

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 643**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2006 E 06849865 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1948235**

54 Título: **Métodos para determinar la eficacia de adalimumab en sujetos que tienen espondilitis anquilosante utilizando CTX-II y MMP3 como biomarcadores**

30 Prioridad:

01.11.2005 US 732444 P

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

27.11.2013

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD (100.0%)
Clarendon House, 2, Church Street
HM 11 Hamilton, BM**

72 Inventor/es:

**MAKSYMOWYCH, WALTER P. y
WONG, ROBERT L.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 431 643 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 para determinar la eficacia de adalimumab en sujetos que tienen espondilitis anquilosante utilizando CTX-II y MMP3 como biomarcadores

5

Antecedentes de la invención

Los niveles elevados de TNF juegan un papel importante en la inflamación patológica. El TNF también referido como (TNF α) ha sido implicado en la fisiopatología de una variedad de enfermedades y trastornos humanos, incluyendo la sepsis, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes y enfermedad del injerto contra anfitrión (véase p. ej., Moeller et al. (1990) Cytokine 2:162; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.231.024 de Moeller et al.; Publicación de Patente Europea Núm. 260 610 B1 de Moeller, A. et al.; Vasilli (1992) Annu. Rev. Immunol. 10:411; Tracey y Cerami (1994) Annu. Rev. Med. 45:491).

10

La espondilitis anquilosante (EA) que se ha asociado con niveles elevados de TNF (Lange et al. (2000) Eur J Med Res. 5 (12): 507), es una enfermedad reumática inflamatoria común que produce rigidez espinal progresiva y restricción de la movilidad. La EA es una forma de inflamación crónica de la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas, que puede causar dolor y rigidez en y alrededor de la columna vertebral. Con el tiempo, la inflamación crónica vertebral (espondilitis) puede llevar a un completo conjunto de cementación (fusión) de las vértebras, un proceso conocido como anquilosis, que, a su vez, puede conducir a la pérdida de la movilidad de la columna vertebral.

15

20

La EA se diagnostica a menudo usando una combinación de métodos, incluyendo el examen de los síntomas, el examen físico y el análisis de rayos X. Los síntomas de un paciente con EA pueden incluir dolor y rigidez matutina de la columna vertebral y las zonas sacras con o sin inflamación acompañante en otras articulaciones, tendones y órganos. Los primeros síntomas de la EA pueden ser muy engañosos, sin embargo, como la rigidez y el dolor en la parte inferior de la espalda se pueden observar en muchas otras afecciones, y, como resultado, pueden transcurrir tiempo antes de que ni siquiera se considere el diagnóstico de la EA. Además, el examen físico del paciente puede revelar signos de inflamación y disminuir la amplitud de movimiento de las articulaciones, a menudo particularmente evidente en la columna vertebral. La flexibilidad de la parte inferior de la espalda y/o el cuello puede disminuir. Otras claves para el diagnóstico pueden ser sugeridas por las anomalías de rayos X de la columna vertebral, o la presencia de un marcador genético en pruebas sanguíneas, el gen de HLA-B27.

25

30

Los daños estructurales están asociados con la EA, y son el resultado de la degradación y la resorción del cartílago y el hueso de la articulación, produciendo la destrucción de la articulación. Terapéuticamente, es importante abordar tanto los síntomas del paciente que tiene EA, como el daño estructural causado por la destrucción de la articulación asociada con la enfermedad.

35

El tratamiento tradicional de la EA ha incluido la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) al paciente para disminuir el dolor y la rigidez de la columna vertebral y otras articulaciones. Los AINE comúnmente utilizados incluyen indometacina (Indocina), tolmetina (Tolectina), sulindac (Clinoril), naproxeno (Naprosyn) y diclofenaco (Voltarén). Más recientemente, se ha demostrado que los agentes biológicos anti-TNF, tales como etanercept, infliximab y adalimumab, son eficaces para reducir los síntomas asociados con la EA.

40

Por ejemplo:

45

WALTER P. ET AL. : "Infliximab in ankylosing spondylitis: A prospective Observational inception cohort analysis of efficacy and safety" J RHEUMATOL, vol. 29, 2002, páginas 959-965, XP008097020 describe un método para determinar la eficacia del infliximab para la espondilitis anquilosante.

50

MAKSYMOWYCH WALTER P ET AL: "Etanercept exerts beneficial effects on articular cartilage biomarkers of degradation and turnover in patients with ankylosing spondylitis" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, TORONTO, CA, vol. 32, núm. 10, 1 de Octubre de 2005 (2005-10-01), páginas 1911-1917, XP008097021 ISSN: 0315-162X estudia el uso de etanercept para combatir la espondilitis anquilosante y explora su posible eficacia.

55

BERNARD VANDOOREN ET AL: "Involvement of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Peripheral Synovitis and Down-Regulation by Tumor Necrosis Factor alpha Blockade in Spondylarthropathy", ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 50, núm. 9, Septiembre de 2004 (2004-09), páginas 2942-2953, Describe que el infliximab, si se administra a sujetos con una espondiloartropatía, induce la regulación a la baja de las metaloproteinasas de la matriz.

60

Compendio de la invención

60

A pesar de las mejoras en el tratamiento de la EA usando agentes biológicos anti-TNF, se necesitan pruebas de diagnóstico y pronóstico para ayudar a los médicos en ejercicio en el diagnóstico de los síntomas del paciente y la recomendación de los regímenes de tratamiento apropiados. Además, se requieren pruebas de diagnóstico y de pronóstico para evaluar mejor las mejoras en el estado de la enfermedad del paciente, que pueden proporcionar una mejor atención médica al paciente, así como la reducción del coste en el tratamiento.

65

De acuerdo con una primera realización, la presente invención proporciona de este modo un método para determinar la eficacia del adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) y un nivel de post-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenidas del sujeto que tiene EA, en donde un nivel más bajo de post-tratamiento de CTX-II en la muestra o las muestras con respecto a un nivel patrón de CTX-II conocido basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 en la muestra o las muestras con respecto a un nivel patrón de MMP-3 conocido basado en uno o varios sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

En dicha primera realización de la invención, se prefiere que el nivel de post-tratamiento de CTX-II en la muestra o las muestras obtenidas del sujeto tenga al menos un descenso de aproximadamente 9% con respecto al nivel patrón de CTX-II conocido basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA.

En dicha primera realización de la invención, se prefiere adicionalmente que el nivel de post-tratamiento de MMP-3 en la muestra o las muestras obtenidas del sujeto tenga un descenso de al menos aproximadamente 8% con respecto al nivel patrón conocido de MMP3 basado en uno o varios sujetos que tienen EA.

De acuerdo con una segunda realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de pre-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II), y un nivel de pre-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenidas del sujeto que tiene EA, en donde un nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II con respecto al nivel de pre-tratamiento de CTX-II, y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 con respecto al nivel de pre-tratamiento de MMP3 indica que adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

De acuerdo con una tercera realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II), y un nivel de post-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenidas del sujeto que tiene EA, en donde un nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II con respecto a un nivel de pre-tratamiento de CTX-II y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 con respecto a un nivel de pre-tratamiento de MMP3 indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

En las realizaciones anteriores, se prefiere que el nivel de MMP-3 sea determinado utilizando ELISA.

De acuerdo con una cuarta realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) en una o varias muestras del sujeto que tiene EA, en donde una disminución en el nivel de CTX-II de al menos 9% con respecto a un nivel patrón conocido de CTX-II basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

En las realizaciones anteriores, se prefiere que el nivel de CTX-II sea determinado utilizando ELISA.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, el CTX-II es CTX-II de la orina.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, la MMP3 es MMP3 de suero.

En las realizaciones anteriores, se prefiere que el método de la invención comprenda adicionalmente comparar el nivel de proteína C-reactiva del sujeto (CRP) con un nivel de CRP patrón conocido asociado con la EA; y evaluar si el nivel de CRP del sujeto es mayor que el nivel de CRP patrón conocido, en donde un nivel de CRP menor en comparación con el nivel patrón conocido de CRP indica la eficacia del tratamiento.

La presente descripción proporciona de este modo biomarcadores que se pueden utilizar para determinar las mejoras en estado de enfermedad global del paciente con EA, concretamente con respecto al daño estructural asociados con la EA. La presente descripción describe de este modo un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF para disminuir la degradación del cartilago y/o la sinovitis que está asociada con la EA. La presente descripción también incluye por lo tanto un método para la identificación de pacientes con EA que son candidatos al tratamiento con inhibidores de TNF, p. ej., adalimumab, basado en su nivel de degradación del cartilago y/o biomarcadores de sinovitis.

Breve descripción de las figuras

La *Figura 1* muestra el diseño del estudio del estudio descrito en el Ejemplo 1.

La *Figura 2* muestra un gráfico que indica que los pacientes que recibieron adalimumab experimentaron reducciones significativas en los niveles de CTX-II en orina frente al placebo en la semana 12 y la semana 24.

La *Figura 3* muestra un gráfico que indica que los pacientes que recibieron adalimumab experimentaron reducciones estadísticamente significativas en los niveles de MMP3 con respecto a los pacientes que recibían placebo a las 12 semanas y 24 semanas.

La *Figura 4* muestra un gráfico que indica que los niveles de CRP se redujeron significativamente en los pacientes que recibieron adalimumab en comparación con pacientes que recibieron placebo en la semana 12 y la semana 24.

10 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos.

El término "biomarcador", según se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a una molécula, es decir, un gen (o ácido nucleico que codifica dicho gen), proteína, estructura de hidrato de carbono o glicolípido, cuya expresión en o sobre una muestra derivada de un tejido o célula de mamífero puede ser detectada mediante métodos convencionales en la técnica (así como aquellos descritos en la presente memoria), y es predictivo o indica un estado del sujeto del que se obtuvo. Cuando el biomarcador es una proteína, la modulación o alteración de la expresión incluye la modulación por medio de diferentes modificaciones post-traduccionales. Un biomarcador se puede utilizar para distinguir la actividad de la enfermedad, incluyendo la mejora de la afección y el deterioro de la afección, basándose en el nivel del biomarcador. Por consiguiente, en una realización, un biomarcador útil en la presente invención, es cualquier molécula cuya está regulado (al alza o a la baja) en un paciente con un estado de enfermedad, p. ej., una espondiloartropatía, cuando se compara con un control normal, es decir, un sujeto no afectado. En una realización, se pueden utilizar conjuntos seleccionados de uno, dos, tres, y más de los biomarcadores de esta invención como puntos criterios de valoración para un rápido diagnóstico o pronóstico para determinar la respuesta de un paciente a una terapia anti-TNF.

El término "biomarcador de degradación de colágeno" se refiere a una molécula, es decir, un gen (o ácido nucleico que codifica dicho gen), proteína, estructura de hidrato de carbono o glicolípido, que se asocia con la destrucción de colágeno. Un biomarcador de degradación de colágeno se utiliza para distinguir la actividad de la enfermedad, es decir, la destrucción del colágeno, en un sujeto del que se obtiene la muestra o tejido. En una realización, el biomarcador de la degradación de colágeno es un fragmento de colágeno, por ejemplo, un fragmento de colágeno de tipo II. El biomarcador de la degradación del colágeno utilizado en la invención es el C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II).

El término "biomarcador de sinovitis" se refiere a una molécula, es decir, un gen (o ácido nucleico que codifica dicho gen), proteína, estructura de hidrato de carbono o glicolípido, que se asocia con la sinovitis, o la inflamación de la membrana sinovial. Se puede utilizar un biomarcador sinovitis para indicar un aumento en el recambio, la proliferación, la degradación, la inflamación, la destrucción, la descomposición, la remodelación patológica o la degradación de las membranas sinoviales o del colágeno sinovial en un paciente. En una realización, un biomarcador de sinovitis es una endopeptidasa asociada con la degradación de la matriz extra-celular (MEC), p. ej., metaloproteinasas de la matriz. El biomarcador de sinovitis utilizado en la invención es la MMP-3.

El término "nivel patrón conocido" o "nivel de control" se refiere a un nivel aceptado o pre-determinado del biomarcador que se utiliza para comparar el nivel de biomarcador derivado de una muestra de un paciente. En una realización, el nivel patrón conocido del biomarcador de la degradación del colágeno y/o del biomarcador de sinovitis se basa en un sujeto o en sujetos que tienen EA, y, por lo tanto, representa el estado de enfermedad. En otra realización, el nivel patrón conocido del biomarcador indica un estado no afectado, es decir, sin enfermedad, de un sujeto que no tiene EA.

Cuando se compara con el nivel patrón conocido de un determinado biomarcador, la desviación del nivel patrón conocido generalmente indica o bien una mejora o bien el deterioro en el estado de la enfermedad. Alternativamente, cuando se compara con el nivel patrón conocido de un determinado biomarcador, la equivalencia con el nivel patrón conocido generalmente indica la confirmación de la actividad de la enfermedad, la confirmación de un estado de no enfermedad, o, si el nivel de biomarcador se obtiene del paciente después del tratamiento terapéutico para la enfermedad, el fracaso de una terapia para mejorar el estado de enfermedad de un paciente.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "expresión", cuando se utiliza en relación con la detección de la expresión de un biomarcador de la presente invención, puede referirse a la detección de la transcripción del gen que codifica una proteína biomarcadora, a la detección de traducción de la proteína biomarcadora, y/o a la detección de la proteína biomarcadora que resulta del metabolismo de una proteína más grande, p. ej., la degradación de colágeno de tipo II, que produce el fragmento CTX-II. La detección de la expresión de un biomarcador se refiere al acto de determinar activamente si un biomarcador se expresa o no. La cuantificación de la expresión se refiere al

- acto de determinar el nivel del biomarcador dado, p. ej., ng/ml. La detección y/o cuantificación de la expresión puede incluir la determinación de si la expresión del biomarcador está regulada al alza en comparación con un nivel patrón conocido, regulados a la baja en comparación con un nivel patrón conocido, o sustancialmente sin cambios en comparación con un nivel patrón conocido. Por lo tanto, la etapa de cuantificación y/o detección de la expresión no requiere que la expresión del biomarcador esté realmente regulada al alza o regulada a la baja, sino más bien, también puede incluir la detección de la no expresión del biomarcador o la detección de que la expresión del biomarcador no ha cambiado o no es diferente (es decir, la detección de la expresión no significativa del biomarcador o de ningún cambio significativo en la expresión del biomarcador en comparación con un control).
- 5
- 10 El término "nivel" o "cantidad", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad medible de un biomarcador. La cantidad puede ser (a) una cantidad absoluta, medida en moléculas, moles o peso por unidad de volumen o células o (b) una cantidad relativa, p. ej., medida mediante análisis densitométrico. En una realización preferida, se determinan los niveles de ARN y/o proteína del biomarcador.
- 15 El término "sujeto" o "paciente", según se utiliza en la presente memoria, se refiere tanto a un animal humano o no humano.
- El término "muestra" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una colección de células similares o tejido obtenidos a partir de un sujeto. La fuente de la muestra de tejido o de células puede ser un tejido sólido por ejemplo de un órgano o muestra de tejido o biopsia o producto aspirado fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualesquier componente de la sangre, o fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, orina, saliva, sudor o líquido sinovial. En una realización, el biomarcador sinovitis se obtiene de una muestra de suero. En una realización, el biomarcador de degradación de cartilago se obtiene de una muestra de orina.
- 20
- 25 Se pretende que el término "TNF α humano" (abreviado en la presente memoria como hTNF α , o simplemente hTNF), según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una citoquina humana que existe como una forma secretada 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 forma no covalente. La estructura del hTNF α se describe con más detalle 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. Se pretende que el término TNF α humano incluya TNF α humano recombinante (rhTNF α), que se puede preparar por medio de métodos de expresión recombinante convencionales o adquirir comercialmente (R & D Systems, número de catálogo 210-TA, Minneapolis, MN). El TNF α también es referido como TNF.
- 30
- 35 El término "inhibidor de TNF α " incluye agentes que interfieren en la actividad del TNF α .
- El término también incluye cada uno de los anticuerpos anti-TNF humanos y porciones de anticuerpo descritos en la presente memoria, así como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.090.382; 6.258.562; 6.509.015, 7.223.394 en el documento US 2003/0219438 A1. El inhibidor de TNF α utilizado en la presente descripción es un anticuerpo anti-TNF α , o un fragmento del mismo, incluyendo infliximab (Remicade[®], Johnson and Johnson; descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.656.272, CDP571 (un anticuerpo IgG4 anti-TNF-alfa monoclonal humanizado), CDP 870 (un fragmento de anticuerpo anti-TNF-alfa monoclonal humanizado), un dAb anti-TNF (Peptech), CNTO 148 (golimumab; Medarex y Centocor, véase el documento WO 02/12502), y adalimumab (Humira[®] Abbott Laboratories, un mAb anti-TNF humano, descrito en el documento US 6.090.382 como D2E7).
- 40
- 45 Otros anticuerpos para TNF que se pueden utilizar en la presente descripción se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.593.458; 6.498.237; 6.451.983; y 6.448.380.
- En otro aspecto de la presente descripción, el inhibidor de TNF α es una proteína de fusión de TNF, p. ej., etanercept (Enbrel[®], Amgen; descrito en los documentos WO 91/03553 y WO 09/406476. En otro aspecto de la presente descripción el inhibidor de TNF es una proteína de unión a TNF recombinante (r-TBP-1) (Serono).
- 50
- Se pretende que el término "anticuerpo", según se utiliza en la presente memoria, se refiera a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los anticuerpos de la invención se describen con más detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.090.382; 6.258.562; y 6.509.015.
- 60

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., HTNFA). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo completo. Los ejemplos de los fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que permite que sean elaborados en forma de una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse p. ej., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. USA 85:5879-5883). Se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla también estén incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También están incluidas otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto 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 p. ej., Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. EE.UU. 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Estructura 2:1121-1123). Las porciones de anticuerpo de la presente descripción se describen con más detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.090.382, 6.258.562, 6.509.015. El inhibidor de TNF utilizado en la invención es adalimumab.

Los fragmentos de unión se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas sencillas, y anticuerpos de cadena sencilla. Aparte de las inmunoglobulinas o anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que una inmunoglobulina o anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir por una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o conexión de fragmentos Fab'. Véanse, p. ej., Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Una "sustitución de aminoácidos conservativa", según se utiliza en la presente memoria, es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica, incluyendo cadenas laterales alcalinas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Los "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o perteneciente a una clase concreta, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo a las secuencias correspondientes de otras especies. En un aspecto, la descripción destaca un anticuerpo quimérico o fragmento de unión a antígeno, en los que las regiones variables de las cadenas tanto ligera como pesada imitan las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otras especies. En un aspecto preferido de la descripción, los anticuerpos quiméricos se elaboran injertando CDR de un anticuerpo de ratón en las regiones marco de un anticuerpo humano.

Los "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que comprenden al menos una cadena que comprende residuos variables de la región marco sustancialmente de una cadena de anticuerpo humano (mencionado como inmunoglobulina o anticuerpo aceptor) y al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) sustancialmente de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón). Además del injerto de las CDR, los anticuerpos humanizados típicamente experimentan alteraciones adicionales con el fin de mejorar la afinidad y/o la inmunogenicidad.

El término "anticuerpo multivalente" se refiere a un anticuerpo que comprende más de un sitio de reconocimiento de antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo "bivalente" tiene dos sitios de reconocimiento de antígeno, mientras que un anticuerpo "tetraivalente" tiene cuatro sitios de reconocimiento de antígeno. Los términos "monoespecífico", "biespecíficos", "triespecífico", "tetraespecífico", etc. se refieren al número de especificidades de los sitios de reconocimiento de antígenos diferentes (en oposición al número de sitios de reconocimiento de antígenos) presentes en un anticuerpo multivalente. Por ejemplo, los sitios de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo

"monoespecífico" se unen todos al mismo epítipo. Un anticuerpo "bienespecífico" o "específico dual" tiene al menos un sitio de reconocimiento de antígeno que se une a un primer epítipo y al menos un sitio de reconocimiento de antígeno que se une a un segundo epítipo que es diferente del primer epítipo. Un anticuerpo "monoespecífico multivalente" tiene múltiples sitios de reconocimiento de antígenos que se unen todos al mismo epítipo. Un anticuerpo "bienespecífico multivalente" tiene múltiples sitios de reconocimiento de antígeno, varios de los cuales se unen a un primer epítipo y varios de los cuales se unen a un segundo epítipo que es diferente del primer epítipo.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular, la CDR3. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como ratón, hayan sido injertadas en secuencias marco humanas.

Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", según se utiliza en la presente memoria, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula anfitriona (descrita adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante (descrita adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase p. ej. Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res.. 20:6287) o anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por cualquier otro medio que implica el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de este modo las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tales anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, y específicos duales pueden ser producidos mediante mecanismos de ADN recombinante conocidos en la técnica, por ejemplo usando métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.500.362; el documento EP 0184187; el documento EP 171496; el documento EP 0173494; la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 86/01533; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567; el documento EP 0125023; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) Biotechniques 4:214; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.225.539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoevan et al. (1988) Science 239:1534; y Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4453-4060, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), el documento US 5.530.101, el documento US 5.585.089, el documento US 5.693.761, el documento US 5.693.762, Selick et al., documento WO 90/07861, y Winter, documento US 5.225.539.

Se pretende que un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej. un anticuerpo aislado que se une específicamente hTNF α está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hTNF α). Un anticuerpo aislado que se une específicamente hTNF α puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de TNF de otras especies (comentado con más detalle a continuación). Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

Se pretende que un "anticuerpo neutralizador", según se utiliza en la presente memoria (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad hTNF α "), se refiera a un anticuerpo cuya unión a hTNF α de como resultado la inhibición de la actividad biológica de hTNF α . Esta inhibición de la actividad biológica de hTNF α se puede evaluar mediante la medición de uno o más indicadores de la actividad biológica de hTNF α , tales como la citotoxicidad inducida por hTNF α (ya sea *in vitro* o *in vivo*), la activación celular inducida por hTNF α y la unión de hTNF α a receptores de hTNF α . Estos indicadores de la actividad biológica del hTNF α pueden evaluarse por uno o más de varios análisis *in vitro* o *in vivo* convencionales conocidos en la técnica (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.382). Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad de hTNF α se evalúa mediante la inhibición de la citotoxicidad inducida por hTNF α de células L929. Como parámetro adicional o alternativo de la actividad de hTNF α , se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo para inhibir la expresión inducida por hTNF α de ELAM-1 sobre HUVEC, como una medida de la activación celular inducida por hTNF α .

- 5 El término "resonancia de plasmón superficial", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la 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 una descripción más detallada, véase el Ejemplo 1 de la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.258.562 y Jönsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19; Jönsson et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125; y Johnson et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268.
- 10 Se pretende que el término " K_{off} ", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la constante de la velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.
- Se pretende que el término " K_d ", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.
- 15 Se pretende que el término " CI_{50} " según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la concentración de inhibidor requerida para inhibir el criterio de valoración biológico de interés, p. ej., neutralizar la actividad de citotoxicidad.
- 20 Se pretende que el término "molécula de ácido nucleico", según se utiliza en la presente memoria, incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, pero preferiblemente es ADN de doble hebra.
- 25 Se pretende que el término "molécula de ácido nucleico aislada", según se utiliza en la presente memoria en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos (p. ej., VH, VL, CDR3) que se unen a hTNF α , haga referencia a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de hTNF α , cuyas otras secuencias pueden flanquear de forma natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. De este modo, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región VH de un anticuerpo anti-hTNF α no contiene otras secuencias que codifican otras regiones VH que se unen a antígenos distintos de hTNF α .
- 30 Se pretende que el término "vector", según se utiliza en la presente memoria, haga 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 bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo replican junto con el genoma del anfitrión. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están conectados operativamente. Tales vectores son referidos en la presente memoria 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 a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.
- 35 Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que se pretende que tales términos hagan referencia no solo a la célula sujeto concreta sino a la progenie de semejante célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún están incluidas dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria.
- 40 Se pretende que el término "dosis", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cantidad de inhibidor de TNF α que se administra a un sujeto.
- 45 El término "dosis variables múltiples" incluye diferentes dosis de un inhibidor de TNF α que se administran a un sujeto para el tratamiento terapéutico. "Régimen de dosis variables múltiples" o "terapia de dosis variables múltiples" describen un programa de tratamiento que se basa en la administración de diferentes cantidades de inhibidor de TNF α en varios momentos durante todo el curso del tratamiento. Los regímenes de dosis variables múltiples se describen en el documento WO 05/110452.
- 50 El término "dosificación", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la administración de una sustancia (p. ej., un anticuerpo anti-TNF α) para lograr un objetivo terapéutico (p. ej., el tratamiento de la artritis reumatoide).
- 55
- 60
- 65

Los términos "régimen de dosificación cada dos semanas", "dosificación cada dos semanas", y "administración cada dos semanas", según se utiliza en la presente memoria, se refieren al transcurso del tiempo en la administración de una sustancia (p. ej., un anticuerpo anti-TNF α) a un sujeto para lograr un objetivo terapéutico. No se pretende que el régimen de dosificación cada dos semanas incluya un régimen de dosificación semanal. Preferiblemente, la sustancia se administra cada 9-19 días, más preferiblemente, cada 11-17 días, incluso más preferiblemente, cada 13-15 días, y lo más preferiblemente, cada 14 días.

El término "combinado", como en la frase "un primer agente combinado con un segundo agente" incluye la administración simultánea de un primer agente y un segundo agente, que por ejemplo pueden estar disueltos o entremezclados en el mismo portador farmacéuticamente aceptable, o la administración de un primer agente, seguido del segundo agente, o la administración del segundo agente, seguido del primer agente. La presente descripción, por lo tanto, incluye métodos de tratamiento terapéutico combinados y las composiciones farmacéuticas combinadas.

El término "concomitante", como en la frase "tratamiento terapéutico concomitante" incluye la administración de un agente en presencia de un segundo agente. Un método de tratamiento terapéutico concomitante incluye métodos en los que se administraron conjuntamente el primer, segundo, tercer agentes, o agentes adicionales. Un método de tratamiento terapéutico concomitante también incluye métodos en los que el primer agente o agentes adicionales se administran en presencia de un segundo agente o agentes adicionales, en donde el segundo agente o agentes adicionales, por ejemplo, pueden haber sido administrados previamente. Un método de tratamiento terapéutico concomitante puede ser ejecutado por etapas por los diferentes actores. Por ejemplo, un actor puede administrar a un sujeto un primer agente y un segundo actor puede administrar al sujeto un segundo agente, y las etapas de administración se pueden ejecutar al mismo tiempo, o casi al mismo tiempo, o momentos distantes, siempre y cuando el primer agente (y agentes adicionales) estén después de la administración en presencia del segundo agente (y agentes adicionales). El actor y el sujeto pueden ser la misma entidad (p. ej., ser humano).

El término "terapia de combinada", según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la administración de dos o más sustancias terapéuticas, p. ej., un anticuerpo anti-TNF α y otro fármaco. El otro u otros fármacos se puede administrar de manera concomitante, antes, o después de la administración de un anticuerpo anti-TNF α .

El término "kit" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un producto envasado que comprende componentes con los cuales administrar el anticuerpo para TNF α de la invención para el tratamiento de un trastorno relacionado con TNF α . El kit comprende preferiblemente una caja o contenedor que contiene los componentes del kit. A la caja o contenedor se le colocará una etiqueta con un protocolo aprobado por la Administración para Alimentos y Fármacos. La caja o contenedor contiene los componentes de la invención que están contenidos preferiblemente dentro de recipientes de plástico, polietileno, polipropileno, etileno, o propileno. Los recipientes pueden ser tubos tapados o botellas. El kit también puede incluir instrucciones para la administrar del anticuerpo para TNF α de la descripción. En una realización, el kit de la descripción incluye la formulación que comprende el anticuerpo humano D2E7, como se describe en los documentos US 8.216.583 y US 2004/00 33228 A1.

Los diferentes aspectos de la invención se describen con más detalle en la presente memoria.

II. Biomarcadores de degradación del cartílago y espondilitis

Existe la necesidad de establecer una herramienta de evaluación útil para la espondilitis anquilosante (EA) para poder determinar las mejoras, especialmente las primeras mejoras estructurales, en pacientes con EA sometidos a terapia con inhibidores de TNF. En la actualidad, la velocidad de sedimentación globular (VSG) y el nivel de proteína C-reactiva (CRP) son los métodos más ampliamente utilizados para la evaluación de la actividad de la EA, sin embargo, estos marcadores solos son insuficientes para evaluar la actividad de la enfermedad EA (Ruof y Stucki (1999) J Rheumatol 26:966). La invención, según se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona biomarcadores que han sido identificados por ser útiles en la evaluación de la capacidad de una terapia anti-TNF para prevenir el daño estructural asociado con la EA en un paciente. Además, la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona un método para determinar la respuesta de un paciente a las mejoras en la destrucción estructural de las articulaciones asociada con la EA. Los métodos descritos en la presente memoria identifican cambios en el progreso del daño estructural en un paciente que podrían no ser fácilmente evidentes utilizando medios más tradicionales, tales como la radiografía. Los métodos de la invención son ventajosos, ya que proporcionan un medio al médico para determinar la eficacia de un tratamiento anti-TNF en un paciente sin tener que esperar a los resultados clínicos, que pueden tardar períodos de tiempo prolongados.

En general, la presente descripción incluye la comparación de niveles de biomarcadores de un paciente que tiene EA, o se sospecha que tiene EA, con un nivel patrón conocido asociado con la actividad de la enfermedad, para determinar si el nivel de biomarcador del paciente aumenta, disminuye, o es el mismo, con respecto al control. En la determinación de la eficacia de un inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA en un paciente, en particular con respecto a la mejora del daño estructural, los niveles de biomarcadores pueden ser pre-determinados, o,

alternativamente, pueden incluir la obtención de una muestra del paciente y la utilización posterior del nivel de biomarcador determinado a partir de la muestra en la evaluación comparativa de la presente descripción.

La presente descripción identifica ciertos biomarcadores asociados con la destrucción estructural, incluyendo la degradación del cartílago y la sinovitis, que se pueden utilizar para determinar si la terapia anti-TNF elegida es adecuada para el tratamiento o si se debe considerar una terapia diferente, incluyendo una terapia anti-TNF diferente. Tales medios de predicción benefician a la salud general del sujeto, ya que se pueden elaborar respuestas más rápidas para determinar la terapia apropiada. Los métodos descritos en la presente memoria también disminuyen el coste global del proceso de tratamiento al eliminar más rápidamente mediante las terapias ineficaces.

La presente descripción proporciona un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF para el tratamiento de una espondiloartropatía, p. ej., espondilitis anquilosante, que comprende la medición de los biomarcadores para la destrucción del cartílago y la sinovitis. La eficacia se determina de acuerdo con la capacidad del inhibidor de TNF para disminuir los biomarcadores que se sabe que reflejan la actividad de la enfermedad con respecto al la degradación del cartílago y/o la sinovitis en un sujeto.

En un aspecto, la presente descripción incluye un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF α , por ejemplo, un anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA), en el que un nivel pre-determinado de un biomarcador de la degradación de colágeno y/o un biomarcador de la sinovitis de un paciente que tiene EA después del tratamiento con el inhibidor de TNF α (nivel de biomarcador post-tratamiento) se compara con un nivel patrón conocido del biomarcador de degradación del colágeno y/o el biomarcador de sinovitis asociados con el estado de la enfermedad. Una vez que se comparan los dos niveles, se determina si el nivel de biomarcador de la degradación de colágeno y/o del biomarcador de sinovitis post-tratamiento del paciente es más bajo que el nivel patrón conocido, en donde el nivel inferior de biomarcador de degradación del colágeno y/o de biomarcador de sinovitis del paciente después del tratamiento con el inhibidor de TNF con respecto al nivel patrón conocido indica la eficacia del inhibidor de TNF α para el tratamiento de la EA.

Específicamente de acuerdo con una primera realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) y del nivel de post-tratamiento de la metaloproteasa de matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenidas del sujeto que tiene EA en donde un nivel más bajo de post-tratamiento de CTX-II en la muestra o las muestras con respecto a un tratamiento conocido de CTX-II basado en uno o varios sujetos que tienen EA y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 en la muestra o las muestras con respecto a un nivel patrón conocido de MMP-3 basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF, por ejemplo, un anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, para la espondilitis anquilosante (EA) que comprende la comparación de un nivel de pre-tratamiento de un biomarcador de degradación de colágeno y/o un biomarcador de sinovitis obtenido a partir de un paciente que tiene EA con un nivel de post-tratamiento del biomarcador de degradación de colágeno y/o el biomarcador de sinovitis obtenidos de dicho paciente, en donde un nivel de biomarcador post-tratamiento inferior indica la eficacia del inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA en el paciente.

Al disminuir el nivel de un biomarcador asociado con la degradación del cartílago y/o sinovitis, se puede utilizar un inhibidor de TNF para disminuir o prevenir el daño estructural asociado con la EA. Específicamente, de acuerdo con una segunda realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia del adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de pre-tratamiento del C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II), y un nivel de pre-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenidas del sujeto que tiene EA, en donde un nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II con respecto al nivel de pre-tratamiento de CTX-II y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 con respecto al nivel de pre-tratamiento de MMP3 indican que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto. En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de seguimiento de la eficacia de un inhibidor de TNF, p. ej., un anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, para la disminución de la progresión del daño estructural asociado con la espondilitis anquilosante (EA) en un paciente, que comprende la determinación del nivel de un biomarcador de la degradación de colágeno y/o un biomarcador de sinovitis en un paciente y la comparación del nivel del biomarcador de degradación de colágeno y/o un biomarcador de sinovitis con un nivel patrón conocido del biomarcador de degradación de colágeno y/o un biomarcador de sinovitis asociados con la EA. En este caso, una disminución en el nivel del biomarcador del paciente con respecto al nivel patrón conocido indica que el inhibidor del TNF es eficaz para disminuir la velocidad de progresión del daño estructural asociado con la EA en el paciente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para predecir la eficacia de un inhibidor de TNF, p. ej., un anticuerpos para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de la EA

en un paciente que comprende la comparación de un nivel pre-determinado de un biomarcador de degradación de colágeno y/o un biomarcador de sinovitis del paciente después del siguiente tratamiento con el anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, con un nivel patrón conocido del biomarcador de degradación de colágeno y/o un biomarcador de sinovitis de un paciente que tiene EA. Basándose en los niveles de los dos biomarcadores, se realiza una evaluación con respecto a si el de post-tratamiento del paciente es inferior al nivel patrón conocido del biomarcador de degradación de colágeno y/o del biomarcador de sinovitis. En este caso, un nivel inferior de biomarcador de degradación de colágeno y/o de biomarcador de sinovitis del paciente con respecto al nivel patrón conocido indica que se prevé que el anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, son eficaces para el tratamiento de la EA en el paciente.

En las situaciones anteriores en las que se determina que el inhibidor del TNF es eficaz en la reducción de los biomarcadores asociados con la destrucción del cartílago y/o la sinovitis, que, a su vez, refleja una disminución en la destrucción estructural, es decir, la destrucción de la articulación, se puede considerar la continuación del tratamiento con el inhibidor de TNF. En un aspecto de la presente descripción, se puede considerar la administración del mismo régimen de dosificación al paciente. Alternativamente, se puede considerar la reducción de la dosis del inhibidor de TNF que se ha demostrado que es eficaz en el tratamiento de la EA en el paciente.

La presente descripción proporciona un método de uso de un biomarcador de la degradación de cartílago solo o combinado con un biomarcador de sinovitis, así como un método de uso de un biomarcador de sinovitis solo o combinado con un biomarcador de la degradación de cartílago, para determinar la eficacia de un tratamiento con inhibidor del TNF para la EA.

Además, el análisis del biomarcador de degradación de colágeno y/o de sinovitis puede llevarse a cabo en una muestra de un paciente que todavía no ha recibido terapia con un inhibidor de TNF. Se puede realizar un análisis de biomarcadores de degradación del colágeno y sinovitis para determinar si es probable que el paciente responda al tratamiento con un anticuerpo anti-TNF α , p. ej., adalimumab. Niveles comparables de un biomarcador de degradación de colágeno y/o de sinovitis de una muestra de un paciente con respecto a un nivel patrón conocido caracterizado como un nivel indicativo de EA, pueden indicar que el paciente tiene EA y, por lo tanto, sería un candidato para el tratamiento con un inhibidor de TNF. En consecuencia, semejante paciente puede ser seleccionado para el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF α , p. ej., adalimumab, con el fin de prevenir el daño estructural que puede ocurrir con la progresión de la enfermedad.

En un aspecto de la presente descripción, el nivel de control se basa en el propio nivel basal del paciente de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis, donde el nivel basal se determina antes del tratamiento con el inhibidor de TNF. En tal caso, el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis que se determina después del tratamiento se compara con el nivel basal del paciente. Después de eso, se realiza una determinación de si el inhibidor de TNF es eficaz en función de si el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis disminuía en el paciente después del tratamiento. En otro aspecto de la presente descripción, el nivel basal que se utiliza como un control se basa en el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis del propio paciente en un momento dado durante el tratamiento con el inhibidor de TNF, donde el nivel basal en el momento dado durante el tratamiento se compara con un nivel de biomarcador en un momento dado a partir de entonces mientras el paciente permanece en tratamiento.

En un aspecto de la presente descripción, el nivel patrón conocido se basa en un nivel aceptado de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis asociado con el estado de la enfermedad, es decir, asociado con el paciente o los pacientes que tienen EA. El nivel patrón conocido del nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis puede basarse en un solo paciente con EA o, alternativamente, en el promedio obtenido a partir de un grupo de pacientes con EA. Por ejemplo, el nivel patrón conocido de MMP-3 en suero para un paciente con EA está entre aproximadamente 10-200, aproximadamente 15-180, aproximadamente 20-140, aproximadamente 30-120, aproximadamente 40-100, aproximadamente 50-80, aproximadamente 25-57, o aproximadamente 60-70 ng/ml. En otro aspecto de la presente descripción, el nivel patrón conocido de CTX-II en la orina para un paciente con EA está entre aproximadamente 300-1000, aproximadamente 300-800, aproximadamente 300-600, aproximadamente 315-395, aproximadamente 320-390, aproximadamente 325-385, aproximadamente 330-380, aproximadamente 325-385, aproximadamente 324-388, aproximadamente 335-375, aproximadamente 340-370, aproximadamente 345-365, o aproximadamente 350-360 ng/ml.

Alternativamente, en otro aspecto de la presente descripción, el nivel patrón conocido puede estar basado en los niveles de biomarcadores de degradación de cartílago y/o sinovitis, de uno o varios sujetos sanos no afectados. El nivel patrón conocido del nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis puede basarse en un único sujeto sano, no afectado o, alternativamente, en un promedio de un grupo de sujetos sanos, no afectados. Los ejemplos de los valores normales de CTX-II en orina, es decir, los valores de sujetos sin EA, sanos, son descritos por Haima (2005) *Osteo Medical Group Clinical and Technical Monograph* y Mouritzen et al. (2003) *Analys Of the Rheumatic Diseases* 62:332. Por ejemplo, en un aspecto de la presente descripción, el nivel patrón conocido de MMP-3 en suero en un sujeto sano, no afectado está entre aproximadamente 13 y 15 ng/ml (véase Chen et al. (2006) *Rheumatology* 45:414).

También se pretende que los intervalos intermedios de los niveles de biomarcadores anteriormente citados, p. ej. de aproximadamente 323 a aproximadamente 329 mg/ml de CTX-II en orina, sean parte de esta descripción. Además, se pretende que estén incluidos los intervalos de los valores utilizando una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superior y/o inferior. Además, no se pretende que los límites superiores descritos anteriormente sean limitantes con respecto al aumento de los niveles de MMP-3 y CTX-II en pacientes con EA.

El nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis se considera alterado con respecto al control, esto es, el nivel de pre-tratamiento del paciente o un nivel patrón conocido, si el nivel es mayor/aumentado o menor/reducido con respecto al control. En una realización, se considera que el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis deriva de un paciente con EA es mayor/aumentado con respecto al nivel de control si el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis es mayor/aumentado que el nivel de control en una cantidad que es mayor que el error estándar del análisis utilizado para evaluar el nivel. En una realización, el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis derivado de un paciente con EA se considera menor/reducido con respecto al el nivel de control si el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis es menor/reducido que el nivel de control en una cantidad que es mayor que el error estándar del análisis utilizado para evaluar el nivel. En otra realización, el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis derivado de un paciente enfermo puede ser considerado mayor/aumentado o menor/reducido que el nivel de control si la diferencia en el nivel de control y el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis derivado de una muestra del paciente es al menos aproximadamente dos, tres, cuatro, o cinco veces, mayor o menor que el error estándar de las mediciones de control y de la muestra.

En una realización, se muestra la eficacia del inhibidor de TNF cuando los niveles de CTX-II de un sujeto que tiene EA disminuyen al menos en aproximadamente 9% con respecto al nivel basal o al nivel patrón conocido. En una realización, la eficacia del inhibidor de TNF se muestra cuando los niveles de MMP-3 disminuyen al menos en aproximadamente 8% con respecto al nivel basal o nivel patrón conocido para un sujeto que tiene EA. En una realización adicional, la eficacia del inhibidor de TNF se muestra cuando los niveles de MMP-3 disminuyen los en al menos aproximadamente 12% con respecto al nivel basal o al nivel patrón conocido para un sujeto que tiene EA.

También se pretende que los intervalos intermedios de los niveles de biomarcadores anteriormente citados, p. ej. de aproximadamente 8 a aproximadamente 10%, sean parte de esta invención. Además, se pretende que estén incluidos los intervalos de valores obtenidos utilizando una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superior y/o inferior. Además, no se pretende que los límites porcentuales superiores descritos anteriormente sean limitantes con respecto al porcentaje de disminución de los niveles de MMP-3 y CTX-II en pacientes con EA, es decir, la invención también contempla porcentajes de disminución mayores. Específicamente, de acuerdo con una tercera realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia del adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de post-tratamiento del C- telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II), y del nivel de post-tratamiento de la metaloproteasa de matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenida del sujeto que tiene EA, en donde un nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II con respecto a un nivel de pretratamiento de CTX-II y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 con respecto a un nivel de pre-tratamiento de MMP3 indican que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

Específicamente, de acuerdo con una cuarta realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia del adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación del nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) en una o varias muestras del sujeto que tiene EA, en donde una disminución en el nivel de CTX-II de al menos 9% con respecto a un nivel patrón conocido de CTX-II basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

Biomarcadores de la degradación del cartílago

El cartílago articular se compone en gran parte de una red fibrilar basada en colágeno de tipo II, que forma complejo con el proteoglicano agrecano (véase Poole AR, 2003. Rheum Dis Clin North Am. 29:803-818 y Eyre (1991) Semin Arthritis Rheum. 21 (3 Suppl 2):2-11). En las enfermedades de las articulaciones, el colágeno de tipo II es escindido progresivamente por las colagenasas. El colágeno de tipo II es degradado de manera que los productos del proceso de degradación encajan en tres grupos de acuerdo con la localización del epítipo concreto dentro de la molécula de colágeno (para una revisión véase Birmingham et al. (2006) Biomarker Insights 2:61).

Los diferentes tipos de epítipos, incluyendo neoepítipos y epítipos de telopéptidos, se pueden utilizar como indicadores de eventos de degradación asociados con el colágeno.

El colágeno de tipo II maduro consiste en una estructura de triple hélice con telopéptidos cortos en ambos extremos. Los telopéptidos están entrecruzados covalentemente con otras cadenas de colágeno y sirven para conectar moléculas de colágeno individuales en una red fibrilar rígida. Los fragmentos de colágeno maduro se generan cuando la matriz extracelular del cartílago se degrada. Tales fragmentos se encuentran tanto en suero como en la orina y se pueden medir como marcadores del catabolismo del cartílago. Los telopéptidos incluyen col2CTx y CTX-II

(documento WO 91/08478; Christgau et al. (2001) Bone 29:209; Matyas et al. (2004) Arthritis Rheum 50:543 y Eyre (1989) "Peptide fragments containing HP and LP cross-links, USP 5702909).

La proteólisis causa una pérdida de epítomos de colágeno de tipo II en los fluidos corporales, por lo tanto, mediante el examen de los epítomos de colágeno de tipo II en los fluidos corporales, se puede determinar la cantidad de degradación de colágeno (véase Birmingham et al. (2006) Biomarker Insights 2:61y Christgau et al. (2001) Bone 29:209). La capacidad para controlar y frenar o revertir el proceso de degradación del colágeno es importante desde un punto de vista clínico, ya que se considera que la extensa degradación de las fibras de colágeno de tipo II entrecruzadas maduras es una fase crítica, posiblemente incluso irreversible, en la destrucción de la articulación (Billinghurst et al. (1997)).

El enfoque descrito en la presente memoria utiliza biomarcadores de degradación de cartílago para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA, que tiene un componente de enfermedad que incluye daño estructural, es decir, daño en las articulaciones. De acuerdo con las realizaciones descritas en la presente memoria, CTX-II, que se localiza casi exclusivamente en el cartílago, se utiliza en los métodos de la invención como biomarcador de descomposición de cartílago.

CTX-II

En una realización preferida, el biomarcador de degradación de colágeno es el C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II). El CTX-II es un fragmento de colágeno, procedente del colágeno de tipo II C-terminal. El CTX-II es idéntico a neopeptido Col2CTX, que se encuentra en el extremo C-terminal de 1/4 de longitud del fragmento del colágeno de tipo II escindido (para una revisión, véase Birmingham et al. (2006)).

El CTX-II es conocido como un biomarcador para la degradación del cartílago. El CTX-II se asoció primero con la degradación del cartílago en pacientes con artrosis de rodilla (Garnero et al. (2001) Annals Rheum Dis 60:619), en donde se determinó con posterioridad la elevación de CTX-II en orina de pacientes con osteoartritis grave (Jung et al. (2004) Pathobiol 71:70). También se ha demostrado que CTX-II se correlaciona con el grado de destrucción de la articulación (Christgau et al. (2001) Bone 29:209; Garnero y Delmas (2003) Curr Op Rheumat 25:641).

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF α para el tratamiento de la EA en un paciente que comprende la comparación de un nivel pre-determinado de CTX-II del paciente después del tratamiento con el inhibidor de TNF α con un nivel patrón conocido de CTX-II asociada con EA. A continuación se realiza una evaluación, con respecto a la relación entre los dos niveles de CTX-II para determinar si el nivel de CTX-II post-tratamiento del paciente es más baja que el nivel patrón conocido de CTX-II. Una disminución del nivel de CTX-II con respecto a un patrón conocido que representa el estado de enfermedad de EA indica que el inhibidor de TNF α es eficaz para el tratamiento de la EA en el paciente. En tal caso, el nivel patrón conocido representaría un nivel de CTX-II de un sujeto que tiene actividad de la enfermedad EA, es decir, un paciente afectado no tratado.

Específicamente, de acuerdo con su cuarta realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método la determinación de un nivel de post-tratamiento de C- telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) en una o varias muestras del sujeto que tiene EA, en donde una disminución en el nivel de CTX-II de al menos 9% con respecto a un nivel patrón conocido de CTX-II basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF α para la disminución de los daños estructurales asociados con la espondilitis anquilosante (EA) en un paciente que comprende la comparación de un nivel pre-determinado de CTX-II del paciente que tiene EA después del tratamiento con el inhibidor de TNF α con un nivel patrón conocido de CTX-II asociado con EA. A continuación se realiza una evaluación, con respecto a los dos niveles de CTX-II para determinar si el nivel de CTX-II post-tratamiento del paciente es más bajo que el nivel patrón conocido de CTX-II. Si el nivel de CTX-II del paciente es inferior que el de CTX-II con respecto al nivel patrón conocido, tal resultado indica que el inhibidor de TNF α es eficaz para disminuir el daño estructural asociado con la EA en el paciente.

En un aspecto, la descripción describe un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF α para el tratamiento de la EA en un paciente que comprende la comparación de un nivel de post-tratamiento de CTX-II predeterminado, obtenido del paciente con un nivel de pre-tratamiento de CTX-II predeterminado, obtenido del paciente. A continuación se realiza una evaluación, con respecto a los dos niveles de CTX-II para determinar si el nivel de post-tratamiento de CTX-II es más bajo que el nivel de pre-tratamiento CTX-II, en donde un nivel de post-tratamiento de CTX-II inferior del paciente con respecto al nivel de pre-tratamiento CTX-II indica que el inhibidor de TNF α es eficaz para el tratamiento de la EA en el paciente.

Biomarcadores de sinovitis

Se sabe ahora que la sinovitis (inflamación) se produce pronto en enfermedades inflamatorias, tales como la osteoartritis, y se asocia con la progresión radiológica de la enfermedad. Es probable que el proceso por el cual la inflamación, incluyendo la inflamación subclínica, puede agravar el daño articular implique cambios en la función de los condrocitos, intensifique la angiogénesis y/o acelere el recambio óseo (Bonnet y Walsh DA. (2005) *Rheumatology* 44:7-16). La presente descripción utiliza biomarcadores sinoviales para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF α para el tratamiento de la EA. En un aspecto, la MMP-3 del suero, que probablemente se origina en la articulación inflamada (Kruithof et al. (2005) *Arthritis Rheum* 52:3898), se utiliza como un biomarcador de sinovitis para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA.

MMP-3

La degradación de las moléculas de la matriz del cartílago implica endopeptidasas dependientes de cinc, es decir, metaloproteinasas de la matriz (MMP). Las MMP, una familia de endopeptidasas dependientes de Zn $^{2+}$, escinden los constituyentes de la matriz extracelular (MEC) tales como colágenos y proteoglicanos. Las MMP median diferentes procesos fisiológicos mediante la digestión de los componentes de la matriz extracelular.

La MMP3 es una enzima que degrada la fibronectina, la laminina, el colágeno III, IV, IX, y X, y los proteoglicanos del cartílago. Actualmente hay al menos 20 tipos de MMP humanas, que se agrupan de acuerdo con la estructura y el sustrato específico en: colagenasa (MMP-1, 8, 13), estromelisin, gelatinasa (MMP-2, 9) y metaloproteinasas de unión a la membrana plasmática (véase, p. ej. Nabeshima K et al. 2002 *Pathol Int.* 52: 255-64).

En un aspecto preferido de la presente descripción, el biomarcador de sinovitis utilizado en la invención es la MMP-3. Se ha demostrado que los niveles en suero de MMP-3 aumentan en las enfermedades reumáticas inflamatorias caracterizadas por sinovitis de las articulaciones, tales como la AR, la polimialgia reumática, la artritis psoriásica, y la artritis cristalina aguda. Se acepta que los niveles en suero de MMP-3 reflejan la inflamación sinovial (véase Ribbens et al. (2002) *Annals of the Rheumatic Diseases* 61:161). Además, estudios previos han correlacionado las metaloproteinasas de matriz (MMP), específicamente la MMP-3 (stromelisin 1), con el valor del índice de actividad de la enfermedad espondilitis anquilosante de Bath (BASDAI) en pacientes con EA (véase Yang, C. et al. (2004) *Arthritis Rheum* 51:691-9).

La secuencia de aminoácidos de la MMP-3 es conocida y se puede encontrar, por ejemplo, en el Núm. de Acceso GenBank AA107491. La secuencia de ácido nucleico de la MMP-3 también es conocida y se puede encontrar, por ejemplo, en el Núm. de acceso GenBank NM002422.

La invención incluye adicionalmente el uso del biomarcador de la degradación de cartílago, específicamente, CTX-II, y el biomarcador de sinovitis, específicamente, MMP-3, el primero ya sea solo o combinado con el segundo, para lograr los métodos de la invención. Además, la invención se puede utilizar combinada con la proteína C reactiva para determinar adicionalmente la eficacia del inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA.

Los niveles de proteína C-reativa (CRP) se pueden utilizar combinados con un biomarcador de la degradación de cartílago, p. ej., CTX-II, y el biomarcador de sinovitis, p. ej., MMP-3, como indicador del estado de enfermedad de la EA y de la eficacia de una terapia anti-TNF dada. La CRP pertenece a la familia de proteínas de la pentraxina, denominada así porque tiene cinco subunidades idénticas, codificadas por un único gen en el cromosoma 1, que se asocian para formar una estructura pentamérica de tipo disco estable. La CRP se elabora exclusivamente en el hígado y es secretada en mayor cantidad en el plazo de 6 horas de un estímulo inflamatorio agudo. Los niveles elevados de CRP proporcionan un índice sensible de la inflamación en curso, y, por lo tanto, proporciona, un valioso complemento para una evaluación clínica cuidadosa. Análisis para determinar el nivel de biomarcadores

El nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis en una muestra se puede analizar mediante varias metodologías conocidas en la técnica. Una vez que se obtiene la muestra del paciente, se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica que sea adecuado para detectar y cuantificar un biomarcador de degradación de cartílago o sinovitis para su uso en los métodos de la invención (ya sea a nivel de ácido nucleico o, preferiblemente, a nivel de proteínas). Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a transferencias Western, transferencias Northern, transferencias Southern, inmunohistoquímica, ELISA, p. ej., ELISA amplificado, análisis cuantitativos basados en sangre, p. ej., ELISA de suero, análisis cuantitativos basados en orina, p. ej., para examinar los niveles de expresión o degradación de proteína en el caso de CTX-II, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunocitoquímica, análisis espectrométricos de masas, p. ej., MALDI-TOF y SELDI-TOF, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácidos nucleicos. Los ejemplos de tales análisis se describen en más detalle a continuación:

Análisis basados en proteínas

Los métodos de la invención se pueden realizar usando análisis basados en proteínas para determinar el nivel del biomarcador dado. Los ejemplos de los análisis basados en proteínas incluyen análisis inmunohistoquímico y/o Western, análisis cuantitativos basados en sangre, p. ej., ELISA de suero, y análisis cuantitativos basados en orina, p. ej. ELISA de orina. En una realización, se lleva a cabo un inmunoanálisis para proporcionar una evaluación cuantitativa del biomarcador dado.

Las proteínas de las muestras de los pacientes se pueden aislar usando mecanismos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados pueden ser, por ejemplo, los descritos por Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La cantidad de biomarcador de degradación de cartílago o de sinovitis puede determinarse mediante la detección o la cuantificación del correspondiente polipéptido expresado. El polipéptido puede detectarse y cuantificarse mediante cualquiera de los diversos medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos pueden incluir métodos bioquímicos analíticos tales como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, y similares, o diversos métodos inmunológicos tales como reacciones de precipitina en líquido o gel, inmunodifusión (sencilla o doble), inmunolectroforesis, radioinmunoanálisis (RIA), análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), análisis de inmunofluorescencia y transferencia Western.

En una realización, el nivel de biomarcador de degradación del cartílago o de sinovitis se puede determinar usando un inmunoanálisis. El uso de anticuerpos dirigidos a los biomarcadores descritos en la presente memoria puede ser utilizado para escrutar muestras biológicas humanas, p. ej., fluidos, para determinar los niveles del antígeno biomarcador específico, es decir, biomarcadores de degradación de colágeno y/o sinovitis. A modo de ilustración, se pueden tomar fluidos humanos, tales como suero sanguíneo u orina, de un paciente y analizarlos para determinar un epítipo específico, o bien como antígeno liberado o bien unido a la membrana en las células en el fluido de muestra, utilizando anticuerpos anti-biomarcadores en RIA o ELISA convencionales, por ejemplo, conocidos en la técnica. Los anticuerpos utilizados en tales métodos son preferiblemente anticuerpos monoclonales. En una realización, la evaluación inmunoserológica *in vitro* de sueros retirados de los pacientes permiten de ese modo la determinación no invasiva de la progresión o la reducción de la degeneración del cartílago, así como un aumento o disminución de la sinovitis sobre la base de los niveles en suero de los biomarcadores correspondientes. En una realización, se lleva a cabo un inmunoanálisis para la evaluación cuantitativa de la degradación del cartílago midiendo el nivel de CTX-II en la orina humana. En una realización, se lleva a cabo un inmunoanálisis para la evaluación cuantitativa de la sinovitis midiendo los niveles de MMP-3 en suero humano.

En los inmunoanálisis, el agente para la detección de un polipéptido biomarcador de la degradación de cartílago o de sinovitis puede ser un anticuerpo capaz de unirse a la proteína del biomarcador de la degradación de cartílago o de sinovitis. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (p. ej., Fab o F(ab')₂).

En una realización, se utilizan anticuerpos dirigidos a CTX-II, incluyendo CTX-II de orina, en los inmunoanálisis, p. ej., ELISA, para determinar el nivel de CTX-II en una muestra de un paciente que tiene EA. En una realización, los niveles de CTX-II se pueden medir en muestras de orina o de suero de un paciente. En una realización, un anticuerpo que se puede utilizar en los métodos y composiciones de la invención para detectar y cuantificar CTX-II en orina humana es el anticuerpo monoclonal mAbF46 (véase Christgau et al. (2001) *Bone* 29:209) y F4601 (véase Oestergaard et al. (2006) *Osteoarthritis Cartilage*. 14 (7): 670).

En una realización, se utilizan anticuerpos dirigidos a MMP-3, incluyendo MMP-3 de suero, en los inmunoanálisis, p. ej., ELISA, para determinar el nivel de MMP-3 en una muestra de un paciente que tiene EA. En una realización, la MMP-3 puede medirse en muestras de suero del paciente. En una realización, un anticuerpo para detectar y cuantificar la MMP-3 en suero humano es el anticuerpo monoclonal mAb1B4 (Murray GI et al. *Gut* 43:791-7 (1998)).

Los análisis de unión competitiva se pueden utilizar para determinar el nivel de proteína correspondiente al biomarcador de degradación del colágeno y/o sinovitis. Un ejemplo de un análisis de unión competitivo es un análisis sándwich de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El ELISA se puede utilizar para detectar la presencia de biomarcador de degradación de colágeno y/o sinovitis en una muestra. El ELISA es un inmunoanálisis sensible que utiliza una enzima ligada a un anticuerpo o antígeno como marcador para la detección de una proteína específica, especialmente un antígeno o anticuerpo. El ELISA es un análisis en donde se detectan un antígeno o un anticuerpo unidos por medio de una enzima ligada que generalmente convierte un sustrato incoloro en un producto coloreado, o un producto que puede ser detectado. Uno de los tipos más comunes de ELISA es el "ELISA de tipo sándwich". En una realización, el nivel de biomarcador de degradación de cartílago y/o sinovitis se determina utilizando un análisis ELISA.

Además, un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de proteína/anticuerpo para su uso en la determinación de la cantidad de un marcador de la presente invención (es decir, CTX-II y/o MMP-3).

5 Los métodos para analizar CTX-II como biomarcador para la destrucción de las articulaciones son conocidos en la técnica, y son descritos, por ejemplo, por Oestergaard et al. (2006) *Osteoarthritis Cartilage*. 14(7):670 y Mouritzen et al. (2003) *Annals of Rheumatic Diseases* 62:332, incorporados como referencia a la presente memoria. Los análisis para determinar los niveles de CTX-II están disponibles en el mercado, incluyendo, por ejemplo, Urine Cartilaps[®] y Serum Cartilaps[®] (Nordic Bioscience Diagnostics). El análisis Urine Cartilaps[®] se ha utilizado en estudios clínicos para la evaluación cuantitativa de la degradación del cartílago en la artritis reumatoide y la osteoartritis. Por ejemplo, el ELISA de Urine Cartilaps[®] se basa en la unión competitiva de un anticuerpo monoclonal a fragmentos en orina de colágeno de tipo II, es decir, CTX-II o a péptidos sintéticos biotinilados unidos a la superficie de placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Inicialmente, los péptidos sintéticos, biotinilados, se unen a la superficie de pocillos recubiertos de estreptavidina de la placa de microtitulación. Después del lavado, los patrones, los controles y las muestras de orina se pipetea en los pocillos, seguido de la adición de una disolución del anticuerpo monoclonal. Los pocillos se lavan, y se añade una disolución anti-inmuglobulina de ratón conjugada con peroxidasa (de conejo) a los pocillos. Después de la segunda etapa de lavado, se añade un sustrato cromogénico a todos los pocillos y se detiene la reacción de color con ácido sulfúrico y se mide la absorbancia. Otros ejemplos referentes a cómo analizar CTX-II utilizando ELISA son describen por Christgau (2001 *Bone* 29:209).

20 En una realización, se lleva a cabo un inmunoanálisis para determinar el nivel de biomarcador de sinovitis MMP-3 en suero humano. Los métodos para analizar MMP-3 como biomarcador de sinovitis son conocidos en la técnica, y son descritos, por ejemplo, por Tamarat et al. (2003) *PNAS* 100: 8555. Además, los kits comerciales disponibles para someter a ensayo los niveles de proteína MMP-3 incluyen el sistema ELISA, Human Matrix Metalloproteinase-3 Biotrak (Amersham) (véase también Yang et al. (2004) *Arthritis y Rheumatism* 51:691). Otros ejemplos que describen cómo analizar la proteína MMP-3 son descritos por Chen et al. (2006) *Rheumatology* 45:414.

30 En una realización, se utilizan anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, en métodos tales como transferencias Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, generalmente es preferible inmovilizar el anticuerpo o las proteínas sobre un soporte sólido. Los soportes en fase sólida o portadores adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros, y magnetita.

35 Un experto en la técnica conocerá muchos otros vehículos adecuados para la unión del anticuerpo o el antígeno, y serán capaces de adaptar tal soporte para su uso en la presente invención. Por ejemplo, la proteína aislada de las células se puede ejecutar en una electroforesis en gel de poliacrilamida e inmovilizar sobre un soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte se puede lavar a continuación con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de forma detectable. El soporte de fase sólida se puede lavar después con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marca unida sobre el soporte sólido puede detectarse a continuación por medios convencionales. Los métodos para detectar proteínas usando técnicas electroforéticas son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, en general, R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y.; Deutscher, (1990) *Methods in Enzymology* vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N. Y.).

45 Otros métodos convencionales que utilizan anticuerpos para detectar y cuantificar marcadores de la degradación de colágeno y/o sinovitis incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoanálisis ("RIA"), análisis de receptores, inmunoanálisis enzimáticos ("EIA"), bioanálisis citoquímicos, análisis de ligandos, análisis inmunoradiométricos, fluoroinmunoanálisis y análisis de inmuoabsorción ligado a enzimas ("ELISA"). Otro método incluye, para facilitar la detección, y su naturaleza cuantitativa, el análisis sándwich o de doble anticuerpo, del cual existen diversas variaciones, todas las cuales se pretende que estén incluidas en la presente invención. Estos métodos son bien conocidos y los expertos en la técnica comprenderán que requieren una cantidad razonable de experimentación para optimizar la interacción entre los anticuerpos y los antígenos y la detección de los antígenos por los anticuerpos. Estas y otras técnicas de inmunoanálisis se pueden encontrar en *Principles and Practice of Immunoassay*, 2^a edición, Price y Newman, eds., MacMillan (1997) y *Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cap. 9 (1988).

60 Los anticuerpos utilizados en los inmunoanálisis conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria para determinar los niveles de los biomarcadores, se pueden marcar con una marca detectable. Se pretende que el término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, incluya el marcaje directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, conexión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos del marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcaje terminal de una sonda de ADN con biotina de manera que puede ser detectada con estreptavidina marcada fluorescentemente.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo marcado, p. ej. marcado con radiactividad, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo, o marcado con enzima. En otra realización, un derivado de anticuerpo (p. ej. un anticuerpo conjugado con un sustrato o con proteína o ligando de un par de proteína-ligando {p. ej. biotina-estreptavidina}), o un fragmento de anticuerpo (p. ej. un anticuerpo de cadena sencilla, un dominio hipervariable de un anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína biomarcadora de la degradación de cartílago o de sinovitis.

En una realización de la invención, se utilizan métodos proteómicos, p. ej., espectrometría de masas, para detectar y cuantificar el biomarcador de la degradación de cartílago o de sinovitis. Por ejemplo, se pueden utilizar la espectrometría de masas en tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) o una espectrometría de masas en tiempo de vuelo de desorción/ionización láser inducida en superficie (SELDI-TOF MS), que implica la aplicación de un muestra biológica, tal como suero, a un chip de unión a proteína (Wright, GL, Jr., et al. (2002) *Expert Rev Mol Diagn* 2:549; Li, J., et al. (2002) *Clin Chem*. 48:1296; Laronga, C., et al. (2003) *Dis Markers* 19:229; Petricoin, E.F., et al. (2002) 359:572; Adam, B.L., et al. (2002) *Cancer Res*. 62:3609; Tolson, J., et al. (2004) *Lab Invest* 84:845; Xiao, Z., et al. (2001) *Cancer Res*. 61:6029) para detectar y cuantificar los biomarcadores de degradación del cartílago o de sinovitis. Los métodos de espectrometría de masas se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.622.824, 5.605.798 y 5.547.835.

ARN

En una realización, el nivel de ARNm que codifica dicho biomarcador se puede medir usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, p. ej. análisis Northern. La expresión génica del biomarcador se puede detectar a nivel del ARN. El ARN se puede extraer de células por medio de técnicas de extracción de ARN, que incluyen, por ejemplo, extracción con fenol ácido/isotiocianato de guanidina (RNAzol B; Biogénesis), kits de preparación de ARN RNeasy (Qiagen) o PAXgene (PreAnalytix, Suiza). Los formatos de análisis típicos que utilizan la hibridación de ácido ribonucleico incluyen análisis nuclear "run-on", RT-PCR, análisis de protección de RNasa (Melton et al., *Nuc. Acids Res.* 12:7035), transferencia Northern e hibridación in situ. La expresión de los genes también se puede detectar mediante análisis de micromatrices como se describe a continuación.

Para la transferencia Northern, las muestras de ARN se separan primero mediante electroforesis por tamaño en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El ARN se transfiere a continuación a una membrana, se entrecruza y se hibrida con una sonda marcada. Se pueden utilizar sondas radiomarcadas no isotópicas o de actividad altamente específica que incluyen sondas de ADN cebadas al azar, con traslado de mella, o sondas generadas por PCR, sondas de ARN transcrito in vitro, y oligonucleótidos. Adicionalmente, se pueden usar como sondas secuencias con homología sólo parcial (por ejemplo, ADNc de una especie diferente o fragmentos de ADN genómico que podrían contener un exón).

Los Análisis de Protección de Nucleasa (que incluyen tanto análisis de protección de ribonucleasa como análisis de nucleasa S1) proporcionan un método extremadamente sensible para la detección y cuantificación de ARNm específicos. La base del APN es la hibridación en disolución de una sonda antisentido (radiomarcada o no isotópica) con una muestra de ARN. Después de la hibridación, la sonda no hibridada de cadena sencilla, y el ARN son degradados por nucleasas. Los fragmentos protegidos restantes se separan en un gel de acrilamida. Los APN permiten la detección simultánea de varias especies de ARN.

La hibridación in situ (HIS) es una herramienta potente y versátil para la localización de ARNm específicos en células o tejidos. La hibridación de la sonda tiene lugar cabo dentro de la célula o tejido. Dado que la estructura celular se mantiene durante todo el procedimiento, la HIS proporciona información acerca de la localización del ARNm en la muestra de tejido.

El procedimiento se inicia mediante la fijación de las muestras en formalina tamponada neutra, y la inclusión del tejido en parafina. A continuación las muestras se cortan en secciones finas y se montan sobre portaobjetos de microscopio. (Alternativamente, el tejido se puede seccionar congelado y fijar con posterioridad en paraformaldehído). Después de una serie de lavados para desparafinar y rehidratar las secciones, se lleva a cabo una digestión con proteinasa K para aumentar la accesibilidad de la sonda, y una sonda marcada se hibrida a continuación con las secciones de la muestra. Las sondas radiomarcadas se visualizan con la película líquida secada sobre los portaobjetos, mientras que las sondas marcadas no isotópicamente se detectan convenientemente con reactivos colorimétricos o fluorescentes. Este último método de detección es la base para la hibridación in situ fluorescente (HISF).

Los métodos de detección que se pueden emplear incluyen marcas radiactivas, marcas enzimáticas, marcas quimioluminiscentes, marcas fluorescentes y otras marcas adecuadas.

Típicamente, la RT-PCR se utiliza para amplificar dianas de ARN. En este proceso, la enzima transcriptasa inversa se utiliza para convertir el ARN en ADN complementario (ADNc) que después se puede amplificar para facilitar la detección. La RT-PCR cuantitativa relativa implica la amplificación de un control interno simultáneamente con el gen

de interés. El control interno se utiliza para normalizar las muestras. Una vez normalizadas, se pueden realizar comparaciones directas de la abundancia relativa de un ARNm específico a través de las muestras. Los controles internos comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, GAPDH, HPRT, actina y ciclofilina.

- 5 Se conocen muchos métodos de amplificación de ADN, la mayoría de los cuales se basan en una reacción en cadena enzimática (tal como una reacción en cadena de la polimerasa, una reacción en cadena de la ligasa, o una replicación de secuencia auto-sostenida) o en la replicación de todo o parte del vector en el que ha sido clonado.

Muchos métodos de amplificación de la señal y la diana (TAS) se han descrito en la literatura, por ejemplo, revisiones generales de estos métodos en Landegren, U. et al., *Science* 242:229-237 (1988) y Lewis, R., *Genetic Engineering News* 10:1, 54-55 (1990). La PCR es un método de amplificación de ácido nucleico común en la técnica y descrito entre otros en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.683.195 y 4.683.202. La PCR se puede utilizar para amplificar cualquier ácido nucleico conocido en un contexto de diagnóstico (Mok et al., 1994, *Gynaecologic Oncology* 52:247-252). La replicación de secuencias auto-sostenida (3SR) es una variación de la TAS, que implica la amplificación isotérmica de un molde de ácido nucleico mediante rondas sucesivas de actividades transcriptasa inversa (RT), polimerasa y nucleasa que están mediadas por un cóctel de enzimas y cebadores oligonucleotídicos apropiados (Guatelli et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874). La reacción de amplificación por ligación o el sistema de amplificación ligación utiliza ADN ligasa y cuatro oligonucleótidos, dos por hebra diana. Esta técnica es descrita por Wu, D.Y. y Wallace, R.B., 1989, *Genomics* 4:560. En la Técnica de la Replicasa Q.beta., se utiliza la ARN replicasa para el bacteriófago Q.beta., que replica ARN de hebra sencilla, para amplificar el ADN diana, tal como se describen Lizardi et al., 1988, *Bio/Technology* 6:1197. La PCR cuantitativa (Q-PCR) es una técnica que permite determinar cantidades relativas de transcritos dentro de una muestra.

III. Inhibidores de TNF

25 Esta descripción describe un método para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF α , p. ej., un anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA). La descripción también proporciona un método de seguimiento de la eficacia de un inhibidor de TNF α , p. ej., un anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, para la disminución de la progresión del daño estructural asociado con la espondilitis anquilosante (EA) en un paciente. La descripción incluye adicionalmente un método para predecir la eficacia de un inhibidor de TNF α , p. ej., un anticuerpo para TNF α humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de la EA en un paciente. Las composiciones y kits relacionados con los métodos descritos en la presente memoria también se contemplan como parte de la descripción.

35 En un aspecto, estos métodos incluyen la determinación de la eficacia de los anticuerpos humanos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen al TNF α humano con alta afinidad y una baja constante disociada, y tienen una alta capacidad de neutralización. Preferiblemente, los anticuerpos humanos utilizados en la presente descripción son anticuerpos anti-hTNF α humanos, neutralizadores, recombinantes. El anticuerpo neutralizador recombinante de la invención se denomina en la presente memoria D2E7, también conocido como HUMIRA[®] y adalimumab (la secuencia de aminoácidos de la región VL de D2E7 se muestra en el SEC ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la región VH de D2E7 se muestra en la SEC ID NO: 2). Las propiedades de D2E7 (adalimumab/HUMIRA[®]) han sido descritas por Salfeld et al., Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.090.382, 6.258.562, y 6.509.015.

45 Los métodos de la presente descripción también se pueden realizar usando anticuerpos anti-hTNF α murinos quiméricos y humanizados que han sido sometidos a pruebas clínicas para el tratamiento de la artritis reumatoide (véanse p. ej., 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).

50 En una realización, el método de la invención incluye la determinación de la eficacia de los anticuerpos y porciones de anticuerpos D2E7, anticuerpos y porciones de anticuerpo relacionados con D2E7, y otros anticuerpos y porciones de anticuerpos humanos con propiedades equivalentes a D2E7, tales como una alta afinidad de unión a hTNF α con una baja cinética de disociación y una alta capacidad de neutralización, para el tratamiento de la EA. En una realización, la invención proporciona el tratamiento con un anticuerpo 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 menos y una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menos, ambas determinadas mediante resonancia de plasmón superficial, y neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un análisis con L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menos. 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 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menos, o incluso más preferiblemente, con una K_{off} de $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menos. Más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un análisis con L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos y aún más preferiblemente con una CI_{50} de 1×10^{-10} M o menos. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo.

Es bien conocido en la técnica que los dominios CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a métodos de predicción de la respuesta de un paciente a un tratamiento para la EA, en donde el tratamiento comprende la administración de anticuerpos humanos que tienen una cinética de disociación lenta para la asociación con el hTNF α y que tienen dominios CDR3 de la cadena ligera y pesada que son estructuralmente idénticos a ,o están relacionados con los de D2E7. La posición 9 de la CDR3 de VL de D2E7 puede ser ocupada por Ala o Thr sin afectar sustancialmente a la K_{off} . Por consiguiente, un motivo consenso para la CDR3 de VL de D2E7 comprende la secuencia de aminoácidos: QRYNRAPY-(T/A) (SEC ID NO: 3). Adicionalmente, la posición 12 de la CDR3 de VH de D2E7 puede estar ocupada por Tyr o Asn, sin afectar sustancialmente a la K_{off} . Por consiguiente, un motivo consenso para la CDR3 de VH de D2E7 comprende la secuencia de aminoácidos: VSYLSTASSLD-(Y/N) (SEC ID NO: 4). Por otra parte, como se ha demostrado en el Ejemplo 2 de Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.382, el dominio de CDR3 de las cadenas pesada y ligera de D2E7 es susceptible de sustitución con un solo residuo de alanina (en la posición 1, 4, 5, 7 u 8 dentro de la CDR3 de VL o en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11 dentro de la CDR3 de VH) sin afectar sustancialmente a la K_{off} . Aún más, el experto en la técnica apreciará que, dada la susceptibilidad de los dominios CDR3 de VL y VH de D2E7 a sustituciones con alanina, la sustitución de los otros aminoácidos dentro de los dominios CDR3 puede ser posible mientras que se conserve la constante de la velocidad de disociación baja del anticuerpo, en particular, sustituciones con aminoácidos conservativos. Preferiblemente, se realizan no más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de los dominios CDR3 de VL y/o VH de D2E7. Más preferiblemente, se realizan no más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de los dominios CDR3 de VL y/o VH de D2E7. Adicionalmente, no se deben realizar sustituciones de aminoácidos conservativas en posiciones de aminoácidos críticas para la unión a hTNF α . Las posiciones 2 y 5 de la CDR3 de VL de D2E7 y las posiciones 1 y 7 de la CDR3 de VH de D2E7 parecen ser críticas para la interacción con el hTNF α y por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos conservativa preferiblemente no se realizan en estas posiciones (aunque es aceptable una sustitución de alanina en la posición 5 de la CDR3 de VL de D2E7, como se ha descrito anteriormente) (véase Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.382).

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona métodos para determinar la eficacia de un tratamiento para la EA que comprende la administración de un anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo contiene preferiblemente las siguientes características:

- a) se disocia del TNF α humano con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ o menos, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial;
- b) tiene un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 3, o modificada a partir del SEC ID NO: 3 por una sola sustitución de alanina en la posición 1, 4, 5, 7 o 8 o por una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas en las posiciones 1, 3, 4, 6, 7, 8 y/o 9;
- c) tiene un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o modificada a partir del SEC ID NO: 4 por una sola sustitución de alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11 o por una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y/o 12.

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 menos. 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 menos.

En otra realización más, la invención proporciona métodos para determinar la eficacia de un tratamiento para la EA que comprenden la administración de un anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo contienen preferiblemente una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 3, o modificada a partir del SEC ID NO: 3 por una sola sustitución de alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, y con una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o modificada a partir del SEC ID NO: 4 por una sola sustitución de alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11. Preferiblemente, la LCVR tiene adicionalmente un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (esto es, la CDR2 de VL de D2E7) y la HCVR tiene adicionalmente un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (es decir, la CDR2 de VH de D2E7). Incluso más preferiblemente, la LCVR tiene adicionalmente un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (es decir, la CDR1 de VL de D2E7) y la HCVR tiene un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 8 (esto es, la CDR1 de VH de D2E7). Las regiones marco para VL preferentemente son de la familia de la línea germinal humana $V_{\kappa}1$ más preferiblemente del V_{κ} de la línea germinal humana A20 y lo más preferiblemente de las secuencias marco de VL de D2E7 mostradas en las Figuras 1A y 1B de Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.382. Las regiones marco para VH preferiblemente son de la familia de la línea germinal humana de $V_{\mu}3$, más preferiblemente del gen de VH de la línea germinal humana DP-31 y lo más preferiblemente de las secuencias marco de VH de D2E7 mostradas en las Figuras 2A y 2B de la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.382.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona métodos para determinar la eficacia de un tratamiento de EA, en donde el tratamiento comprende la administración de un anticuerpo humano aislado, o porción de unión a

antígeno del mismo. El anticuerpo o porción de unión al antígeno contiene una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 (es decir, VL de D2E7) y una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos del SEC ID NO: 2 (es decir, el VH de D2E7). En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena ligera, o bien una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

En otras realizaciones más, la invención proporciona métodos para determinar la eficacia de un tratamiento para la EA, en donde el tratamiento comprende la administración de un anticuerpo humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que contiene los dominios CDR3 de VH y VL relacionados con D2E7. Por ejemplo, los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, con una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 3, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24, SEC ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 o con una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35.

En otra realización, el método de la presente descripción incluye la determinación de la eficacia de un tratamiento para la EA, en el que el tratamiento comprende la administración de un inhibidor de TNF α , incluyendo, pero no limitado a, un anticuerpo anti-TNF, o un fragmento del mismo, incluyendo infliximab (Remicade[®], Johnson and Johnson; descrito en Patente de los Estados Unidos Núm. 5.656.272), CDP571 (un anticuerpo IgG4 anti-TNF-alfa monoclonal humanizado), CDP 870 (un fragmento de anticuerpo anti-TNF-alfa monoclonal humanizado), un dAb anti-TNF (Peptech), CNTO 148 (golimumab; Medarex y Centocor, véase el documento WO 02/12502), y adalimumab (Humira[®] Abbott Laboratories, mAb un anti-TNF humano, descrito en el documento US 6.090.382 como D2E7 y empleado por la presente invención). Otros ejemplos incluyen etanercept (descrito en el documento WO 91/03553 y WO 09/406476), receptor de TNF soluble de Tipo I, un receptor de TNF de Tipo I soluble pegilado (PEGs TNF-R1), o p55TNFR1gG (Lenercept). En otra realización, el inhibidor de TNF α es una proteína de unión a TNF recombinante (r-TBP-I) (Serono).

El anticuerpo para TNF α utilizado en los métodos y composiciones de la presente descripción y la presente invención puede ser modificado para mejorar el tratamiento de la EA. En algunas realizaciones, el anticuerpo para TNF α o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, se modifican químicamente para proporcionar un efecto deseado. Por ejemplo, la pegilación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente descripción y la presente invención se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las siguientes referencias: Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992); documento EP 0 154 316; y EP 0 401 384.

Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Un polímero soluble en agua preferido para la pegilación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente descripción y la presente invención es el polietilenglicol (PEG). Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que "polietilenglicol" abarque cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como mono (Cl-CIO) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol.

Los métodos para preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados de la presente descripción y la presente invención comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con polietilenglicol, tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, bajo condiciones que permitan que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se adhiera a uno o más grupos PEG, y (b) obtener los productos de reacción. Será evidente para un experto normal en la técnica seleccionar las condiciones de reacción óptimas o las reacciones de acilación basadas en parámetros conocidos y en el resultado deseado.

Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilado se pueden utilizar generalmente para tratar la EA mediante la administración de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos para TNF α descritos en la presente memoria. En general, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados han aumentado de la vida media, en comparación con los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos no pegilados. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados se pueden emplear solos, juntos, o combinándolos con otras composiciones farmacéuticas.

En otra realización más de la presente descripción y la presente invención, se pueden alterar los anticuerpos o fragmentos de los mismos para TNF α , en donde la región constante del anticuerpo se modifica para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo no modificado.

Para modificar un anticuerpo de la presente descripción y la presente invención de tal manera que exhiba una reducción de la unión al receptor de Fc, el segmento de región constante de la inmunoglobulina del anticuerpo se puede mutar en las regiones concretas necesarias para las interacciones del receptor de Fc (FcR) (véanse p. ej. Canfield, S.M. y S.L. Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483-1491; y Lund, J. et al. (1991) *J. of Immunol.* 147:2657-2662). La reducción de la capacidad de unión a FcR del anticuerpo puede reducir también otras funciones efectoras que se basan en las interacciones de FcR, tales como la opsonización y la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de antígenos.

Un anticuerpo o porción de anticuerpo utilizado en los métodos de la presente descripción y la presente invención pueden ser derivatizados o conectados a otra molécula funcional (p. ej., otro péptido o proteína). Por consiguiente, se pretende que los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la presente descripción y la presente invención incluyan las formas derivatizadas y modificadas de otra manera de los anticuerpos anti-hTNF α humanos descritos en la presente memoria, incluyendo moléculas de inmunoadherencia. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente descripción y la presente invención puede estar conectado funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, p. ej., para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (p. ej., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o homobifuncionales (p. ej., suberato de disuccinimidilo). Tales ligadores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Los agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente descripción y la presente invención se pueden derivatizar incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes fluorescentes detectables ilustrativos incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede ser derivatizado con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, ésta se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede ser derivatizado con biotina, y detectarse a través de medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, utilizado en los métodos o composiciones de la presente descripción y la presente invención se pueden preparar mediante la expresión recombinante de genes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula anfitriona. Para expresar un anticuerpo recombinantemente, una célula anfitriona se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de tal manera que las cadenas ligeras y pesadas se expresan en la célula anfitriona y, preferiblemente, se secretan al medio en el que se cultivan las células anfitrionas, de cuyo medio se pueden recuperar os anticuerpos. Las metodologías de ADN recombinante convencionales se utilizan para obtener genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo, incorporar estos genes a vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células anfitrionas, tales como los descritos por Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1989), Ausubel, FM et al. (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.397 de Boss et al.

Para expresar D2E7 o un anticuerpo relacionado con D2E7, primero se obtienen fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Estos ADN pueden obtenerse mediante amplificación y modificación de secuencias variables de la cadena ligera y pesada de la línea germinal y usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas son conocidas en la técnica (véase p. ej., la base de datos de secuencia de la línea germinal humana "Vbase", véanse también Kabat, EA, et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH Núm. 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 que codifica la región variable de la cadena pesada de D2E7, o un anticuerpo relacionado con D2E7, un miembro de la familia V_{H3} de genes de VH de línea germinal humana se amplifica mediante PCR convencional. Lo más preferiblemente, se amplifica la secuencia de línea germinal de VH DP-31. Para obtener un fragmento de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de D2E7, o un anticuerpo relacionado con D2E7, un miembro de la familia V_{K1} de genes de VL de la línea germinal humana se amplifica

mediante PCR convencional. Lo más preferiblemente, se amplifica la secuencia de la línea germinal de VL A20. Los cebadores de PCR adecuados para su uso en la amplificación de las secuencias línea germinal de VH DP-31 y de la línea germinal de VL A20 se pueden diseñar sobre la base de las secuencias de nucleótidos descritas en las referencias citadas más arriba, utilizando métodos convencionales.

5 Una vez que se obtienen los fragmentos VH y VL de la línea germinal, estas secuencias pueden mutarse para que codifiquen las secuencias de aminoácidos de D2E7 o secuencias relacionadas con D2E7 descritas en la presente memoria. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ADN de la línea germinal de VH y VL se comparan primero con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de D2E7 o relacionadas con D2E7 para identificar los residuos de aminoácidos en la secuencia de D2E7 o relacionada con D2E7 que difieren de la línea germinal. A continuación, los nucleótidos apropiados de las secuencias de ADN de línea germinal se mutan de tal manera que la secuencia de la línea germinal mutada codifica la secuencia de aminoácidos de D2E7 o relacionada con D2E7, usando el código genético para determinar qué cambios de nucleótidos se deben hacer. La mutagénesis de las secuencias de la línea germinal se lleva a cabo mediante métodos convencionales, tales como la mutagénesis mediada por PCR (en la que los nucleótidos mutados se incorporan a los cebadores de PCR de manera que el producto de PCR contiene las mutaciones) o mutagénesis dirigida al sitio.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de VH y VL de D2E7 o relacionados con D2E7 (mediante amplificación y mutagénesis de la línea germinal de genes de VH y VL, tal como se ha descrito anteriormente), estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena de anticuerpo completos, en genes de fragmentos Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se conecta operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. Se pretende que el término "conectado operativamente", según se utiliza en este contexto, signifique que los dos fragmentos de ADN se unen de tal forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de la cadena pesada completo conectando operativamente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase p. ej., Kabat, EA, et al. (1991) *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH Núm. 91-3242) y los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para obtener un fragmento del gen de la cadena pesada de Fab, el ADN que codifica VH se puede conectar operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de la cadena ligera completo (así como un gen de cadena ligera de Fab) conectando operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidos en la técnica (véase p. ej., Kabat, EA, et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH Núm. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación mediante PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero los más preferiblemente es una región constante kappa.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican VL y VH se conectan operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que la secuencias de VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH enlazadas por el conector flexible (véanse p. ej., 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 anticuerpos utilizados en la presente descripción y la presente invención, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada parciales o completas, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se insertan en vectores de expresión de manera que los genes están conectados operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que el término "conectado operativamente" signifique que un gen de anticuerpo se ligue a un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven a su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por medio de métodos convencionales (p. ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción

de las secuencias de la cadena pesada y ligera de D2E7 o relacionadas con D2E7, el vector de expresión puede portar ya secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para la conversión de las secuencias de VH y VL de D2E7 o relacionadas con D2E7 en genes de anticuerpos completos es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena pesada y constante de la cadena ligera, respectivamente, de tal manera que el segmento VH se conecta operativamente al segmento o a los segmentos CH dentro del vector y el segmento VL se conecta operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula anfitriona. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera 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 no inmunoglobulina).

Además de los genes de las cadenas de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas de anticuerpo en una célula anfitriona. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de las cadenas de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, por 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 las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se vaya a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células anfitrionas de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véanse p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.168.062 de Stinski, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.510.245 de Bell et al. y la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.968.615 de Schaffner et al.

Además de los genes de las cadenas del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes utilizados en la presente descripción y la presente invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas en las que se ha introducido el vector (véase p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 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, en una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células anfitrionas con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfecta a una célula anfitriona mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procariota o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la presente descripción y la presente invención en células anfitrionas procarióticas o eucarióticas, lo más preferido es la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y lo más preferiblemente en células anfitrionas de mamífero, puesto que es más probable que tales células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, ensamblen y secreten un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo que las células procarióticas. Se ha informado de que la expresión procariótica de genes de anticuerpos no es eficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, MA y Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Las células anfitrionas de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la presente descripción y la presente invención incluyen Células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, p. ej., como describen R.J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células anfitrionas. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas.

Las células anfitrionas también se pueden usar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas de scFv. Se entiende que las variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente descripción y la presente invención.

Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula anfitriona con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para eliminar algo o la totalidad del ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a hTNF α . Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la presente descripción y la presente invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de hTNF α mediante entrecruzamiento de un anticuerpo de la presente descripción y la presente invención con un segundo anticuerpo por medio de métodos convencionales de entrecruzamiento químico.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente descripción y la presente invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada por fosfato calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera el anticuerpo son conectados cada uno operativamente a elementos reguladores potenciadores de CMV/promotores de AdMLP para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando la selección/amplificación de metotrexato. Las células anfitrionas transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Las técnicas convencionales de biología molecular se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células anfitrionas, seleccionar los transformantes, cultivar las células anfitrionas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

Los anticuerpos humanos recombinantes de la presente descripción y la presente invención, además de D2E7 o una porción de unión a antígeno del mismo, o anticuerpos relacionados con D2E7 descritos en la presente memoria pueden aislarse escrutando una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante, preferiblemente una biblioteca de presentación en fagos de scFv, preparada utilizando los ADNc de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y escrutar dichas bibliotecas son conocidas en la técnica. Además de los kits disponibles en el mercado para generar bibliotecas de presentación en fagos (p. ej., *Recombinant Phage Antibody System* de Pharmacia, Núm. de catálogo 27-9400-01, y el kit de presentación en fagos *SurfZAPTM* de Stratagene, el Núm. de catálogo 240612), los ejemplos de los métodos y reactivos particularmente aptos para su uso en la generación y selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos se pueden encontrar, por ejemplo, en Ladner et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; Kang et al. Publicación PCT Núm. WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT Núm. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT Núm. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT Núm. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT Núm. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT Núm. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT Núm. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-65; 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) *PNEA* 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) *PNEA* 88:7978-7982.

En una realización preferida, para aislar anticuerpos humanos con alta afinidad y una baja constante de la velocidad de disociación para hTNF α , se utilizó por primera vez un anticuerpo anti-hTNF α murino que tenía alta afinidad y una baja constante de la velocidad de disociación hTNF α (p. ej., MAK 195, el hibridoma para el que tiene el número de depósito ECACC 87 050801) para seleccionar secuencias de la cadena pesada y ligera humanas que tienen actividad de unión similar hacia hTNF α , utilizando los métodos de huella de epítipo descritos por Hoogenboom et al., Publicación PCT Núm. WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos utilizadas en este método son preferiblemente bibliotecas de scFv preparadas y escrutadas como describen McCafferty et al., Publicación PCT Núm. WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; y Griffiths et al., (1993) *EMBO J* 12:725-734. Las bibliotecas de anticuerpos scFv preferiblemente se seleccionan utilizando TNF α humano recombinante como antígeno.

Una vez que se seleccionan los segmentos iniciales de VL y VH humanos, se realizan los experimentos de "mezcla y combinación", en los que se escrutan los diferentes pares de segmentos de VL y VH seleccionados inicialmente para detectar la unión a hTNF α , para seleccionar las combinaciones de pares VL/VH preferidos. Además, para mejorar adicionalmente la afinidad y/o disminuir la constante de la velocidad de disociación para la unión a hTNF α , los segmentos de de VL y VH del par o los pares de VL/VH preferidos pueden mutarse aleatoriamente, preferiblemente dentro de la región CDR3 de VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración de la afinidad *in vitro* puede llevarse a cabo mediante la amplificación de las regiones VH y VL usando cebadores de PCR complementarios a la CDR3 de VH o la CDR3 de VL, respectivamente, cuyos cebadores han sido "enriquecidos" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones de tal manera que los productos de PCR resultantes codifican segmentos de VH y VL en los que se han introducido mutaciones al azar en las regiones CDR3 de VH y/o VL. Estos segmentos de VH y VL mutados al azar pueden volverse a escrutar

para determinar la unión a hTNF α y se pueden seleccionar las secuencias que presentan una alta afinidad y una baja velocidad de disociación para la unión a hTNF α .

Después de la detección y el aislamiento de un anticuerpo anti-hTNF α de la presente descripción y la presente invención a partir de una biblioteca de presentación de inmunoglobulinas recombinantes, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado se puede recuperar del paquete de visualización (p. ej., a partir del genoma del fago) y subclonar en otros vectores de expresión mediante técnicas de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico se puede manipular adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la presente descripción y la presente invención (p. ej., conectado a dominios de inmunoglobulina adicionales que codifican ácidos nucleicos, tales como regiones constantes adicionales). Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante escrutinio de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula anfitriona de mamífero, como se ha descrito en más detalle en lo anterior.

Los métodos de aislar anticuerpos humanos con alta afinidad y una baja constante de la velocidad de disociación para hTNF α también se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.090.382, 6.258.562, y 6.509.015.

IV. Espondiloartropatías

El TNF α ha sido implicado en la fisiopatología de una amplia variedad de trastornos, incluyendo enfermedades inflamatorias tales como las espondiloartropatías (véase p. ej., Moeller et al. (1990) *Cytokine* 2:162; Patente de los Estados Unidos Núm. 5,231,024; Publicación de Patente Europea Núm. 260 610).

Según se utiliza en la presente memoria, el término "espondiloartropatía" o "espondiloartropatías" se utiliza para referirse a cualquiera de varias enfermedades que afectan a las articulaciones de la columna vertebral, en donde tales enfermedades comparten características clínicas, radiológicas, e histológicas comunes. Varias de las espondiloartropatías comparten características genéticas, es decir, están asociados con el alelo HLA-B27. En una realización, el término espondiloartropatía se utiliza para referirse a cualquiera de varias enfermedades que afectan a las articulaciones de la columna, excluyendo la espondilitis anquilosante, en donde tales enfermedades comparten características clínicas, radiológicas, e histológicas comunes. Los ejemplos de las espondiloartropatías incluyen espondilitis anquilosante, artritis psoriásica/espondilitis, artritis enteropática, artritis reactiva o síndrome de Reiter, y espondiloartropatías indiferenciadas. Los ejemplos de los modelos animales utilizados para estudiar las espondiloartropatías son ratones transgénicos *ank/ank*, ratas transgénicas HLA-B27 (véase Taurog et al. (1998) *The Spondylarthritides*. Oxford: Oxford University Press).

Los métodos de la presente descripción también se puede utilizar para tratar a pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar una espondiloartropatía. Los ejemplos de sujetos que están en riesgo de tener espondiloartropatías incluyen los seres humanos que sufren de artritis. Las espondiloartropatías pueden estar asociadas con otras formas de artritis, incluyendo la artritis reumatoide. En una realización de la presente descripción, los niveles de biomarcadores de la degradación del cartílago y/o biomarcadores sinovitis de un paciente que tiene una espondiloartropatía o está en riesgo de desarrollar una espondiloartropatía, se determinan y se utilizan para evaluar si el paciente está en riesgo de desarrollar una espondiloartropatía. Los ejemplos de espondiloartropatías que pueden ser tratadas con un anticuerpo para TNF α , y, por consiguiente, examinadas usando los métodos descritos en la presente memoria, se describen más abajo:

1. Espondilitis anquilosante (EA)

El factor de necrosis tumoral se ha implicado en la fisiopatología de la espondilitis anquilosante (EA) (véase Verjans et al. (1991) *Arthritis Rheum.* 34:486; Verjans et al. (1994) *Clin Exp Immunol.* 97:45; Kaijzel et al. (1999) *Immunol Hum.* 60:140). La EA es un trastorno inflamatorio que implica la inflamación de una o más vértebras. La EA es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al esqueleto axial y/o las articulaciones periféricas, incluyendo las articulaciones entre las vértebras de la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas y las articulaciones entre la columna vertebral y la pelvis. La EA puede causar eventualmente que las vértebras afectadas se fusionen o crezcan juntas. Las espondiloartropatías, incluyendo la EA, pueden estar asociadas con la artritis psoriásica (APs) y/o la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluyendo la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Las manifestaciones tempranas de la EA se pueden determinar mediante pruebas radiológicas, incluyendo tomografías computarizadas y resonancias magnéticas. Las manifestaciones tempranas de la EA a menudo incluyen sacroileitis y cambios en las articulaciones sacroilíacas como lo demuestra mediante la difuminación de los márgenes corticales del hueso subcondral, seguido por erosiones y esclerosis. La fatiga también se ha señalado como un síntoma común de EA (Duffy et al. (2002) *ACR 66^a Annual Scientific Meeting Abstract*). En consecuencia, los métodos de la presente descripción y la presente invención se pueden utilizar para proporcionar un mejor tratamiento de la EA al proporcionar un método para determinar la eficacia de un tratamiento que comprende la administración de un inhibidor de TNF.

En una realización, el método de la invención se utiliza para determinar la eficacia de la administración de un inhibidor de TNF para el tratamiento de una espondiloartropatía, incluyendo EA, asociada con EII.

5 A menudo la EA se trata con medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), tales como la aspirina o la indometacina. En consecuencia, los métodos de la invención se pueden utilizar en la presente descripción y la presente invención se puede utilizar para determinar la eficacia de un tratamiento que comprende un anticuerpo para TNF α administrado combinado con agentes usados comúnmente para reducir la inflamación y el dolor asociado comúnmente con la espondilitis anquilosante.

10 2. Artritis psoriásica

El factor de necrosis tumoral se ha implicado en la fisiopatología de la artritis psoriásica (APs) (Partsch et al. (1998) Ann Rheum Dis. 57:691; Ritchlin et al. (1998) J Rheumatol. 25:1544). Según se refiere en la presente memoria, la artritis psoriásica o la psoriasis asociada con la piel, hacen referencia a la artritis inflamatoria crónica que está asociada con la psoriasis, que es una afección crónica de la piel común que causa manchas rojas en el cuerpo. Aproximadamente 1 de cada 20 individuos con psoriasis desarrolla artritis junto con la afección de la piel, y en aproximadamente 75% de los casos, la psoriasis precede a la artritis. La APs se exhibe en una variedad de formas, que van de artritis leve a severa, en donde la artritis afecta generalmente a los dedos y la columna vertebral. Cuando la columna vertebral se ve afectada, los síntomas son similares a los de la espondilitis anquilosante, como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, la eficacia de un anticuerpo para TNF α , o fragmento de unión antígeno del mismo, para el tratamiento de la APs se puede determinar utilizando el método y las composiciones de la presente descripción.

La APs se asocia a veces con la artritis mutilante. La artritis mutilante hace referencia a un trastorno que se caracteriza por la erosión ósea excesiva que da como resultado una gran deformidad erosiva que mutila la articulación. En una realización, la eficacia de un anticuerpo para TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de la artritis mutilante se puede determinar utilizando el método y las composiciones de la presente descripción.

30 3. Artritis reactiva/Síndrome de Reiter

El factor de necrosis tumoral se ha implicado en la fisiopatología de la artritis reactiva, la cual también se conoce como síndrome de Reiter (Braun et al. (1999) Arthritis Rheum. 42(10): 2039). La artritis reactiva (ARe) se refiere a la artritis que complica una infección en otra parte del cuerpo, a menudo después de infecciones entéricas o urogenitales. La ARe se caracteriza a menudo por ciertos síntomas clínicos, incluyendo la inflamación de las articulaciones (artritis), uretritis, conjuntivitis y lesiones de la piel y las membranas mucosas. Además, la ARe puede producirse después de una infección con una enfermedad de transmisión sexual o infección disintérica, incluyendo clamidia, campilobacter, salmonela o yersinia. En una realización, la eficacia de un anticuerpo para TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de la ARe se puede determinar utilizando el método y las composiciones de la presente descripción.

4. Espondiloartropatías indiferenciadas

En una realización, los anticuerpos obtenidos mediante los métodos de la presente descripción se usan para tratar sujetos que sufren de espondiloartropatías indiferenciadas (véase Zeidler et al. (1992) Am Rheum Dis Clin North Am. 18:187). Otros términos utilizados para describir las espondiloartropatías indiferenciadas incluyen oligoartritis seronegativa y oligoartritis indiferenciada. Las espondiloartropatías indiferenciadas, según se utiliza en la presente memoria, se refieren a un trastorno en el que el sujeto muestra sólo algunos de los síntomas asociados con una espondiloartropatía. Esta afección por lo general se observa en los adultos jóvenes que no tienen EII, psoriasis, o los síntomas clásicos de la EA o del síndrome de Reiter. En algunos casos, las espondiloartropatías indiferenciadas pueden ser una indicación temprana de EA. En una realización, la eficacia de un anticuerpo para TNF α , o fragmento de unión a antígeno del mismo, para el tratamiento de las espondiloartropatías indiferenciadas se puede determinar utilizando el método y las composiciones de la presente descripción.

55 V. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

A. Composiciones y Administración

Los anticuerpos, porciones de anticuerpos, y otros inhibidores de TNF α para su uso en los métodos de la presente descripción y la presente invención, se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF α de la presente descripción y la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles.

Los ejemplos de los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender
5 adicionalmente cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF.

Las composiciones para uso en los métodos de la presente descripción y la presente invención pueden estar en una
10 variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles,
15 tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos u otros inhibidores de TNF α . El modo preferido de administración es parenteral (p. ej., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo u otro inhibidor de TNF α se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo u otro inhibidor de TNF α se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y
20 almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados
25 anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una
30 solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ocasionarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios. En ciertas realizaciones, un
35 anticuerpo o porción de anticuerpo para su uso en los métodos de la presente descripción y la presente invención se formulan simultáneamente y/o se administran simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo un inhibidor o antagonista de EA. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-hTNF α de la
40 presente descripción y la presente invención se puede formular simultáneamente y/o administrar simultáneamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos asociados con los trastornos relacionados con el TNF α (p. ej., 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 p. ej., la Publicación PCT Núm. WO 94/06476) y/o uno o más
45 agentes químicos que inhiben la producción o la actividad de hTNF α (tales como derivados de ciclohexan-ilideno como se describe en Publicación PCT Núm. WO 93/19751) o cualquiera de sus combinaciones. Además, uno o más anticuerpos de la presente descripción y la presente invención se pueden usar combinados con dos o más de los
50 agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así los posibles efectos secundarios, complicaciones o bajo nivel de respuesta por parte del paciente, asociados a las diversas monoterapias.

En un aspecto, la presente descripción incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz
de un inhibidor de TNF α y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la cantidad eficaz del inhibidor de
TNF α puede ser eficaz para el tratamiento de la EA. En una realización, el anticuerpo o porción de anticuerpo para
su uso en los métodos de la invención se incorpora a una formulación farmacéutica como se describe en los
55 documentos US 8.216.583 y US 2004/0033228 A1. Esta formulación incluye una concentración de 50 mg/ml del anticuerpo D2E7, en donde una jeringa precargada contiene 40 mg de anticuerpo para la inyección subcutánea. En otra realización, la formulación de la presente descripción y empleada en los métodos de la presente invención incluye D2E7.

Los anticuerpos, porciones de anticuerpo, y otros inhibidores de TNF de la presente descripción y para su uso en los
60 métodos de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo preferido de administración es mediante inyección subcutánea. En otra realización, la administración es mediante inyección intravenosa o infusión. Como apreciará por el experto en la técnica, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados
65 deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protegerá el

compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Robinson, ed., Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Los anticuerpos para TNF α utilizados en la presente descripción y la presente invención también se pueden administrar en forma de formulaciones de cristales de proteínas que incluyen una combinación de cristales de proteínas encapsulados dentro de un portador polimérico para formar partículas recubiertas. Las partículas recubiertas de la formulación de cristales de proteína pueden tener una morfología esférica y ser microesferas de hasta 500 micrómetros de diámetro o pueden tener alguna otra morfología y ser micropartículas. La mayor concentración de cristales de proteínas permite que el anticuerpo de la invención sea liberado por vía subcutánea. En una realización, los anticuerpos para TNF α de la presente descripción y la presente invención son liberados a través de un sistema de administración de proteínas, en donde uno o más de una formulación o composición de cristal de proteína, se administra a un sujeto con un trastorno relacionado con TNF α . Las composiciones y métodos de preparación de formulaciones estabilizadas de cristales de anticuerpos completos o de cristales de fragmentos de anticuerpos también se describen en el documento WO 02/072636.

En un aspecto de la presente descripción, una formulación que comprende los fragmentos de anticuerpos cristalizados descritos en los documentos US 8.216.583 y US 2004/0033228 A1 se utilizan para tratar la artritis reumatoide.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF α de la presente descripción y para su uso en los métodos de la presente invención se pueden administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede incluirse en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, a los compuestos se les pueden incorporar excipientes y se pueden utilizar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la presente descripción y para su uso en los métodos de la presente invención mediante administración distinta de parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o administrar simultáneamente el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF α puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo, porción de anticuerpo, otro inhibidor de TNF α para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF α son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej. 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 la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria según se utiliza en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico concreto que se quiera conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de una sola dosis para el tratamiento de un trastorno relacionado con TNF α , que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una sola dosis de un inhibidor de TNF α , tal como un anticuerpo humano. En un aspecto, el inhibidor de TNF α es el anticuerpo D2E7 anti-TNF α . La dosis única del inhibidor de TNF α puede ser cualquier cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz. En un aspecto, a un sujeto se le administra una única dosis de 20 mg, 40 mg, 80 mg de D2E7. La dosis única puede administrarse por medio de cualquier ruta, incluyendo, por ejemplo, la administración subcutánea. Se pueden utilizar

regímenes de dosificación bisemanales para tratar trastornos en los que la actividad de TNF α es perjudicial, y se describen con más detalle en el documento US 2003/0235581 A1. También se pueden utilizar múltiples métodos de tratamiento o prevención de dosis variables para tratar trastornos en los que la actividad de TNF α es perjudicial, y se describen con más detalle en el documento WO 05/110452.

Se debe observar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse 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, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son meramente ilustrativos.

La presente descripción también se refiere a composiciones o kits farmacéuticos envasados para la administración de los anticuerpos anti-TNF para el tratamiento de la EA. En un aspecto de la presente descripción, el kit comprende un inhibidor de TNF α , tal como un anticuerpo, una segunda composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico adicional, y las instrucciones de administración para el tratamiento de la EA. Las instrucciones pueden describir cómo, p. ej., por vía subcutánea, y cuando, p. ej., en la semana 0 y la semana 2, se deben administrar las diferentes dosis de inhibidor de TNF α y/o el agente terapéutico adicional a un sujeto para su tratamiento.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a kits que contienen una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TNF α y un portador farmacéuticamente aceptable y una o más composiciones farmacéuticas que comprenden cada una un fármaco útil para el tratamiento de un trastorno relacionado con el TNF α y un portador farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el kit comprende una sola composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TNF α , uno o más fármacos útiles para el tratamiento de un trastorno relacionado con el TNF α y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los kits contienen instrucciones para la dosificación de las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un trastorno relacionado con el TNF α . En una realización, el kit contiene instrucciones sobre cómo determinar la eficacia del inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA. El kit puede incluir cualquiera de los siguientes para realizar los métodos de la invención: un agente detectable que reconoce específicamente CTX-II y/o CTX-II y MMP-3; instrucciones de uso, y los reactivos para el aislamiento de una muestra del paciente.

El paquete o kit, alternativamente, pueden contener el inhibidor de TNF α y pueden ser promovido para su uso, ya sea dentro del paquete o a través de la información adjunta, para los usos o el tratamiento de los trastornos descritos en la presente memoria. Los productos farmacéuticos envasados o kits pueden incluir además un segundo agente (como se describe en la presente memoria) envasados con o presentados conjuntamente con instrucciones para usar el segundo agente con un primer agente (como se describe en la presente memoria).

B. Agentes terapéuticos adicionales

La presente descripción se refiere a la determinación de la eficacia de un inhibidor de TNF para el tratamiento de la EA, solo o combinado con un agente terapéutico adicional. La combinación de agentes utilizados en los métodos y composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico terapéutico sobre la afección o afecciones o la enfermedad o enfermedades elegidas como diana para el tratamiento. La combinación de agentes utilizados en los métodos o composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también puede reducir un efecto perjudicial asociado con al menos uno de los agentes cuando se administra solo o sin el otro o los otros agentes de la composición farmacéutica concreta. Por ejemplo, la toxicidad de los efectos secundarios de un agente puede ser atenuada por otro agente de la composición, permitiendo así una dosis más alta, lo que mejora la aceptación del paciente, y mejora el resultado terapéutico. Los efectos aditivos o sinérgicos, beneficios y ventajas de las composiciones se aplican a las clases de agentes terapéuticos, ya sean clases estructurales o funcionales, o a los propios compuestos individuales.

También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se formula simultáneamente y/o se administra simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de un trastorno relacionado con el TNF α . Por ejemplo, un anticuerpo anti-hTNF α , porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF α de la invención se pueden formular simultáneamente y/o administrar simultáneamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (p. ej., 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 p. ej., la Publicación PCT Núm. WO 94/06476) y/o uno o más agentes químicos que inhiben la producción o la actividad de hTNF α (tales como derivados de ciclohexan-ilideno como se describe en Publicación PCT Núm. WO 93/19751). Además, uno o más anticuerpos u otros inhibidores de TNF α de la presente descripción se pueden utilizar combinados con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos con los que se pueden combinar un anticuerpo, porción de anticuerpo, u otro inhibidor de TNF α en un método de tratamiento, y evaluar para determinar la eficacia de acuerdo con los métodos de la invención incluyen los siguientes: fármaco o fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE); fármaco o fármacos anti-inflamatorios supresores de citoquinas (CSAID); CDP-571BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kd TNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de 75 kd; Immunex; véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1994) vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) vol. 44, 235A); 55 kdTNF-IgG (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de 55 kd; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado inagotable; IDEC/SmithKline; véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1995) vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión de IL-2; Seragen; véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1993) vol. 36, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2Ra humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citoquina antiinflamatoria; DNAX/Schering); agonistas de IL-4; IL-10 y/o IL-4 (p. ej. anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret[®]/Amgen), TNF-bp/s-TNF (proteína de unión a TNF soluble, véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S284; *Amer. J. Physiol.* - El corazón y el aparato circulatorio Fisiología (1995) vol. 268, págs. 37-42); R973401 (inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo IV; véase p. ej., *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S282), MK-966 (inhibidor de COX-2, véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S81); Iloprost (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S82); Metotrexato; talidomida (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S282) y fármacos relacionados con la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida (antiinflamatorio e inhibidor de citoquina, véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S131; *Inflammation Research* (1996) vol. 45, págs. 103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación del plasminógeno; véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S284), T-614 (inhibidor de citoquina, véase p. ej., *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S282); Prostaglandina E1 (véase p. ej., *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S282); Tenidap (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S280); Naproxeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; véase p. ej., *Neuro Report* (1996) vol. 7, págs. 1209-1213); Meloxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Ibuprofeno (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Piroxicam (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); Diclofenaco (fármaco antiinflamatorio no esteroideo); indometacina (no fármaco anti-inflamatorio esteroideo); Sulfasalazina (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S281); Azatioprina (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S281); Inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima convertidora de interleucina-1 β enzima); zap-70 y/o inhibidor de Ick (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o 1ck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o receptor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares; inhibidores de la angiogénesis); fármacos anti-inflamatorios corticosteroides (por ejemplo, SB203580), inhibidores de TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; interleucina-11; (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S296), interleucina-13 (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S308); Inhibidores de la interleucina-17 (véase p. ej. *Arthritis & Rheumatism* (1996) vol. 39, Núm. 9 (suplemento), S120); oro; penicilamina; cloroquina; hidroxicloroquina; clorambucilo; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación linfóide total; globulina anti-timocito; anticuerpos anti-CD4; CD5-toxinas, péptidos administrados por vía oral y colágeno; lobenzarit disódico; agentes reguladores de citoquinas (ACC) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.), oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor soluble de tipo 1 del complemento (TP10, T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; glucosaminoglicano polisulfato; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de pescado y semillas de plantas; ver p. ej., DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileuton; azaribina, ácido micofenólico (RS-61443), tacrólimo (FK-506), sirólímico (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; antivirales; y agentes moduladores inmunitarios. Cualquiera de los agentes anteriormente mencionados pueden administrarse combinados con el anticuerpo para TNF α de la presente descripción para el tratamiento de un trastorno relacionado con TNF α utilizando los métodos de tratamiento de dosis variables múltiples o de dosis única.

En una realización, la presente descripción incluye un artículo de manufactura o un método de tratamiento para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF en combinación con uno de los siguientes agentes para el tratamiento de un trastorno relacionado con TNF α en el que la actividad de TNF α es perjudicial: anticuerpo anti-IL12 (ABT 874), anticuerpo anti-IL18 (ABT 325); inhibidor de molécula pequeña de LCK; inhibidor de molécula pequeña de COT; anticuerpo anti-IL-1; inhibidor de molécula pequeña de MK2; anticuerpo anti-CD19; inhibidor de molécula pequeña de CXCR3; inhibidor de molécula pequeña de CCR5; inhibidor de molécula pequeña de CCR11; anticuerpo anti-selectina E/L; inhibidor de molécula pequeña de P2X7; inhibidor de molécula pequeña de IRAK-4; agonista de molécula pequeña del receptor de glucocorticoides; anticuerpo anti-receptor de C5a; inhibidor de molécula pequeña del receptor de C5a; anticuerpo anti-CD32; y CD32 como proteína terapéutica.

En otra realización más, la presente descripción incluye un artículo de manufactura o un método de tratamiento para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF combinado con un agente antibiótico o antiinfeccioso. Los agentes antiinfecciosos incluyen aquellos agentes conocidos en la técnica para el tratamiento de infecciones virales, fúngicas, parasitarias o bacterianas. El término, "antibiótico", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a

una sustancia química que inhibe el crecimiento de, o destruye, microorganismos. Abarcados por este término están un antibiótico producido por un microorganismo, así como los antibióticos sintéticos (por ejemplo, análogos) conocidos en la técnica. Los antibióticos incluyen, pero no se limitan a, claritromicina (Biaxin[®]), Ciprofloxacina (Cipro[®]), y metronidazol (Flagyl[®]).

En otra realización, la presente descripción incluye un artículo de manufactura o un método de tratamiento para determinar la eficacia de un inhibidor de TNF en combinación con un fármaco usado para tratar la enfermedad de Crohn o un trastorno relacionado con Crohn. Los ejemplos de los agentes terapéuticos que pueden ser utilizados para tratar la enfermedad de Crohn incluyen mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, budesonida, sulfasalazina, succinato sódico de metilprednisolona, difenoxilato/sulfato de atropina, hidrocloruro de loperamida, metotrexato, omeprazol, ácido fólico, ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, hidrocloruro de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, ácido timerosal/bórico, sulfato de hiosciamina, colestiramina/sacarosa, hidrocloruro de ciprofloxacina, hidrocloruro de meperidina, hidrocloruro de midazolam, oxicodona HCl/acetaminofeno, hidrocortisona, hidrocortisona, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, polycarbófilo, napsilato de propoxifeno, hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, colesevelam HCl, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, natalizumab, metilprednisolona, interferón-gamma, y sargramostim (GM-CSF). En una realización, el metotrexato se administra para el tratamiento de la enfermedad de Crohn en una dosis de 2,5 mg a 30 mg por semana.

El anticuerpo para TNF α puede ser administrado combinado con corticosteroides tópicos, análogos de vitamina D y retinoides tópicos u orales, o combinaciones de los mismos, para el tratamiento de la psoriasis. Además, el anticuerpo para TNF α puede administrarse combinado con uno de los siguientes agentes para el tratamiento de la psoriasis: inhibidores de molécula pequeña de KDR (ABT-123), inhibidor de molécula pequeña de Tie-2, calcipotrieno, propionato de clobetasol, acetónido de triamcinolona, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, diprop de betametasona aumentada, fluocinolona, triamcinolona, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, cetoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenolida, urea, betametasona, propionato de clobetasol/emol, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, fórmula hidratante, ácido fólico, desonida, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, etanercept, folato, ácido láctico, metoxsaleno, hc/bismuto subgal/ZnOx/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, protector solar, ácido salicílico, halcinonida, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de hulla, alquitrán de hulla/ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, emoliente pimecrólmo, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/na lact, aceite mineral/aceite de cacahuete, petróleo/miristato de isopropilo, psoraleno, ácido salicílico, jabón/tribromsalan, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, alefacept, efalizumab, tacrólmo, pimecrólmo, PUVA, UVB y otra fototerapia, y sulfasalazina.

En una realización, el anticuerpo para TNF α de la presente descripción y para su uso en los métodos de la presente invención se administra usando un método de dosis variables múltiples para el tratamiento de la EA combinado con uno de los agentes mencionados anteriormente para el tratamiento de un trastorno intestinal. En otra realización, los agentes adicionales anteriormente mencionados se utilizan combinados con un anticuerpo para TNF α en el método de tratamiento de una sola dosis. En otra realización más, el anticuerpo para TNF α se administra en un régimen de dosificación bisemanal.

Cualquiera de los agentes terapéuticos anteriormente mencionados, solos o combinados, se puede administrar a un sujeto que sufre de un trastorno relacionado con TNF α en el que el TNF α es perjudicial, combinado con el anticuerpo para TNF α utilizando un régimen de tratamiento de dosis múltiples variables. En una realización, cualquiera de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente, solo o combinado, se puede administrar a un sujeto que sufre de un trastorno intestinal, además de un anticuerpo para TNF α para el tratamiento de otro trastorno relacionado con TNF α , tal como la artritis reumatoide. Se debe entender que los agentes terapéuticos adicionales se pueden utilizar en terapia combinada como se ha descrito anteriormente, pero también se puede utilizar en otras indicaciones descritas en la presente memoria en el que se desea un efecto beneficioso.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo que no debe interpretarse como limitante en modo alguno.

Ejemplo

Ejemplo 1: El adalimumab suprime los biomarcadores de la degradación de cartílago y sinovitis en la espondilitis anquilosante activa (EA)

El objetivo del siguiente estudio fue analizar los biomarcadores potenciales de cartílago y de destrucción de hueso p. ej., marcadores de resorción de hueso, marcadores de degradación de cartílago, y marcadores de sinovitis, en una prueba controlada de adalimumab en el tratamiento de la EA moderada a severa. El estudio también buscaba analizar el efecto de un inhibidor de TNF, es decir, adalimumab, sobre la correlación de un marcador de resorción de hueso, un marcador de la degradación de colágeno, y un marcador de sinovitis con CRP, un marcador para la EA, en un estudio de población de la EA.

Métodos

Los pacientes con EA activa que tuvieron una respuesta inadecuada a al menos un AINE o FAME fueron elegibles para enrolos en este estudio. El diseño del estudio se representa en la Figura 1. Los pacientes se distribuyeron en grupos al azar para recibir placebo o 40 mg adalimumab subcutáneamente (sc) cada dos semanas (cds) durante un período inicial doble ciego de 24 semanas, seguido de un período de fase abierta de 80 semanas. Se analizaron tres biomarcadores en el momento inicial y después del tratamiento con adalimumab o placebo a las 12 y 24 semanas. Específicamente, se analizaron el marcador de resorción de hueso, N-telopéptidos de colágeno de Tipo I en suero (NTX), el biomarcador de degradación de colágeno, los C-telopéptidos de colágeno de Tipo II en orina (CTX-II en orina), y el biomarcador de sinovitis, metaloproteasa de la matriz 3 en suero (MMPS). De este modo, los parámetros de eficacia primaria incluyeron los criterios del Assessment in AS (ASAS) Working Group, el Bath EA Disease Activity Index (BEADAI), y CRP. Mediante ELISA, se midieron las concentraciones de C-telopéptidos de colágeno de Tipo II en orina (CTX-II en orina), los N-telopéptidos de Tipo I en colágeno (NTX), y MMP3 en suero para cada paciente en el período inicial, y a las 12 y 24 semanas. Se determinaron las diferencias de concentración en el período inicial en cada grupo de tratamiento, así como las correlaciones entre los cambios en estos biomarcadores y otros resultados de la EA.

Los criterios de inclusión de pacientes incluyeron los siguientes: pacientes ≥ 18 años de edad; EA activa, definidos por el cumplimiento de al menos 2 de los siguientes 3 criterios: (1) puntuación BEADAI ≥ 4 , (2) Escala Analógica Visual (EAV) puntuación para Dolor del Dorso Total ≥ 4 , y (3) Rigidez matutina ≥ 1 hora; y respuesta inadecuada a al menos un AINE.

Los criterios de exclusión de pacientes incluyeron los siguientes: tratamiento anti-TNF recibido previamente; evidencia radiológica de alquilosis espinal (columna en caña de bambú); uso previo de FAME en el plazo de 4 semanas desde el período inicial (distinto de metotrexato, sulfasalazina, o hidroxicloroquina); inyección intra-articular en la articulación con corticosteroides en el plazo de 4 semanas desde el período inicial; y uso de otros agentes biológicos o terapia de investigación en el plazo de 6 semanas desde el período inicial.

Resultados

Se enrolaron un total de 82 pacientes: 44 pacientes con placebo vs. 38 pacientes con adalimumab. De los 82 pacientes totales, 80 (98%) de pacientes completaron el período de 24 semanas. Los dos pacientes que no completaron el período de 24 semanas fueron del grupo con placebo. Las características del período inicial fueron similares entre los grupos de tratamiento. La demografía del período inicial se muestran en la Tabla 1 de más abajo.

Tabla 1. Demografía del período inicial.

	Placebo (N=44)	Adalimumab 40 mg cds (N=38)
Edad (años)†	40,0	41,9
Raza (% Caucásica)	42 (95,5)	37 (97,4)
Sexo (% varón)	36 (81,8)	29 (76,3)
Peso (kg) †	78,2	76,1
Duración de la EA (años) †	12,1	14,5
CRP (mg/dL) †	2,3	1,8
NTX (nm/bce) †	9,77	10,5
Concentración de CTX-II en orina (ng/ml)	388,2	324,8
MMP-3 (ng/ml) †	57,1	25,3

Entre todos los pacientes del estudio, los niveles de CRP se correlacionaron significativamente con los niveles de CTX-II en orina, MMP3 y NTX en el período inicial. La correlación entre los niveles de CRP y CTX-II en orina fue superior a la correlación entre los niveles de CRP y MMP3 y NTX. Las correlaciones entre el biomarcador y la CRP en el período inicial se muestran en la Tabla 2 de más abajo.

Tabla 2. Biomarcador y correlaciones con la CRP en el período inicial.

Todos los pacientes en el período inicial	r = valor de correlación (N, valor p)		
	CTX-II en orina	MMP3	NTX
CRP	0,71 (80, <0,001)	0,45 (81, <0,001)	0,37 (80, 0,001)
CTX-II en orina	-	0,27 (79, 0,015)	0,49 (78, <0,001)

Todos los pacientes en el período inicial	r = valor de correlación (N, valor p)		
	CTX-II en orina	MMP3	NTX
r = valor de correlación N = pacientes			

Se produjeron reducciones significativas en las concentraciones de CTX-II en orina y MMP3 (mostrado más abajo en la Tabla 3) en las pts de adalimumab vs. placebo a las 12 y 24 semanas ($p < 0,001$), pero no hubo diferencias significativas para NTX.

5

Tabla 3. Reducciones significativas en CTX-II en orina y MMP3.

Biomarcador	Visita	Cambio en Adalimumab (%)	Cambio en Placebo (%)
CTX-II en orina	12-Semana	-76,8 (-9,6)	43,8 (22,2)
	24-Semana	-64,7 (3,2)	47,4 (29,8)
MMP3	12-Semana	-3,9 (-12,3)	12,4 (18,9)
	24-Semana	-3,2 (-8,6)	12,5 (20,1)

Como se muestra en la Figure 2, los pacientes con adalimumab experimentaron reducciones significativas de los niveles de CTX-II en orina frente al placebo la Semana 12 y la Semana 24. Los pacientes con adalimumab también experimentaron reducciones estadísticamente significativas en los niveles de MMP3 frente a los pacientes con placebo a las 12 semanas y las 24 semanas, como se muestra en la Figura 3. Los niveles de CRP se redujeron significativamente en los pacientes con adalimumab en comparación con los pacientes con placebo la semana 12 y la semana 24 (véase la Figura 4).

10

15

20

Los cambios en los niveles de CRP, CTX-II en orina, y MMP-3 desde el período inicial a la semana 12 se correlacionaban significativamente estadísticamente en el grupo con adalimumab. Se observaron correlaciones significativas entre la CRP del período inicial y 1) CTX-II en orina ($r = 0,71$), 2) MMP3 ($r = 0,45$), y 3) NTX ($r = 0,37$) ($p < 0,001$), y entre CTX-II en orina y NTX ($r = 0,49$; $p < 0,0001$). Los cambios a las doce semanas en CTX-II en orina y MMP3 se correlacionaban significativamente con los cambios en CRP ($r = 0,40$ y $0,43$, respectivamente) ($p < 0,005$). Además, el cambio a las 12 semanas en CTX-II en orina se correlacionaban significativamente con el cambio en MMP3 ($r = 0,41$, $p < 0,0001$). En el grupo con adalimumab, el análisis de correlación confirma que la mejora en los niveles de CRP está asociado con la reducción de los niveles tanto de CTX-II en orina como de MMP-3. Las correlaciones entre el cambio de CRP y biomarcador desde el período inicial a la semana 12 se muestran más abajo en la Tabla 2.

25

Tabla 4. Correlaciones entre la CRP y el biomarcador desde el período inicial a la Semana 12*

Placebo	R = valor de correlación (N, valor p†)		
	CTX-II en orina	MMP3	NTX
PCR	0,21 (42, 0,172)	0,34 (44, 0,023)	0,08 (43,0,629)
CTX-II en orina	-	0,45 (42, 0,003)	0,27 (41, 0,089)
Adalimumab	CTX-II en orina	MMP3	NTX
PCR	0,41 (38, 0,010)	0,37 (37, 0,024)	0,08 (37, 0,620)
CTX-II en orina	-	0,15 (37, 0,375)	0,10 (37, 0,540)

En conclusión, en pacientes con EA de moderada a severa, el adalimumab suprimió significativamente los biomarcadores que reflejan sinovitis y degradación de la matriz de cartílago. El adalimumab indujo supresión de los biomarcadores que reflejan sinovitis (MMP3) y degradación de la matriz de cartílago (CTX-II en orina), sugiriendo que el adalimumab ralentiza el deterioro estructural asociado con la EA. Además, los cambios en CTX-II en orina y MMP3 se correlacionaban significativamente con el cambio en la CRP.

30

35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Maksymowych, Walter P. *et al.*

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DIAGNOSTICAR LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE UTILIZANDO BIOMARCADORES

ES 2 431 643 T3

<130> BBI-235PC
 <140> PCT/US06/42564
 <141> 2006-10-31
 <150> 60/732444 <151> 2005-11-1
 5 <160> 37
 <170> FastSEQ PARA Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de D2E7
 <400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10
 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
 15 <210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Región variable de la cadena pesada de D2E7
 <400> 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
 25 <210> 3
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de D2E7
 5 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Thr o Ala
 <400> 3
 Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5
 10 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de D2E7
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Tyr o Asn
 <400> 4
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
 1 5 10
 20 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera de D2E7
 <400> 5
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5
 30 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de D2E7
 35 <400> 6
 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

ES 2 431 643 T3

<220>
 <223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera de D2E7
 <400> 7
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> CDR1 de la región variable de la cadena pesada de D2E7
 <400> 8
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

15 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Región variable de la cadena ligera de 2SD4
 <400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile 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 Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

20 <210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de 2SD4

ES 2 431 643 T3

<400> 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

<210> 11

<211> 9

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 2SD4

<400> 11

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de EP B12

<400> 12

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5

20

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VL10E4

25

<400> 13

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VL100A9

ES 2 431 643 T3

<400> 14
 Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VLL100D2
 <400> 15
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
 10 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VLLOF4
 <400> 16
 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 17
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de LOE5
 25 <400> 17
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VLLOG7
 <400> 18
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
 35 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VLLOG9

ES 2 431 643 T3

<400> 19
 Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VLLOH1
 <400> 20
 10 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
 1 . 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VLLOH10
 <400> 21
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
 1 5
 <210> 22
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VL1B7
 25 <400> 22
 Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VL1C1
 <400> 23
 Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
 . 1 5
 35 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VL0.1F4

ES 2 431 643 T3

<400> 24
 Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de VL0.1H8
 <400> 25
 10 Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de LOE7
 <400> 26
 Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5
 <210> 27
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de 2SD4
 25 <400> 27
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1B11
 <400> 28
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
 1 5 10
 35 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1D8

ES 2 431 643 T3

<400> 29
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1A11
 <400> 30
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
 10 1 5 10 .
 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1B12
 <400> 31
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 32
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1E4
 25 <400> 32
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1F6
 <400> 33
 Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
 1 5 10
 35 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de 3C-H2

ES 2 431 643 T3

<400> 34
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de VH1-D2.N

<400> 35
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

10 <210> 36
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Región variable de la cadena ligera de D2E7

<400> 36
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctgggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatggtg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

20 <210> 37
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

25 <223> Región variable de la cadena pesada de D2E7

<400> 37
gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgccca tgcactgggt cggcaagct 120
ccaggaaggg gcctggaatg ggtctcagct atcacttggga atagtgggtca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgctcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360
agt 363
1

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA comprendiendo dicho método
determinar un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) y un nivel de post-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenida del sujeto que tiene EA en donde un nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II en la muestra o las muestras con respecto a niveles patrón conocidos de CTX-II basados en uno o varios sujetos que tienen EA y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 en la muestra o las muestras con respecto a niveles patrón conocidos de MMP3 basados en uno o varios sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.
- 15 2. Un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método
determinar un nivel de pre-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II), y un nivel de pre-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenida del sujeto que tiene EA, en donde una nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II con respecto al nivel de pre-tratamiento de CTX-II y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 con respecto al nivel de pre-tratamiento de MMP3 indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.
- 20 3. Un método para determinar la eficacia del adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método
determinar un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II), y un nivel de post-tratamiento de la metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3) en una o varias muestras obtenida del sujeto que tiene EA,
25 en donde un nivel de post-tratamiento inferior de CTX-II con respecto a un nivel de pre-tratamiento de CTX-II y un nivel de post-tratamiento inferior de MMP3 con respecto a un nivel de pre-tratamiento de MMP3 indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.
- 30 4. Un método para determinar la eficacia de adalimumab para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA) en un sujeto que tiene EA, comprendiendo dicho método
determinar un nivel de post-tratamiento de C-telopéptido de colágeno de tipo II (CTX-II) en una o varias muestras del sujeto que tiene EA
en donde una disminución en el nivel de CTX-II de al menos 9% con respecto a un nivel patrón conocido de CTX-II basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA indica que el adalimumab es eficaz para el tratamiento de la EA en el sujeto.
- 35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde CTX-II es CTX-II en orina.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de post-tratamiento de CTX-II en la muestra o las muestras obtenidas del sujeto es tiene un descenso de al menos 9% con respecto al nivel patrón conocido de CTX-II basado en el sujeto o los sujetos con EA.
- 45 7. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de post-tratamiento de la MMP-3 en la muestra o las muestras obtenidas del sujeto tiene un descenso de al menos aproximadamente 8% con respecto al nivel patrón conocido de MMP3 basado en el sujeto o los sujetos que tienen EA.
- 50 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la MMP3 es MMP3 de suero.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende adicionalmente
55 comparar el nivel de proteína C-reactiva del sujeto (CRP) con un nivel de CRP convencional conocido asociado con la EA, y evaluar si el nivel de CRP del sujeto es mayor que el nivel de CRP patrón conocido, en donde un nivel más bajo de CRP con respecto al nivel patrón conocido de CRP indica la eficacia del tratamiento.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el nivel de MMP-3 se determina utilizando ELISA.
- 60 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el nivel de CTX-II se determina utilizando ELISA.

Figura 1

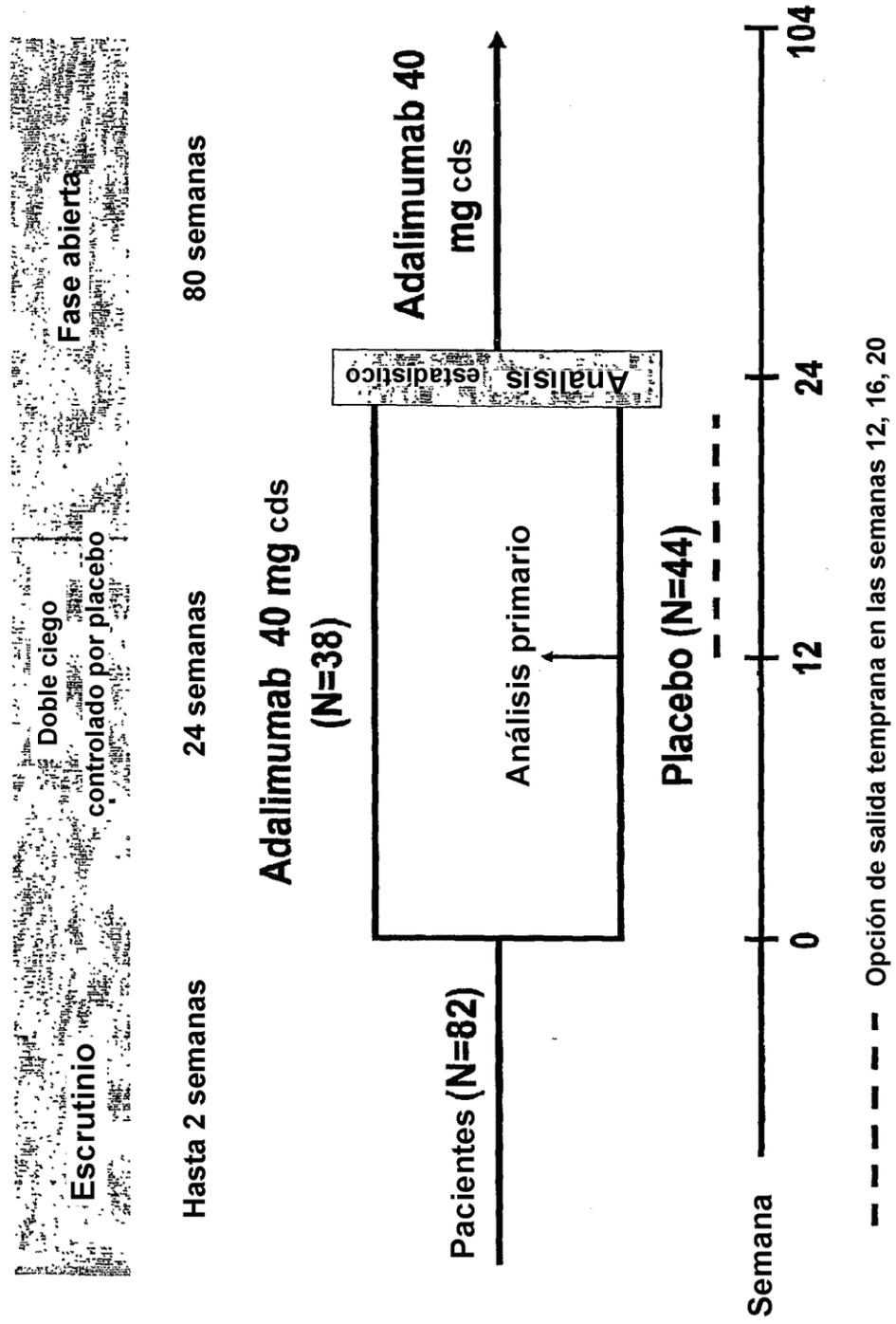
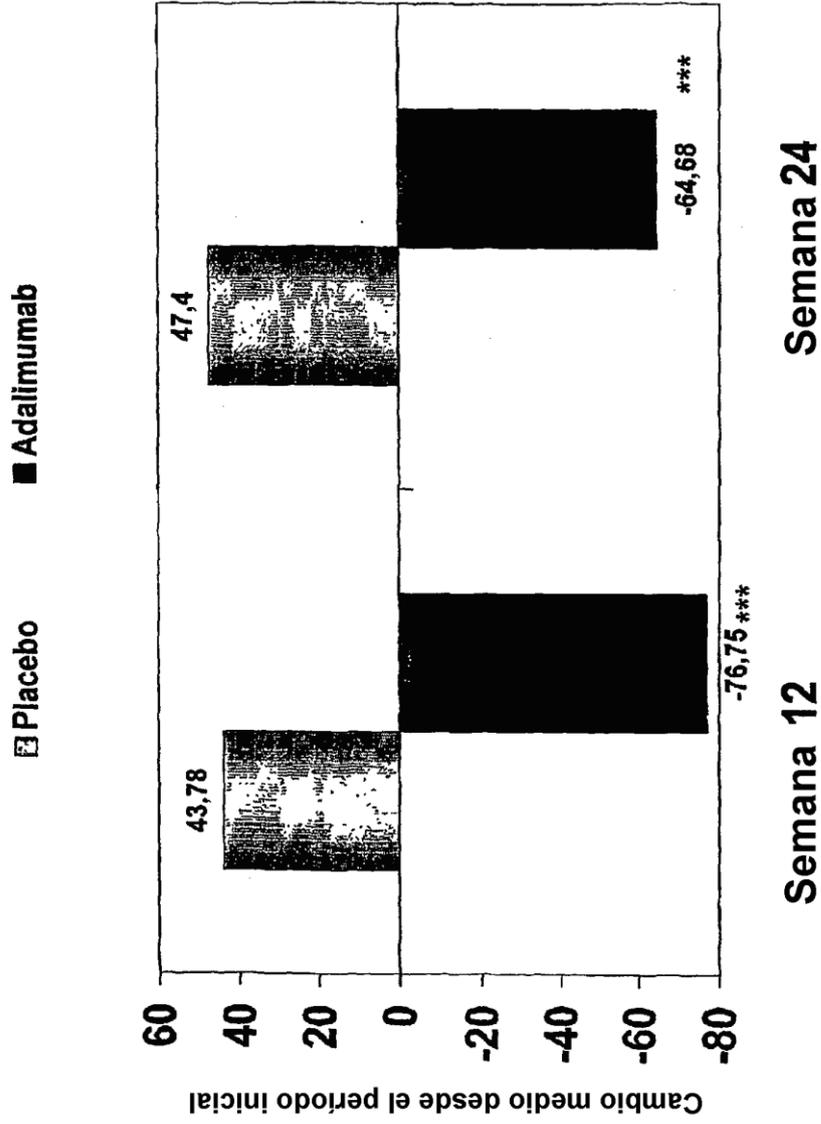


Figura 2

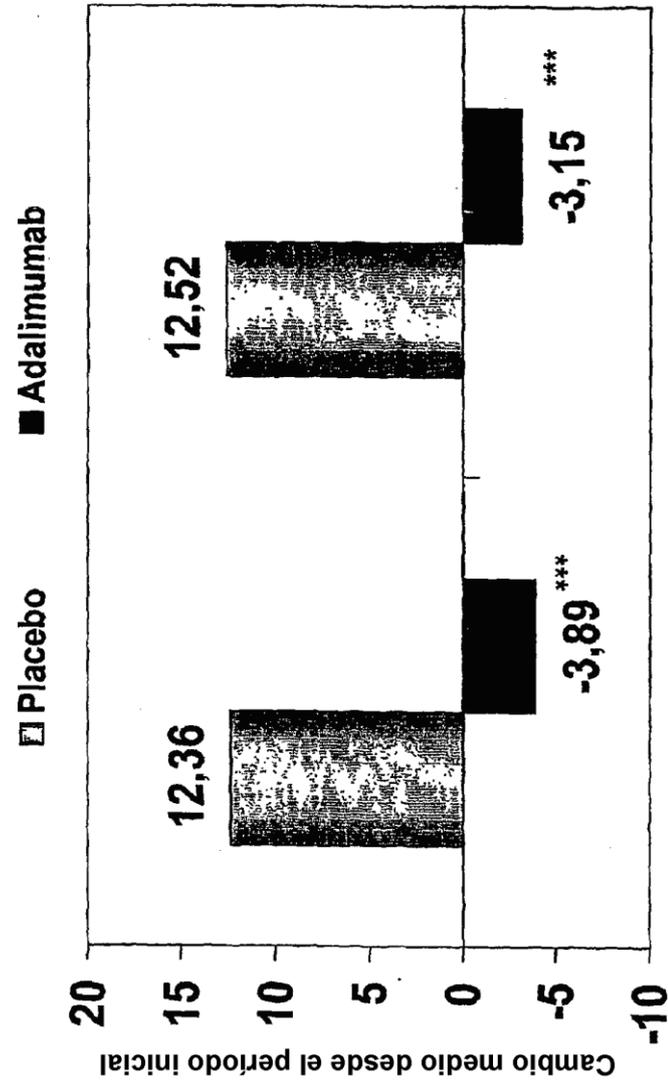
Cambio en las concentraciones de CTX-II en las semanas 12 y 24[†]



[†]LOCF Promedios ajustados*** Estadísticamente significativo al nivel p=0,001, adalimumab frente a placebo

Figura 3

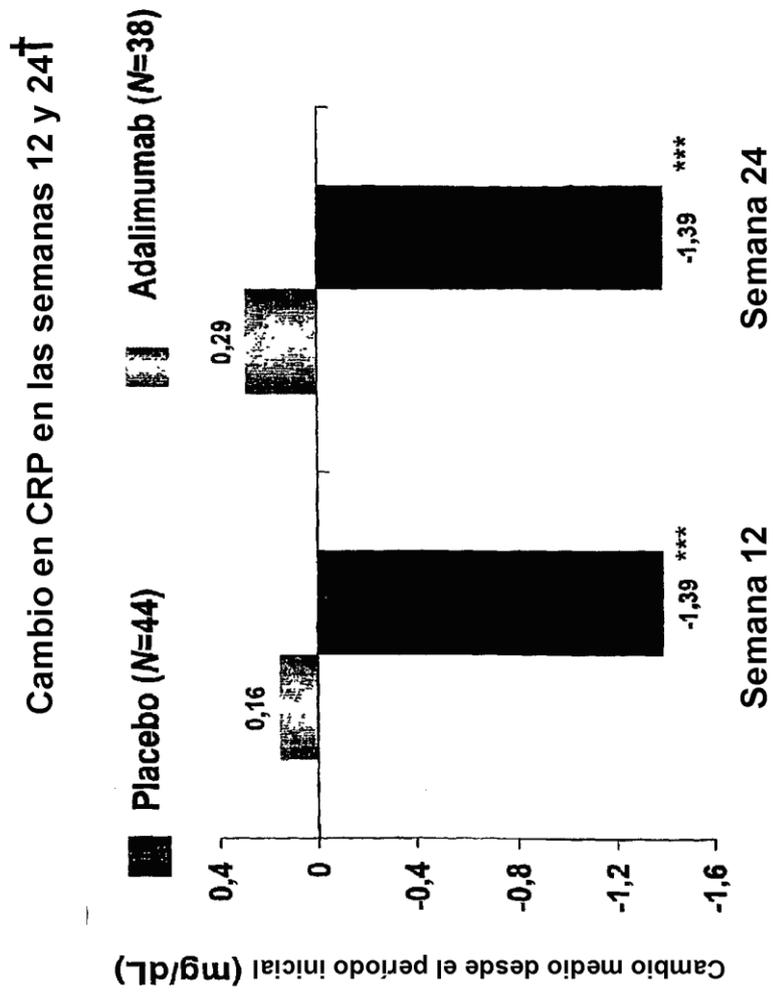
Cambio en las concentraciones de MMP3 en las semanas 12 y 24[†]



Semana 12 **Semana 24**

[†]LOCF Promedios ajustados*** Estadísticamente significativo al nivel p=0,001, adalimumab frente a placebo

Figura 4



† LOCF ***. Estadísticamente significativo al nivel $p=0,001$, valor p para la diferencia entre terapias de ANCOVA