Reguladores de Citoquinas (ARC) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodesoxinucleótidos fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor de complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y

botánicos (ácidos grasos de peces y de semillas de plantas; véase, *v.g.*, DeLuca *et al.* (1995), *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21: 759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileuton; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodesoxiadenosina); y azaribina.

5 Como ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la enfermedad inflamatoria del intestino con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: budenosa; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de la lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxanos; antagonistas de los receptores de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β ; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de la elastasa; compuestos de piridinilimidazol; CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 75 kD-IgG; Immunex; véanse, *v.g.*, *Arthritis & Rheumatism* (1994), Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996), Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 55 kD-IgG; Hoffmann-LaRoche); interleuquina-10 (SCH 52000; Schering Plough); IL-4; agonistas de IL-10 y/o IL-4 (*v.g.*, anticuerpos agonistas); interleuquina-11; profármacos conjugados a glucurónido o a dextrano de prednisolona, dexametasona o budenosa; oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor de complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); mesalazina de liberación lenta; metotrexato; antagonistas del Factor de Activación de las Plaquetas (PAF); ciprofloxacina; y lignocaina.

25 Como ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón- β 1a (AvonexTM; Biogen); interferón- β 1b (BetaseronTM; Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; CopaxoneTM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 75 kD-IgG; Immunex; véanse, *v.g.*, *Arthritis & Rheumatism* (1994), Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996), Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 55 kD-IgG; Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4; y agonistas de IL-10 y/o IL-4 (*v.g.*, anticuerpos agonistas).

35 Como ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para la sepsis con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: soluciones salinas hipertónicas; antibióticos; gamma-globulina intravenosa; hemofiltración continua; carbapenems (*v.g.*, meropenem); antagonistas de citoquinas, tales como TNF α , IL-1 β , IL-6 y/o IL-8; CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 75 kD-IgG; Immunex; véanse, *v.g.*, *Arthritis & Rheumatism* (1994), Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996), Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 55 kD-IgG; Hoffmann-LaRoche); los Agentes Reguladores de Citoquinas (ARC) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (péptido de bajo peso molecular; SmithKline Beecham); guanilhidrazona tetravalente CNI-1493 (Picower Institute); Inhibidor de la Ruta del Factor Tisular (TFPI; Chiron); PHP (hemoglobina químicamente modificada; APEX Bioscience); quelantes y quelatos de hierro, incluyendo el complejo ácido dietilentriaminopentaacético-hierro (III) (DTPA iron (III); Molichem Medicines); lisofilina (metilxantina de pequeña molécula sintética; Cell Therapeutics, Inc.); PGG-Glucano (β 1,3glucano soluble acuoso; Alpha-Beta Technology); apolipoproteína A-1 reconstituida con lípidos; ácidos hidroxámicos quirales (antibacterianos sintéticos que inhiben la biosíntesis de lípido A); anticuerpos antiendotoxinas; E5531 (antagonista del lípido A sintético; Eisai America, Inc.); rBPI₂₁ (fragmento N-terminal recombinante de la proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad humana); y Péptidos AntiEndotoxina Sintéticos (SAEP; Biosynth Research Laboratories);

50 Como ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos para el síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS) con los que se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los siguientes: anticuerpos anti-IL-8; terapia de reemplazo del surfactante; CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 75 kD-IgG; Immunex; véanse, *v.g.*, *Arthritis & Rheumatism* (1994), Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996), Vol. 44, 235A); y 55 kDTNFR-IgG (proteína de fusión receptor de TNF de 55 kD-IgG; Hoffmann-LaRoche).

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualesquiera efectos tóxicos o

perjudiciales del anticuerpo o porción de anticuerpo quedan superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes, o en una fase anterior, de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será inferior a la cantidad terapéuticamente efectiva.

Las composiciones de la invención son administradas en un régimen de dosificación quincenal ajustado para obtener la respuesta óptima deseada (*v.g.*, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación, tal como se utiliza aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que han de ser tratados, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención son dictadas por, y dependen directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se ha de conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

El valor para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es de 40 mg. Hay que hacer notar que, en la práctica, los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la enfermedad que se ha de aliviar. Hay que entender además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

V. Usos de los anticuerpos de la invención

Dada su capacidad para unirse al hTNF α , los anticuerpos anti-hTNF α , o porciones de los mismos, de la descripción pueden ser utilizados para detectar hTNF α (*v.g.*, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. La descripción proporciona un método para detectar hTNF α en una muestra biológica que consiste en poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar ya sea el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a hTNF α , ya sea anticuerpo (o porción de anticuerpo) no unido, para de este modo detectar hTNF α en la muestra biológica. Se marca el anticuerpo directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Como sustancias detectables adecuadas, se incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radiactivos. Como ejemplos de enzimas adecuadas, se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; como ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados, se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; como ejemplos de materiales fluorescentes adecuados, se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminescente incluye luminol; y como ejemplos de material radiactivo adecuado, se incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Como alternativa al marcaje del anticuerpo, se puede estudiar el hTNF α en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo utilizando patrones de rhTNF α marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-hTNF α no marcado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los patrones de rhTNF α marcados y el anticuerpo anti-hTNF α y se determina la cantidad de patrón rhTNF α marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de hTNF α en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de hTNF α marcado unido al anticuerpo anti-hTNF α .

También se puede usar un anticuerpo D2E7 de la descripción para detectar TNF α de especies distintas de los humanos, en particular TNF α de primates (*v.g.*, chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus), cerdo y ratón, ya que D2E7 puede unirse a cada uno de estos TNF α .

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la descripción son capaces de neutralizar la actividad del hTNF α tanto *in vitro* como *in vivo* (véase la Patente EE.UU. N° 6.090.382). Más aún, al menos algunos de los anticuerpos de la descripción, tal como D2E7, pueden neutralizar la actividad del hTNF α de otras especies. Por consiguiente, se pueden usar los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la descripción para inhibir la actividad del hTNF α , *v.g.*, en un cultivo celular que contiene hTNF α , en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen TNF α con los que un anticuerpo de la invención presenta reacción cruzada (*v.g.*, chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, la descripción proporciona un método para inhibir la actividad del TNF α

consistente en poner en contacto el TNF α con un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención, de tal modo que se inhibe la actividad del TNF α . Preferiblemente, el TNF α es TNF α humano. Por ejemplo, en un cultivo celular que contenga, o sea sospechoso de contener, TNF α , se puede añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad del hTNF α en el cultivo.

5 En una realización, la invención proporciona composiciones que contienen un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención para tratar trastornos en donde la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa, que han de ser administradas subcutáneamente al sujeto quincenalmente, de forma que se trata el trastorno.

10 En otra realización particularmente preferida, se administra el anticuerpo subcutáneamente antes, durante o después de la administración de metotrexato. El sujeto es un sujeto humano.

Un anticuerpo de la invención puede ser administrado a un sujeto humano con fines terapéuticos (como se discute con más detalle más adelante).

15 Tal como se utiliza aquí, el término "un trastorno en el que la administración de un anticuerpo anti-TNF α resulta beneficiosa" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en donde la presencia de TNF α en un sujeto que padece el trastorno ha mostrado ser, o se sospecha que es, o bien responsable de la fisiopatología del trastorno, o bien un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno, o donde se ha visto que se ha utilizado otro anticuerpo anti-TNF α o una porción biológicamente activa del mismo con éxito para tratar la enfermedad. Por
20 consiguiente, un trastorno en el que la actividad del TNF α es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad del TNF α alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Dichos trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, por un aumento de la concentración de TNF α en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (v.g., un aumento en la concentración de TNF α en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del
25 sujeto), que puede ser detectado, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-TNF α como se ha descrito anteriormente. Existen numerosos ejemplos de trastornos en donde la actividad del TNF α resulta perjudicial. El uso de los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención en el tratamiento de trastornos específicos es discutido con mayor detalle más adelante. Sólo se ha de considerar como parte de la presente invención el tratamiento de Enfermedades Autoinmunes descrito en el punto B.

30 A. Sepsis

El factor de necrosis tumoral tiene un papel establecido en la fisiopatología de la sepsis, con efectos biológicos que incluyen hipotensión, supresión miocárdica, síndrome de extravasación vascular, necrosis de órganos, estimulación
35 de la liberación de mediadores secundarios tóxicos y activación de la cascada de la coagulación (véanse, v.g., Tracey, K.J. y Cerami, A. (1994), *Annu. Rev. Med.* 45: 491-503; Russell, D. y Thompson, R.C. (1993), *Curr. Opin. Biotech.* 4: 714-721). Por consiguiente, los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, humanos de la invención pueden ser usados para tratar la sepsis en cualquiera de sus ámbitos clínicos, incluyendo el choque séptico, el choque endotóxico, la sepsis por gram negativos y el síndrome del choque tóxico.

40 Más aún, para tratar la sepsis, se puede coadministrar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, anti-hTNF α de la invención con uno o más agentes terapéuticos adicionales que puedan aliviar aún más la sepsis, tales como un inhibidor de la interleuquina-1 (como los descritos en las Publicaciones PCT N $^{\circ}$ WO 92/16221 y WO 92/17583), la citoquina interleuquina-6 (véase, v.g., la Publicación PCT N $^{\circ}$ WO 93/11793) o un antagonista del factor de activación de las plaquetas (véase, v.g., la Publicación de la Solicitud de Patente Europea N $^{\circ}$ EP 374.510).

45 Adicionalmente, en una realización preferida, se administra un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-TNF α de la invención a un sujeto humano dentro de un subgrupo de pacientes de sepsis que tienen una concentración en suero o plasma de IL-6 por encima de 500 pg/ml, y más preferiblemente de 1.000 pg/ml, en el momento del tratamiento (véase la Publicación PCT N $^{\circ}$ WO 95/20978 de Daum, L., *et al.*).

B. Enfermedades autoinmunes

55 Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la fisiopatología de una variedad de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, se ha implicado al TNF α en la activación de la inflamación tisular y la causa de la destrucción articular en la artritis reumatoide (véanse, v.g., Tracey y Cerami, antes citado; Arend, W.P. y Dayer, J-M. (1995), *Arth. Rheum.* 38: 151-160; Fava, R.A. *et al.* (1993), *Clin. Exp. Immunol.* 94: 261-266). También se ha implicado al TNF α en la promoción de la muerte de las células de los islotes y en la mediación de la resistencia a la insulina en la diabetes (véanse, v.g., Tracey y Cerami, antes citado; Publicación PCT N $^{\circ}$ WO 94/08609). También se ha implicado
60 al TNF α en la mediación de la citotoxicidad para los oligodendrocitos y la inducción de placas inflamatorias en la esclerosis múltiple (véase, v.g., Tracey y Cerami, antes citado). Los anticuerpos anti-hTNF α murinos quiméricos y humanizados han pasado por pruebas clínicas para el tratamiento de la artritis reumatoide (véanse, v.g., Elliott, M.J.

et al. (1994), *Lancet* 344: 1125-1127; Elliot, M.J. *et al.* (1994), *Lancet* 344: 1105-1110; Rankin, E.C. *et al.* (1995), *Br. J. Rheumatol.* 34: 334-342).

5 Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, humanos de la invención pueden ser utilizados para tratar enfermedades autoinmunes, en particular las asociadas a inflamación, incluyendo la artritis reumatoide, la espondilitis reumatoide, la osteoartritis y la artritis gotosa, la alergia, la esclerosis múltiple, la diabetes autoinmune, la uveítis autoinmune y el síndrome nefrótico. El anticuerpo, o porción de anticuerpo, ha de ser administrado subcutáneamente, aunque se admite que, para ciertos trastornos, puede ser beneficiosa la administración local del anticuerpo o porción de anticuerpo en un sitio de inflamación (*v.g.*, administración local en las articulaciones en la artritis reumatoide o aplicación tópica a las úlceras diabéticas, solo o en combinación con un derivado de ciclohexanilideno como se describe en la Publicación PCT N° WO 93/19751).

C. Enfermedades infecciosas

15 Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la mediación de efectos biológicos observados en una variedad de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, se ha implicado al TNF α en la mediación de la inflamación cerebral y la trombosis capilar y el infarto en el paludismo (véase, *v.g.*, Tracey y Cerami, antes citado). También se ha implicado al TNF α en la mediación de la inflamación cerebral, la inducción de la destrucción de la barrera hematoencefálica, el desencadenamiento del síndrome del choque séptico y la activación del infarto venoso en la meningitis (véase, *v.g.*, Tracey y Cerami, antes citado). También se ha implicado al TNF α en la inducción de caquexia, la estimulación de la proliferación vírica y la mediación de la lesión del sistema nervioso central en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (véase, *v.g.*, Tracey y Cerami, antes citado). Por consiguiente, los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo la meningitis bacteriana (véase, *v.g.*, la Publicación de la Solicitud de Patente Europea N° EP 585.705), el paludismo cerebral, el SIDA y el complejo relacionado con el SIDA (ARC) (véase, *v.g.*, la Publicación de la Solicitud de Patente Europea N° EP 230.574), así como la infección por citomegalovirus secundaria a trasplante (véase, *v.g.*, Fietze, E. *et al.* (1994), *Transplantation* 58: 675-680). Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser también utilizados para aliviar síntomas asociados a enfermedades infecciosas, incluyendo la fiebre y las mialgias debidas a la infección (tal como la gripe) y la caquexia secundaria a la infección (*v.g.*, secundaria al SIDA o al ARC).

D. Trasplante

35 Se ha implicado al factor de necrosis tumoral como mediador clave del rechazo de aloinjertos y de la enfermedad del injerto frente al huésped (GVHD) y en la mediación de una reacción adversa que se ha observado cuando se usa el anticuerpo de rata OKT3, dirigido contra el complejo CD3 de los receptores de las células T, para inhibir el rechazo de trasplantes renales (véanse, *v.g.*, Tracey y Cerami, antes citado; Eason, J.D. *et al.* (1995), *Transplantation* 59: 300-305; Suthanthiran, M. y Strom, T.B. (1994), *New Engl. J. Med.* 331: 365-375). Por consiguiente, los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser usados para inhibir el rechazo de trasplantes, incluyendo rechazos de aloinjertos y xenoinjertos, y para inhibir la GVHD. Aunque el anticuerpo o porción de anticuerpo puede ser usado solo, más preferiblemente es usado en combinación con uno o más de otros agentes que inhiben la respuesta inmune frente al aloinjerto o que inhiben la GVHD. Por ejemplo, en una realización, se usa un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención en combinación con OKT3 para inhibir las reacciones inducidas por OKT3. En otra realización, se usa un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción en combinación con uno o más anticuerpos dirigidos a otros objetivos implicados en la regulación de las respuestas inmunes, tales como las moléculas de la superficie celular CD25 (receptor- α de la interleuquina-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2). En aún otra realización, se usa un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción en combinación con uno o más agentes inmunosupresores generales, tales como ciclosporina A o FK506.

E. Malignidad

55 Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la inducción de caquexia, la estimulación del crecimiento tumoral, el aumento del potencial metastático y la mediación de la citotoxicidad en tumores (véase, *v.g.*, Tracey y Cerami, antes citado). Por consiguiente, los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser utilizados en el tratamiento de tumores, para inhibir el crecimiento o la metástasis tumoral y/o para aliviar la caquexia secundaria al tumor. Se puede administrar el anticuerpo, o porción de anticuerpo sistémica o localmente en el sitio tumoral.

F. Trastornos pulmonares

60 Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la fisiopatología del síndrome de distrés respiratorio del adulto, incluyendo la estimulación de la activación leucocito-endotelial, la orientación de la citotoxicidad hacia los neumocitos y la inducción del síndrome de extravasación vascular (véase, *v.g.*, Tracey y Cerami, antes citado). Por consiguiente, los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser utilizados para tratar

diversos trastornos pulmonares, incluyendo el síndrome de distrés respiratorio del adulto (véase, v.g., la Publicación PCT N° WO 91/04054), el choque pulmonar, la enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, la sarcoidosis pulmonar, la fibrosis pulmonar y la silicosis. El anticuerpo, o porción de anticuerpo, puede ser administrado sistémica o localmente en la superficie pulmonar, por ejemplo como aerosol.

5

G. Trastornos intestinales

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la fisiopatología de trastornos inflamatorios del intestino (véanse, v.g., Tracy, K.J. *et al.* (1986), *Science* 234: 470-474; Sun, X-M. *et al.* (1988), *J. Clin. Invest.* 81: 1328-1331; MacDonald, T.T. *et al.* (1990), *Clin. Exp. Immunol.* 81: 301-305). Los anticuerpos anti-hTNF α murinos quiméricos han pasado por pruebas clínicas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (van Dullemen, H.M. *et al.* (1995), *Gastroenterology* 109: 129-135). Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, humanos de la invención pueden ser también utilizados para tratar trastornos intestinales, tales como la enfermedad inflamatoria idiopática del intestino, que incluye dos síndromes, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa.

10

15

H. Trastornos cardíacos

Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser también utilizados para tratar diversos trastornos cardíacos, incluyendo la isquemia del corazón (véase, v.g., la Publicación de la Solicitud de Patente Europea N° EP 453.898) y la insuficiencia cardíaca (debilidad del músculo cardíaco) (véase, v.g., la Publicación PCT N° WO 94/20139).

20

I. Otros

Los anticuerpos, y porciones de anticuerpos, de la descripción pueden ser también utilizados para tratar otros diversos trastornos en donde la actividad del TNF α resulta perjudicial. Como ejemplos de otras enfermedades y trastornos en cuya fisiopatología se ha implicado a la actividad del TNF α , y por lo tanto que pueden ser tratados utilizando un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, se incluyen los trastornos óseos inflamatorios y la enfermedad de la resorción ósea (véanse, v.g., Bertolini, D.R. *et al.* (1986), *Nature* 319: 516-518; Konig, A. *et al.* (1988), *J. Bone Miner. Res.* 3: 621-627; Lerner, U.H. y Ohlin, A. (1993), *J. Bone Miner. Res.* 8: 147-155; y Shankar, G. y Stem, P.H. (1993), *Bone* 14: 871-876), la hepatitis, incluyendo la hepatitis alcohólica (véanse, v.g., McClain, C.J. y Cohen, D.A. (1989), *Hepatology* 9: 349-351; Felver, M.E. *et al.* (1990), *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14: 255-259; y Hansen, J. *et al.* (1994), *Hepatology* 20: 461-474) y la hepatitis vírica (Sheron, N. *et al.* (1991), *J. Hepatol.* 12: 241-245; y Hussain, M.J. *et al.* (1994), *J. Clin. Pathol.* 47: 1112-1115), las alteraciones de la coagulación (véanse, v.g., van der Poll, T. *et al.* (1990), *N. Engl. J. Med.* 322: 1622-1627; y van der Poll, T. *et al.* (1991), *Prog. Clin. Biol. Res.* 367: 55-60), las quemaduras (véanse, v.g., Giroir, B.P. *et al.* (1994), *Am. J. Physiol.* 267: H118-124; y Liu, X.S. *et al.* (1994), *Burns* 20: 40-44), la lesión por reperfusión (véanse, v.g., Scales, W.E. *et al.* (1994), *Am. J. Physiol.* 267: G1122-1127; Serrick, C. *et al.* (1994), *Transplantation* 58: 1158-1162; y Yao, Y.M. *et al.* (1995), *Resuscitation* 29: 157-168), la formación de queloides (véase, v.g., McCauley, R.L. *et al.* (1992), *J. Clin. Immunol.* 12: 300-308), la formación de tejido cicatricial y la pirexia.

25

30

35

40

Esta invención es además ilustrada mediante los siguientes ejemplos, que no han de ser considerados como limitantes.

45

Ejemplo 1 (comparativo): Tratamiento con un anticuerpo anti-TNF α D2E7. Eficacia tras administración subcutánea

En este estudio, se trató a veinticuatro pacientes con AR activa con dosis semanales de 0,5 mg/kg de D2E7 (n=18) o placebo (n=6) por inyección s.c. durante tres meses. Los pacientes que participaron en este estudio tenían una duración media de la enfermedad de 10,1 años, con una puntuación de actividad de la enfermedad (PAE) de 4,87 y una media de 3,4 FARME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad) antes de la entrada en el estudio, reflejando de nuevo una considerable actividad de la enfermedad. Los respondedores continuaron el tratamiento abierto con D2E7, mientras que los pacientes que no respondieron a la dosis de 0,5 mg/kg o que perdieron una respuesta PAE en la dosis de 0,5 mg/kg fueron incrementados a 1 mg/kg por inyección s.c. después de la semana doce del estudio.

55

Los primeros pacientes enrolados recibieron hasta sesenta inyecciones y estuvieron, por lo tanto, sesenta semanas con el fármaco de estudio. La eficacia con la dosificación s.c. era similar a las inyecciones i.v.. Hasta un 78% de los pacientes alcanzaron una PAE y una respuesta ACR20 durante las primeras semanas de tratamiento. El D2E7 por vía subcutánea a una dosis de 0,5 mg/kg/semana redujo el recuento de articulaciones hinchadas (AH) en un 54%, el recuento de articulaciones sensibles (RAS) en un 61% y el CRP en un 39% a lo largo de doce semanas en comparación con la línea basal, mientras que todos los parámetros aumentaron en el grupo del placebo. Tras completarse el período controlado con placebo de este estudio, los pacientes continuaron el tratamiento durante hasta catorce meses con eficacia mantenida. Estos resultados indican que el D2E7 subcutáneo a una dosis de 0,5

60

mg/kg/semana puede, por lo tanto, ser autoadministrado con seguridad y con buena tolerabilidad local.

Administración de D2E7 y metotrexato

5 En este estudio, los pacientes recibieron placebo o D2E7 s.c. o i.v. a una dosis de 1 mg/kg además de su tratamiento en progreso con (metotrexato) MTX. Se enrolaron en el estudio cincuenta y cuatro pacientes y dieciocho
10 pacientes recibieron D2E7 i.v. y placebo s.c., dieciocho pacientes recibieron placebo i.v. y D2E7 s.c. y dieciocho
pacientes recibieron placebo i.v. y s.c. Los pacientes recibieron su segunda dosis sólo después de haber perdido su
estado de respuesta ciego, no antes de cuatro semanas tras la primera dosis. A continuación, todos los pacientes
recibieron inyecciones s.c. quincenales abiertas de D2E7.

15 Las características demográficas de la población de este estudio incluían una duración media de AR de 11,1 años,
exposición previa a una media de 3,6 FARME (aparte de MTX) y una PAE media a la entrada del estudio de 4,81.
Hacia el día veintinueve, el 72% de los pacientes tratados con D2E7 i.v. y el 44% de los pacientes tratados con
D2E7 s.c. habían alcanzado una respuesta por los criterios PAE, en comparación con sólo un 28% de los pacientes
tratados con placebo (indicado en la Figura 5). De los respondedores en este estudio, un 28% de los pacientes
tratados con placebo mantenían una respuesta ACR20 hasta el día 29, en comparación con un 72% de los
pacientes tratados con D2E7 i.v. y un 67% de los pacientes tratados con D2E7 s.c., que mantuvieron sus respuestas
durante entre uno y tres meses.

20 **Ejemplo 2 (comparativo):** Dosis corporal total de un anticuerpo anti-TNF α administrado subcutáneamente.
Administración subcutánea semanal de D2E7

25 Este estudio enroló a doscientos ochenta y cuatro pacientes con AR y fue diseñado para determinar la dosis corporal
total óptima de D2E7 administrado subcutáneamente. Se distribuyó a los pacientes aleatoriamente para que
recibieran 20, 40 ó 80 mg de D2E7 o placebo semanalmente durante doce semanas, después de cuyo tiempo se
cambió a los pacientes tratados con placebo de forma ciega a 40 mg de D2E7/semana.

30 Aproximadamente un 49% de los pacientes alcanzaron un ACR20 a 20 mg, un 55% de los pacientes alcanzaron un
ACR20 a 40 mg y un 54% de los pacientes alcanzaron un ACR20 a 80 mg, mientras que sólo un 10% de los
pacientes que recibieron placebo alcanzaron un ACR20 (indicado en la Figura 1A). Aproximadamente un 23% de los
pacientes alcanzaron un ACR50 a 20 mg, un 27% de los pacientes alcanzaron un ACR50 a 40 mg y un 20% de los
pacientes alcanzaron un ACR50 a 80 mg, y sólo un 2% de los pacientes que recibieron placebo alcanzaron un
ACR50. Estos datos ilustran que el D2E7 subcutáneo, particularmente a una dosis de 40 mg/semana, genera una
buena respuesta.

35 **Ejemplo 3 (parcialmente comparativo):** Administración subcutánea quincenal de un anticuerpo anti-TNF α .
Administración subcutánea quincenal de D2E7

40 Se investigaron los efectos clínicos, la seguridad, la inmunogenicidad y la tolerancia de pacientes de AR con
respuestas parciales a MTX tras inyecciones subcutáneas (s.c.) en semanas alternas de placebo o D2E7 a varios
niveles de dosis durante hasta veinticuatro semanas junto con tratamiento continuado con MIX.

45 Sólo los estudios donde el nivel de dosis del D2E7 administrado a los sujetos asciende a 40 mg son considerados
como representativos de la invención.

Diseño de estudio

50 Se realizó un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en pacientes con AR que
tenían una eficacia o tolerabilidad insuficiente con respecto al MTX. En el curso de la prueba, los pacientes
continuaron con una dosis estable de MIX, con los rangos de dosis especificados en los criterios de inclusión que se
describen a continuación.

55 Este estudio consistía en dos partes: 1) un "período de eliminación" de cuatro semanas antes de la administración
de la primera dosis de medicación, durante cuyo tiempo se retiraron los FARME (excepto el MTX); y 2) un "período
controlado por placebo", durante cuyo tiempo los pacientes fueron distribuidos aleatoriamente en una de cuatro
cohortes de sesenta y siete pacientes para recibir placebo, 20, 40 ó 80 mg de D2E7 (como dosis corporal total)
administrados en semanas alternas s.c. durante hasta 24 semanas. Se administró cada dosis de fármaco de estudio
como dos inyecciones s.c. de 1,6 ml cada una. Se administró la primera dosis del paciente por el personal médico
60 como parte del entrenamiento del paciente. El paciente se autoadministró las dosis siguientes en el estudio bajo la
observación directa de personal entrenado durante las primeras cuatro semanas. A continuación, las dosis fueron
administradas fuera del lugar del estudio por el paciente, por un individuo entrenado designado por el paciente o por
personal médico. Se dispensó medicación para cuatro o cinco semanas después de cada valoración clínica. Se

examinó seriadamente a los pacientes en las semanas una, dos, tres, cuatro, seis, ocho, doce, dieciséis, veinte y veinticuatro del estudio, llevándose a cabo los exámenes de las articulaciones por un valorador ciego, independiente del médico que realizó el tratamiento.

5 Este estudio enroló a doscientos setenta y un pacientes con AR. La población de estudio era representativa de la población con AR de moderada a severa en Norteamérica: aproximadamente un 70% de mujeres y predominantemente por encima de los cuarenta años de edad. Se seleccionó a la población utilizando criterios de inclusión y exclusión predeterminados, conocidos para los expertos en la técnica, v.g., un paciente tiene que haber recibido un diagnóstico de AR según definen los criterios del American College of Rheumatology (ACR) revisados en 10 1987 (expuestos en el Apéndice A).

Resultados

15 Las Figuras 1B y 2-4 indican que el tratamiento quincenal subcutáneo con D2E7 combinado con metotrexato era significativamente menor que el placebo en la reducción de los signos y síntomas de AR a las veinticuatro semanas. Las tres dosis de D2E7 fueron todas más efectivas con significación estadística que el placebo dado semanalmente. Más aún, el D2E7 a 40 mg y 80 mg tuvo una mejor eficacia que la dosis de 20 mg.

Definición de la AR por el ACR

20 Los criterios y funciones del árbol de clasificación de 1987 para la artritis reumatoide (AR)

Criterio	Definición
1. Artritis de 3 o más áreas articulares	Un médico observó hinchazón o líquido en tejidos blandos simultáneamente en al menos 3 áreas articulares (no sobrecrecimiento óseo solo). Las 14 áreas articulares posibles son las articulaciones IFP, MCF, muñeca, codo, rodilla, tobillo y MTF derechas o izquierdas.
2. Artritis de las articulaciones de la mano Muñeca MCP MCP o muñeca MCP y muñeca	Un médico observó hinchazón o líquido en tejidos blandos (no sobrecrecimiento óseo solo) del área especificada. Donde se especifican 2 áreas, la implicación ha debido ser simultánea.
3. Hinchazón simétrica (artritis)	Implicación simultánea de las mismas áreas articulares (según se define en 1) en ambos lados del cuerpo (la implicación bilateral de IFP, MCF o MTF es aceptable sin simetría absoluta).
4. Factor reumatoide en suero	Demostración de cantidades anormales de factor reumatoide en suero por cualquier método para el que el resultado haya sido positivo en <5% de los sujetos control normales.
5. Cambios radiográficos de la artritis reumatoide	Cambios radiográficos típicos de artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de mano y muñeca, que deben incluir erosiones o descalcificación ósea inequívoca localizadas en, o más marcadas adyacentes a, las articulaciones involucradas. (Los cambios osteoartíticos solos no cualifican).
- Se dice que un/a paciente tiene AR si está incluido/a en 1 de los 5 subgrupos de AR enumerados en la Tabla 7 y su médico le ha realizado un diagnóstico clínico de AR. Los criterios 1, 2 y 3 deben haber estado presentes durante al menos 6 semanas. Arthritis and Rheumatism, Vol. 31, Nº 3 (Marzo de 1988).	

Apéndice A

SEC ID Nº 1:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

SEC ID Nº 2:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

SEC ID Nº 3:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

Apéndice B

SEC ID N° 4:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

SEC ID N° 5:

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

SEC ID N° 6:

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15
Gly

SEC ID N° 7:

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

SEC ID N° 8:

Asp Tyr Ala Met His
1 5

SEC ID N° 10:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

SEC ID N° 11:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
1 5

SEC ID N° 12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

SEC ID N° 13:

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

SEC ID N° 17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

SEC ID N° 18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

SEC ID N° 19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

SEC ID N° 21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

SEC ID N° 22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

SEC ID N° 23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

SEC ID N° 26:

SEC ID N° 27:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

SEC ID N° 28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
 1 5 10

SEC ID N° 29:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10

SEC ID N° 30:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
 1 5 10

SEC ID N° 31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10

SEC ID N° 32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
 1 5 10

SEC ID N° 33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
 1 5 10

SEC ID N° 34:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
 1 5 10

SEC ID N° 35:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
 1 5 10

SEC ID N° 36:

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC 60
 ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA 120
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT 180
 CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT 240
 GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG 300
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA A 321

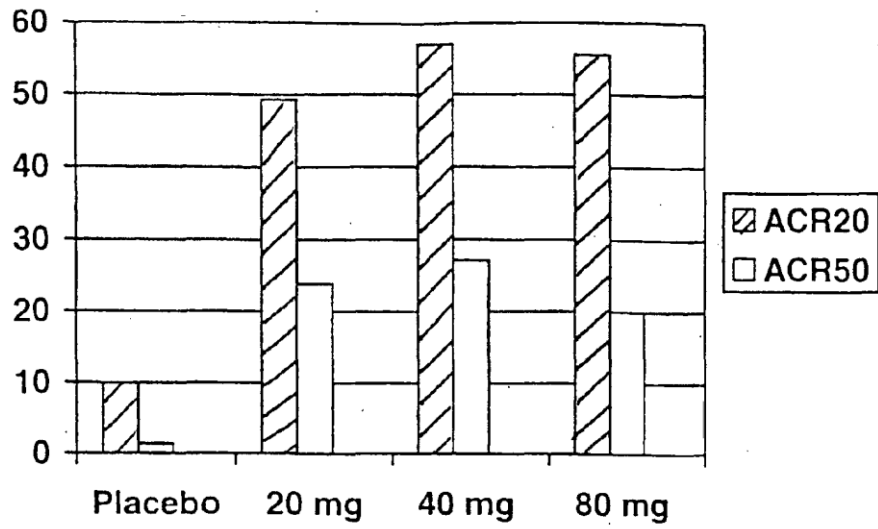
ES 2 400 458 T3

SEC ID N° 37:

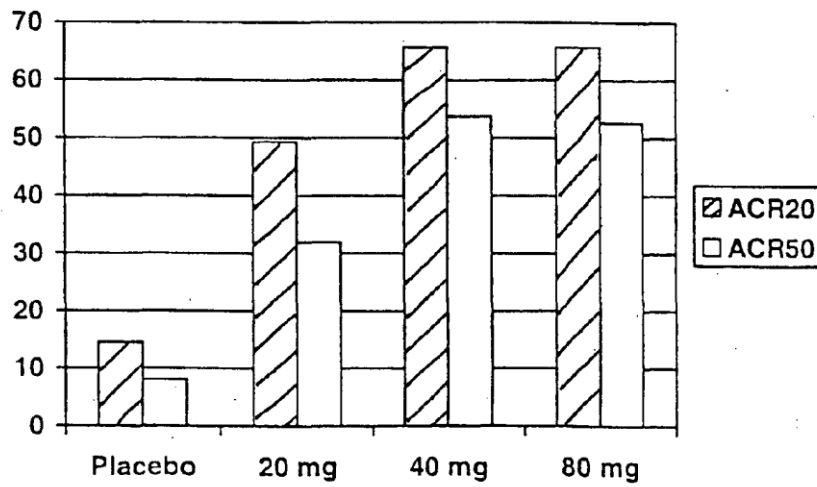
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGC ACTGGGT CCCJCAAGCT	120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT	180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTC CCTGTAT	240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG	300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG	360
AGT	363

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que contiene una cantidad de 40 mg de un anticuerpo anti-TNF α humano aislado, para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune en un sujeto humano, donde la composición ha de ser administrada subcutáneamente al sujeto humano que lo necesite según un régimen de dosificación quincenal cada 13-15 días, y donde el anticuerpo anti-TNF α humano neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 *in vitro* estándar con una CI₅₀ de 1×10^{-9} M o inferior, comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que incluye un dominio CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3, un dominio CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5 y un dominio CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7, y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que incluye un dominio CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4, un dominio CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6 y un dominio CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.
- 10 2. La composición para uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo humano tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
- 15 3. La composición para uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo humano es el anticuerpo D2E7.
- 20 4. La composición para uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo humano, o porción de unión a antígeno del mismo, neutraliza la citotoxicidad del TNF α humano en un ensayo L929 *in vitro* estándar con una CI₅₀ de 1×10^{-10} M o inferior.
- 25 5. La composición para uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo humano inhibe la expresión inducida por el TNF α humano de ELAM-1 en células endoteliales de la vena umbilical humana.
- 30 6. La composición para uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo humano tiene una región constante de cadena pesada IgG1 o donde dicho anticuerpo humano tiene una región constante de cadena pesada IgG4.
- 35 7. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición ha de ser administrada según un régimen de dosificación quincenal cada 14 días.
8. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición ha de ser administrada en combinación con un agente terapéutico adicional.
- 40 9. La composición para uso según la reivindicación 8, donde el agente terapéutico adicional es seleccionado entre el grupo consistente en un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (FAINE), un fármaco antiinflamatorio supresor de citoquinas, citoquina IL-4 y citoquina IL-10.
- 45 10. La composición para uso según la reivindicación 10, donde el FAINE es seleccionado entre el grupo consistente en tenidap, naproxeno, meloxicam, ibuprofeno, piroxicam e indometacina.
- 50 11. La composición para uso según la reivindicación 8, donde el agente terapéutico adicional es metotrexato.
- 55 12. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha enfermedad autoinmune es seleccionada entre el grupo consistente en artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa, particularmente la artritis reumatoide, o es seleccionada entre el grupo consistente en una alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune y síndrome nefrótico.
- 60 13. Una jeringa precargada que contiene una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un soporte farmacéuticamente aceptable, donde la composición es para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune en un sujeto humano y ha de ser administrada subcutáneamente al sujeto humano que lo necesite según un régimen de dosificación quincenal cada 13-15 días.
14. La jeringa precargada de la reivindicación 13, donde dicha enfermedad autoinmune es seleccionada entre el grupo consistente en artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa, particularmente la artritis reumatoide, o es seleccionada entre el grupo consistente en una alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune y síndrome nefrótico.
15. La jeringa precargada de la reivindicación 13 ó 14, donde la composición ha de ser administrada según un régimen de dosificación quincenal cada 14 días.



Estudio DE007
Dosificación cada semana



Estudio DE009
Dosificación en semanas alternas

FIGURA 1

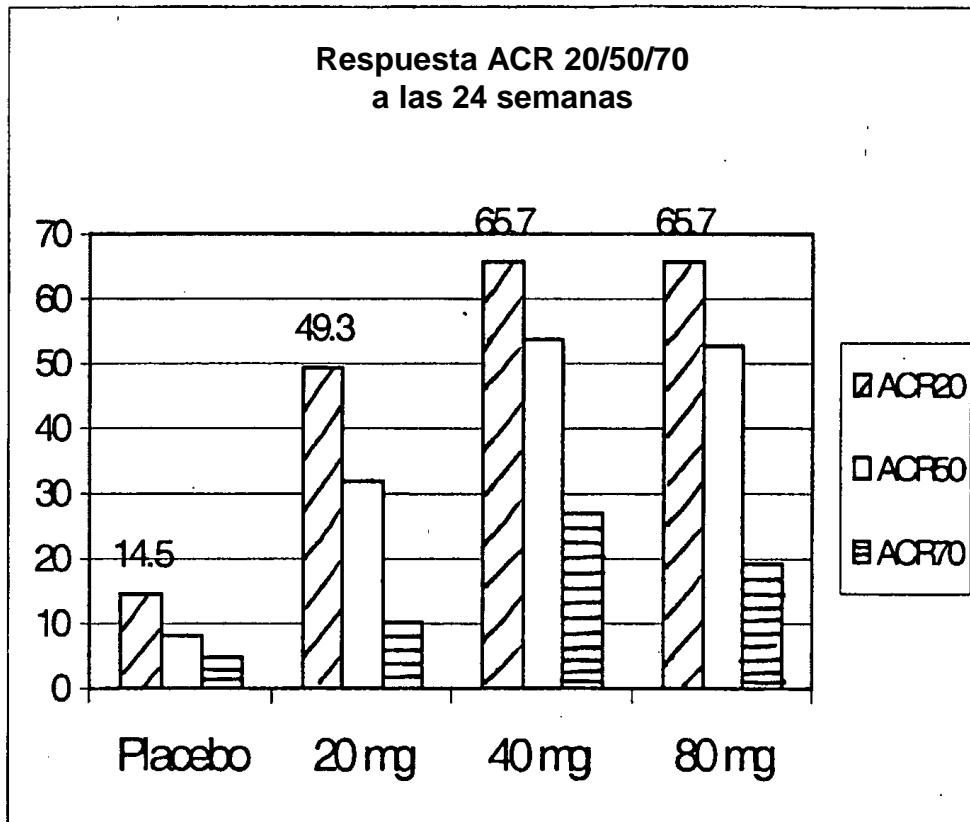
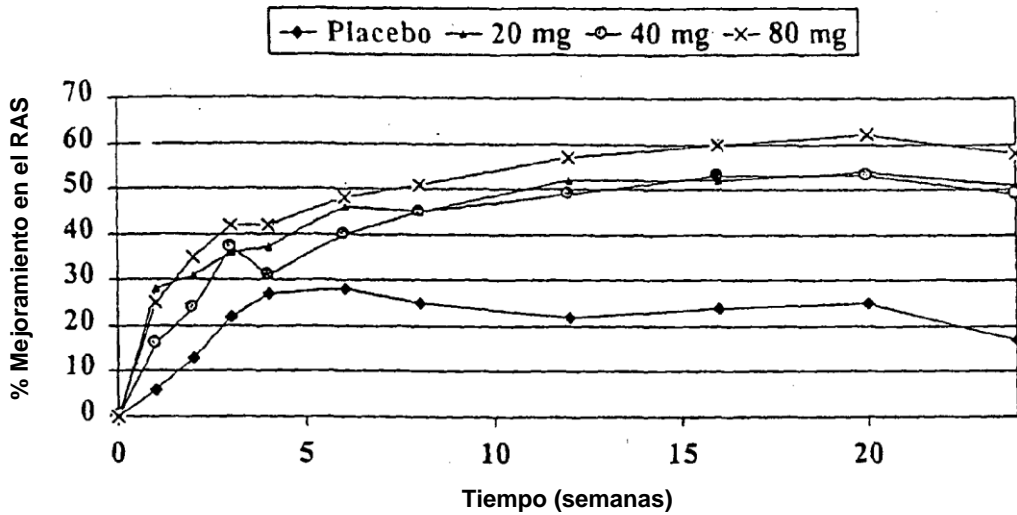


FIGURA 2

A

Curso del recuento de articulaciones sensibles a lo largo de 24 semanas



B

Curso del recuento de articulaciones hinchadas a lo largo de 24 semanas

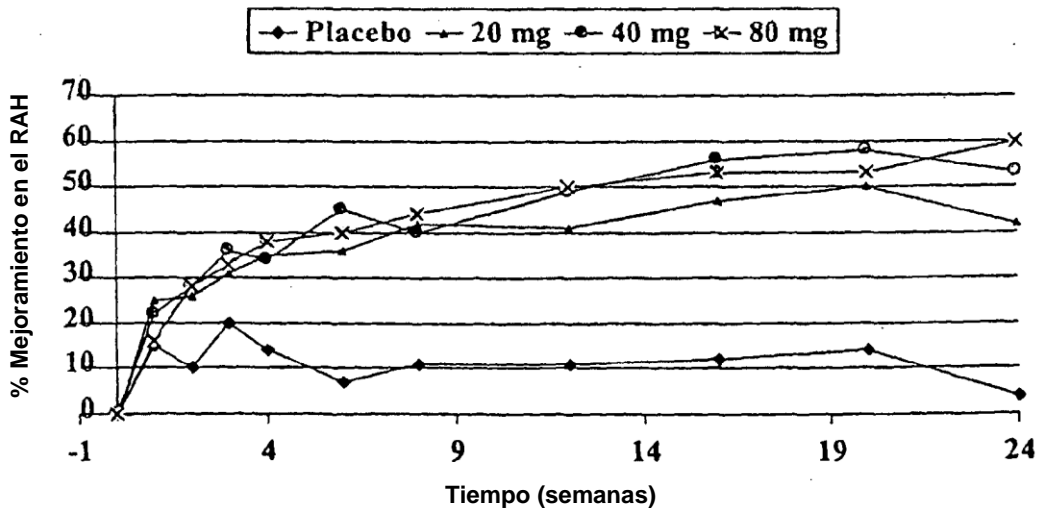


FIGURA 3

ESCALA SF-36

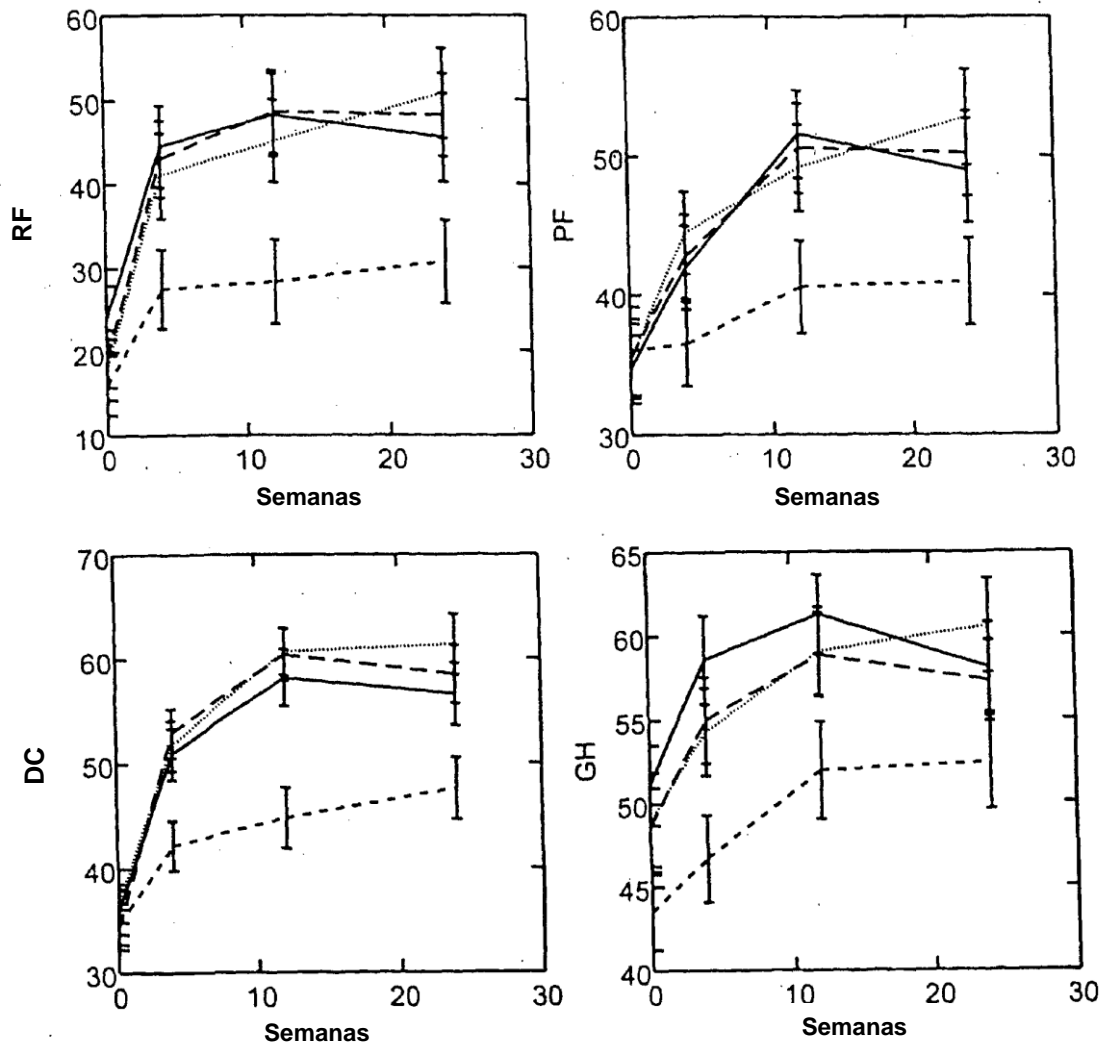


FIGURA 4

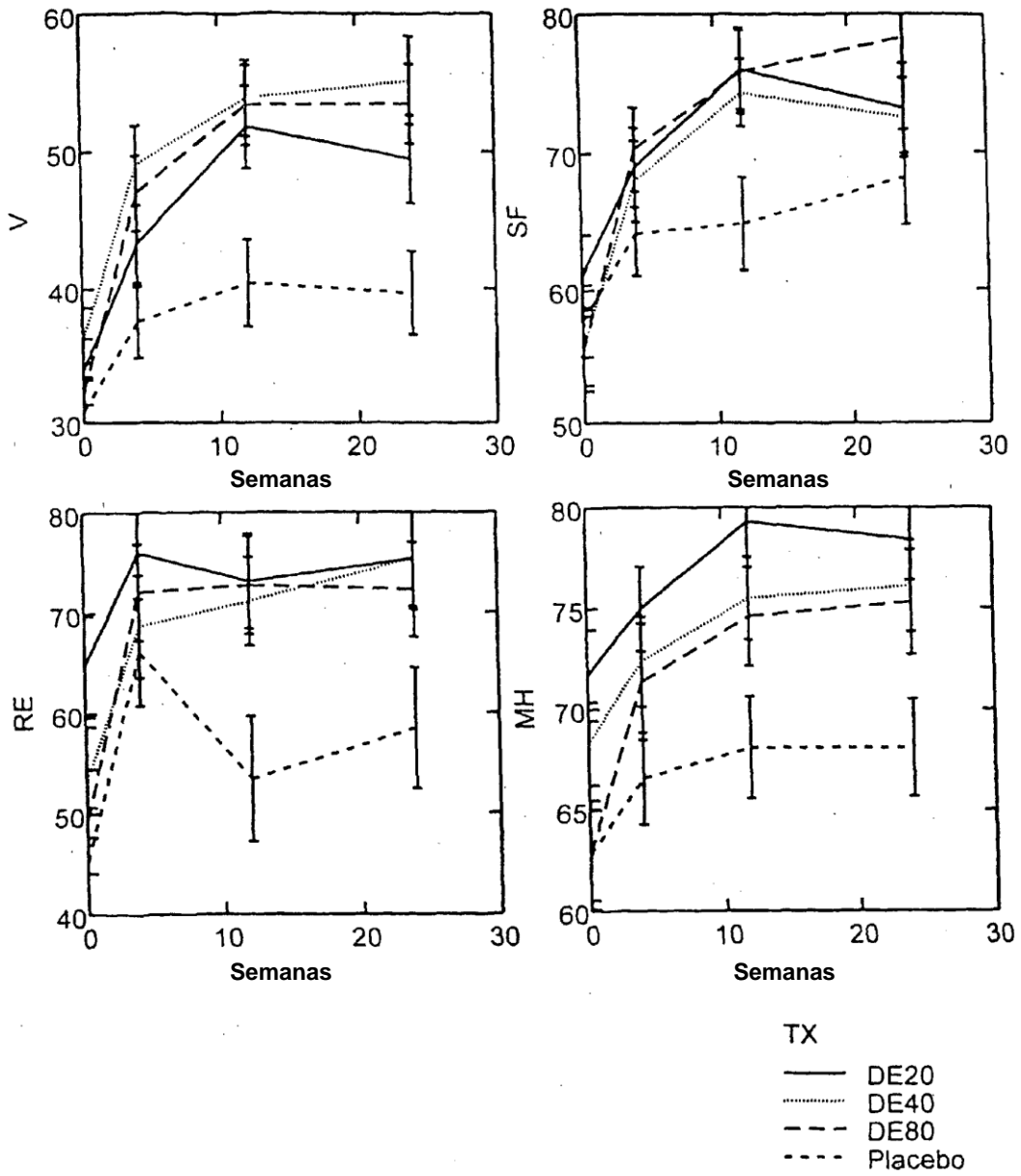


FIGURA 4

Porcentaje de respondedores ACR20 después de una sola inyección i.v. de D2E7 y/o placebo (DE010)

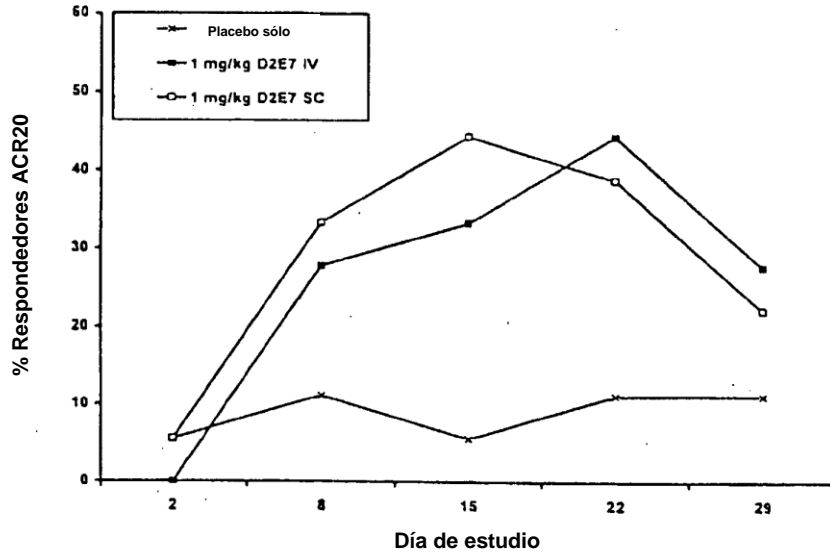


FIGURA 5