

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 173**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2007 E 07868831 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2101780**

54 Título: **Métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas usando un antagonista de GM-CSF**

30 Prioridad:

21.11.2006 US 860780 P
21.02.2007 US 902742 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2013

73 Titular/es:

KALOBIOUS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
260 East Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

BEBBINGTON, CHRISTOPHER R. y
YARRANTON, GEOFFREY T.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 432 173 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas usando un antagonista de GM-CSF

5 **Antecedentes de la invención**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica y típicamente progresiva que afecta hasta al 1% de la población adulta en todo el mundo (Gabriel, *Rheum Dis Clin North Am* 27: 269-81, 2001). Las actuales recomendaciones para el tratamiento de AR incluyen tratamiento temprano con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) después de que se ha establecido el diagnóstico. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE), y hasta recientemente, inhibidores de COX-2 se han usado ampliamente mientras se esperaba para confirmar el diagnóstico o más tarde en el curso de la enfermedad junto con FARME. El metotrexato es el FARME usado más ampliamente, pero otros agentes, incluyendo hidroxicloroquina, sulfasalazina, oro, minociclina y leflunomida, también se prescriben. Pueden usarse corticoesteroides en combinación con FARME, pero en general, solamente se usan dosis bajas para minimizar los acontecimientos adversos (O'Dell, *New Engl. J. Med.* 350: 2591-2603, 2004).

Recientemente han sido aprobados varios nuevos fármacos biológicos para el tratamiento de AR. Etanercept (Enbrel®), bloquea el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α); infliximab y adalimumab (Remicade® y Humira®, respectivamente) bloquean TNF- α y TNF- β ; y Anakinra (Kineret®) es un inhibidor de IL-1. Estos agentes actúan rápidamente y han mostrado ser modificadores de la enfermedad (ralentizan la erosión articular/ósea) (Olsen & Stein, *New Engl. J. Med* 350: 2167-2179, 2004). Sin embargo, sigue habiendo algunos problemas con estas terapias. Algunos pacientes no alcanzan una respuesta adecuada a los inhibidores de TNF. Además, en algunos pacientes, el beneficio terapéutico del inhibidor de TNF se pierde con el tiempo. El bloqueo de la ruta de TNF también se ha asociado con la reactivación de la tuberculosis así como un riesgo incrementado de infecciones graves, desmielinización y linfoma, aunque los pacientes de AR corren un mayor riesgo de linfoma que la población general. Anakinra tiene una corta semivida y debe administrarse como una inyección diaria y, por lo tanto, se usa con menos frecuencia que los inhibidores de TNF de acción larga como terapia biológica de primera línea.

Datos recientes sobre el uso de rituximab (Mabthera®), un anticuerpo monoclonal anti-CD20, en combinación con metotrexato en pacientes con AR ha mostrado beneficio durante un periodo de tiempo prolongado después de dos infusiones del anticuerpo (Edwards et al., *New Engl. J. Med* 350: 2572-2581, 2004).

El metotrexato se usa como FARME para tratar AR y otras enfermedades artríticas inflamatorias e indicaciones autoinmunitarias, incluyendo psoriasis y lupus eritematoso sistémico. El metotrexato es particularmente eficaz para tratar artritis psoriásica y artritis idiopática juvenil. El fármaco también se usa en quimioterapia de cáncer a dosis más elevadas que las que se recomiendan para el tratamiento de artritis inflamatoria. Cuando se usa en quimioterapia, el metotrexato puede causar supresión de la médula ósea dando como resultado una producción disminuida de todo tipo de células sanguíneas, particularmente cuando se usan en combinación con cualquiera de una serie de otros fármacos incluyendo corticoesteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, ciclosporina, trimetoprima y ciertos antibióticos. Aunque el metotrexato es generalmente bien tolerado en los regímenes de dosificación usados para el tratamiento de artritis (o psoriasis), incluso a estas dosis más bajas el metotrexato puede causar supresión de la médula ósea y especialmente neutropenia. Por ejemplo, en casos clínicos (Sosin & Handa, *Brit. Med. J.* 326: 266-267, 2003) se describió neutropenia en pacientes tratados con dosis semanales de metotrexato de entre 5 mg y 17,5 mg. Las recomendaciones para la dosificación de metotrexato en AR, tales como las directrices de la *British Society for Rheumatology* (julio de 2000) son 7,5 mg de metotrexato a la semana, incrementando en 2,5 mg cada seis semanas hasta una dosis máxima semanal de 25 mg. Por lo tanto, la neutropenia se desarrollaba en estos pacientes a dosis significativamente por debajo de la dosis máxima recomendada, especialmente con terapias concomitantes.

En quimioterapia que incluye metotrexato, puede prescribirse GM-CSF para corregir los bajos niveles de neutrófilos en la sangre y, por lo tanto, reducir la duración y gravedad de la neutropenia (*Am. Soc. Clin. Onc.* 2006, *J. Clin. Oncol.* 24: 1 de julio de 2006). En este entorno clínico, se usa GM-CSF como factor de crecimiento hematopoyético para potenciar la producción de granulocitos (incluyendo neutrófilos) y macrófagos. Por ejemplo, la administración a corto plazo de GM-CSF a pacientes de cáncer puede conducir a un rápido incremento de los recuentos de neutrófilos y reduce la neutropenia en pacientes tratados con un régimen de quimioterapia que incluye metotrexato (Aglietta et al., *Cancer* 72: 2970-2973, 1993). La eficacia establecida de GM-CSF en el tratamiento de neutropenia debida a metotrexato plantea la preocupación de que el antagonismo de GM-CSF pueda tener el efecto opuesto, es decir, que el antagonismo a GM-CSF pueda contribuir a la neutropenia, particularmente en paciente tratados concomitante o previamente con metotrexato.

Krinner et al. (*Mol Immunol* 2006, 44(5): 916-25) describe una IgG1 monoclonal humana que neutraliza GM-CSF. Puljic et al. (*Eur J Pharmacol* 2006, 557: 230-5) describe un anticuerpo que neutraliza GM-CSF en un modelo en ratón para inflamación pulmonar. Riksen et al. (*Ann Rheum Dis* 2005, 65(4): 465-70) describe el tratamiento de pacientes con artritis con metotrexato. Gong et al. (*Am Heart J* 2006, 151(1): 62-8) describe la adición de metotrexato a terapia convencional para pacientes con insuficiencia cardiaca crónica. Tarkowski et al. (*Acta Neurol*

Scand 2001, 103: 166-174) describe el aumento local y sistémico de GM-CSF en enfermedad de Alzheimer y demencia vascular.

- 5 La neutropenia es un efecto secundario significativo y grave de varias terapias actuales para artritis inflamatoria que incluyen antagonistas de citoquina. El antagonista de IL-1 anakinra conduce a un riesgo incrementado de neutropenia, tanto en solitario como particularmente cuando se usa en combinación con un antagonista de TNF (Fleischmann et al., Expert Opinion Biol Ther. 4: 1333, 2004). El infliximab también ha sido asociado con un riesgo incrementado de neutropenia.
- 10 Actualmente existe una necesidad de tratamientos adicionales de AR, particularmente en pacientes que reciben metotrexato. La presente invención aborda esta necesidad.

Breve resumen de la invención

- 15 La presente invención proporciona un anticuerpo anti-GM-CSF para su uso en la reducción de los síntomas de artritis reumatoide en un paciente sometido a tratamiento con metotrexato sin inducir neutropenia clínicamente significativa, en el que el recuento absoluto de neutrófilos es menor de $0,5 \times 10^9/l$, donde el anticuerpo anti-GM-CSF es un antagonista de GM-CSF, donde el metotrexato se proporciona en una cantidad de 7,5 mg a 25 mg/semana, y donde el anticuerpo anti-GM-CSF se proporciona en una cantidad de 0,1 a 25 mg/kg. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF se produce de forma recombinante, por ejemplo, es un anticuerpo monoclonal recombinante. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF, por ejemplo, anti-GM-CSF purificado a partir de plasma humano, se purifica a partir de una fuente natural.
- 20

- 25 En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo tal como un nanocuerpo o un anticuerpo de camélido. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un scFv o un anticuerpo de dominio (dAB). El anticuerpo también puede modificarse, *por ejemplo*, para mejorar la estabilidad. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo está conjugado a polietilenglicol.

- 30 En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una K_D de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 10 nM, *por ejemplo*, de aproximadamente 100 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 900 pM, o aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM. En realizaciones adicionales, el anticuerpo tiene una K_D de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 pM, *por ejemplo*, una K_D de aproximadamente 1 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 25 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 80 pM, o aproximadamente 90 pM a aproximadamente 100 pM. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una K_D de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 pM.
- 35

- 40 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana, tal como una cadena gamma.
- 45

- En realizaciones adicionales, se anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo 19/2 quimérico. El anticuerpo puede comprender, *por ejemplo*, las regiones V_H y V_L del 19/2 quimérico. El anticuerpo también puede comprender una región constante de cadena pesada humana tal como una región gamma. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de la región V_H del 19/2 quimérico. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de la región V_L del 19/2 quimérico. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones V_H y V_L de un anticuerpo 19/2 quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la CDR3 de la región V_H y la CDR3 de la región V_L del 19/2 quimérico.
- 50

- 55 En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una semivida de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 días.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF, se administra por inyección o por infusión. Por ejemplo, el anticuerpo anti-GM-CSF puede administrarse por vía intravenosa durante un periodo entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 2 horas.
- 60

- En otras realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF se administra por vía subcutánea mediante inyección en embolada.

- En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-GM-CSF se administra por vía intramuscular.
- 65

Un anticuerpo para GM-CSF puede administrarse, por ejemplo, a una dosis entre aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

5 En algunas realizaciones, el tratamiento con el anticuerpo anti-GM-CSF comprende una segunda administración del anticuerpo anti-GM-CSF.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

10 Tal como se usa en el presente documento, "enfermedad inflamatoria crónica" se refiere a enfermedades asociadas con una respuesta inflamatoria de duración prolongada. En algunos casos, la respuesta inflamatoria puede durar semanas, meses o incluso indefinidamente. La duración prolongada de la respuesta inflamatoria es provocada frecuentemente por un estímulo persistente a la respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria causa daño tisular.

15 La inflamación crónica puede ser el resultado de la progresión de inflamación aguda. La inflamación crónica también puede resultar después de la repetición de episodios de inflamación aguda o puede desarrollarse *de novo*. Se ha descubierto que una serie de dolencias inflamatorias están asociadas con infección por patógenos persistente, materia extraña no viva irritante que no puede ser eliminada mediante descomposición enzimática o fagocitosis, o un componente tisular "normal" que es reconocido como no propio (de la forma más frecuente asociado con enfermedades autoinmunitarias). El aspecto histológico de la inflamación crónica frecuentemente implica un infiltrado celular inflamatorio mixto que, generalmente, está asociado con la presencia de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas con polimorfos de neutrófilos y eosinófilos como posibles componentes secundarios (los polimorfos de neutrófilos y eosinófilos están asociados en cantidades más grandes con la inflamación aguda). Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen artritis, *por ejemplo*, AR, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil y otras enfermedades inflamatorias de la articulación; enfermedades inflamatorias intestinales, *por ejemplo*, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome de Barrett, ileitis, enteritis y enteropatía sensible al gluten; trastornos inflamatorios del aparato respiratorio, tales como asma, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, rinitis alérgica, silicosis, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, enfermedades de hipersensibilidad pulmonar, bronquiectasia; enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo psoriasis, escleroderma, y dermatosis inflamatorias tales como eccema, dermatitis atópica, urticaria y pruritos; trastornos que implican inflamación del sistema nervioso central y periférico, incluyendo esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer. Diversas enfermedades inflamatorias más pueden tratarse usando los métodos de la invención. Éstas incluyen lupus eritematoso sistémico, enfermedad renal mediada por el sistema

20 inmunitario, por ejemplo, glomerulonefritis y espondiloartropatías; y enfermedades con un componente inflamatorio crónico indeseable tal como esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjogren, vasculitis, sarcoidosis, tiroiditis, gota, otitis, conjuntivitis, sinusitis, sarcoidosis, síndrome de Behcet, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante; inflamación y lesión isquémica al sistema cardiovascular tal como cardiopatía isquémica, apoplejía y aterosclerosis; y rechazo de injerto, incluyendo rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped. Diversas enfermedades inflamatorias más incluyen tuberculosis y colecistitis crónica. Enfermedades inflamatorias crónicas adicionales se describen, por ejemplo, en el documento Harrison's Principles of Internal Medicine, 12^a Edición, Wilson, et al., eds., McGraw-Hill, Inc.).

45 La expresión "artritis reumatoide" (AR) se refiere a una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla como un trastorno autoinmunitario y está asociada con inflamación crónica de las articulaciones. Frecuentemente, la inflamación se extiende a tejidos que rodean a las articulaciones y a otros órganos. Típicamente, la AR es una enfermedad progresiva que puede causar destrucción de la articulación e incapacidad funcional. La inflamación de la articulación asociada con AR causa hinchazón, dolor, rigidez y enrojecimiento en las articulaciones. La inflamación de enfermedad reumatoide también puede producirse en tejidos alrededor de las articulaciones, tales como los tendones, ligamentos y músculos. En algunos pacientes con AR, la inflamación crónica conduce a la destrucción del cartílago, el hueso y los ligamentos causando deformidad de las articulaciones. El daño a las articulaciones puede producirse temprano en la enfermedad y ser progresivo. El daño progresivo a las articulaciones no se correlaciona necesariamente con el grado de dolor, rigidez o hinchazón presentes en las articulaciones.

55 Tal como se usa en el presente documento, "Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos" (GM-CSF) se refiere a una pequeña glucoproteína de origen natural con puentes disulfuro internos que tiene un peso molecular de aproximadamente 23 kDa. En seres humanos, es codificada por un gen ubicado dentro del agrupamiento de la citoquina en el cromosoma 5 humano. La secuencia del gen y la proteína humanas son conocidas. La proteína tiene una secuencia señal N-terminal, y un dominio de unión al receptor C-terminal (Rasko y Gough en: The Cytokine Handbook, A. Thomson, et al, Academic Press, Nueva York (1994) páginas 349-369). Su estructura tridimensional es similar a la de las interleuquinas, aunque las secuencias de aminoácidos no son similares. El GM-CSF es producido, en respuesta a una serie de mediadores inflamatorios, por células mesenquimáticas presentes en el entorno hemopoyético y en sitios periféricos de inflamación. El GM-CSF es capaz de estimular la producción de granulocitos neutrófilos, macrófagos y colonias mixtas de granulocitos-macrófagos a partir de células de médula ósea y puede estimular la formación de colonias de eosinófilos a partir de células

progenitoras de hígado fetal. El GM-CSF también puede estimular algunas actividades funcionales en granulocitos y macrófagos funcionales.

5 La expresión “receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos” (GM-CSFR) se refiere a un receptor unido a la membrana expresado en células que transduce una señal cuando está unido al factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El GM-CSFR está constituido por una cadena de unión de baja afinidad específica de ligando (GM-CSFR alfa) y una segunda cadena que se requiere para unión de alta afinidad y transducción de señales. Esta segunda cadena es compartida por las cadenas alfa específicas de ligando para los receptores de interleuquina 3 (IL-3) e IL-5 y se denomina, por lo tanto, beta común (beta c). La región citoplasmática de GM-CSFR alfa está constituida por una región conservada proximal a la membrana compartida por las isoformas alfa 1 y alfa 2 y una región variable C-terminal que es divergente entre alfa 1 y alfa 2. La región citoplasmática de beta-c contiene serina proximal a la membrana y dominios ácidos que son importantes para la respuesta proliferativa inducida por GM-CSF

15 La expresión “receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos soluble” (sGM-CSFR) se refiere a un receptor no unido a la membrana que se une a GM-CSF, pero que no transduce una señal cuando está unido al ligando.

20 Tal como se usa en el presente documento, un “antagonista de GM-CSF peptídico” se refiere a un anticuerpo que interactúa con GM-CSF para reducir o bloquear (parcial o completamente) la transducción de señales que, en caso contrario, resultaría de la unión de GM-CSF a su receptor relacionado expresado en las células. Los anticuerpos anti-GM-CSF pueden actuar reduciendo la cantidad de ligando de GM-CSF disponible para unirse al receptor (*por ejemplo*, anticuerpos que una vez unidos a GM-CSF incrementan la velocidad de aclaramiento de GM-CSF) o impedir que el ligando se una a su receptor uniéndose a GM-CSF (*por ejemplo*, anticuerpos neutralizantes). Un ensayo ejemplar para detectar actividad antagonista de GM-CSF se proporciona en el ejemplo 1. Típicamente, el antagonista de GM-CSF peptídico, tal como un anticuerpo neutralizante, tiene una CE_{50} de 10 nM o menos.

30 Un anticuerpo anti-GM-CSF “purificado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo anti-GM-CSF que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GM-CSF que es purificado de sangre o plasma está sustancialmente libre de otros componentes sanguíneos o plasmáticos tales como otras moléculas de inmunoglobulina. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alta resolución. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. Típicamente, “purificada” significa que la proteína es al menos el 85% pura, más preferentemente al menos el 95% pura y de la forma más preferente al menos el 99% pura con respecto a los componentes con los que se presenta la proteína de forma natural.

40 Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo” se refiere a una proteína funcionalmente definida como una proteína de unión y definida estructuralmente como comprendiendo una secuencia de aminoácidos que es reconocida por un experto en la materia como derivada de la región marco de un gen que codifica inmunoglobulina de un animal que produce anticuerpos. Un anticuerpo puede estar constituido por uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como infinidad de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

50 Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

55 El término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento incluye fragmentos de anticuerpo que conserven especificidad de unión. Por ejemplo, hay una serie de fragmentos de anticuerpo bien caracterizados. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los puentes disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que, a su vez, es una cadena ligera unida a $VH-CH1$ mediante un puente disulfuro. El $F(ab')_2$ puede reducirse en condiciones moderadas para romper el puente disulfuro en la región bisagra convirtiendo de este modo el dímero $(Fab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la materia apreciará que pueden sintetizarse fragmentos *de novo* químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos

mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados usando metodologías de ADN recombinante.

Los anticuerpos incluyen dímeros tales como dímeros de V_H - V_L , dímeros de V_H o dímeros de V_L , incluyendo anticuerpos de cadena sencilla (anticuerpos que existen como una única cadena polipeptídica), tales como anticuerpos Fv de cadena sencilla (sFv o scFv) en los que una región pesada variable y una ligera variable están unidas juntas (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena sencilla es un heterodímero de V_H - V_L enlazado covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican V_H y V_L unidas directamente o unidas mediante un enlazador que codifica un péptido (*por ejemplo*, Huston, et al. Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 85: 5879-5883, 1988). Mientras que la V_H y la V_L están conectadas a cada una como una única cadena polipeptídica, los dominios de V_H y V_L se asocian de forma no covalente. Como alternativa, el anticuerpo puede ser otro fragmento, tal como un Fv estabilizado mediante puentes disulfuro (dsFv). También pueden generarse otros fragmentos, incluyendo usando técnicas recombinantes. Los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras que convierten las cadenas polipeptídicas ligera y pesada agregadas de forma natural, pero separadas químicamente de la región V de un anticuerpo, en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno son conocidos por los expertos en la materia (véase por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778). En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aquellos que se han presentado en fagos o se han generado mediante tecnología recombinante usando vectores donde las cadenas se secretan como proteínas solubles, *por ejemplo*, scFv, Fv, Fab, (Fab')₂ o generados mediante tecnología recombinante usando vectores donde las cadenas se secretan como proteínas solubles. Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden incluir dianticuerpos y minianticuerpos.

Los anticuerpos de la invención también incluyen dímeros de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos. Dado que la región V_H de una IgG dimérica de cadena pesada en un camélido no tiene que establecer interacciones hidrófobas con una cadena ligera, la región en la cadena pesada que normalmente contacta con una cadena ligera se cambia a residuos de aminoácidos hidrófilos en un camélido. Los dominios V_H de IgG diméricas de cadena pesada se denominan dominios VHH. Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen anticuerpos de dominio único (dAb) y nanocuerpos (véase, *por ejemplo*, Cortez-Retamozo, et al., Cancer Res. 64: 2853-2857, 2004).

Tal como se usa en el presente documento, "región V" se refiere a un dominio de región variable de un anticuerpo que comprende los segmentos del Marco 1, CDR1, Marco 2, CDR2 y Marco 3, incluyendo CDR3 y Marco 4, segmentos que se añaden al segmento V como consecuencia de reordenación de los genes de la región V de cadena pesada y cadena ligera durante diferenciación de células B. Un "segmento V" tal como se usa en el presente documento se refiere a la región de la región V (cadena pesada o ligera) que es codificada por un gen V.

Tal como se usa en el presente documento, "región determinante de la complementariedad (CDR)" se refiere a las tres regiones hipervariables en cada cadena que interrumpen las cuatro regiones "marco" establecidas por las regiones variables de cadena ligera y pesada. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se identifican típicamente mediante la cadena en la que está ubicada la CDR particular. Por lo tanto, por ejemplo, una CDR3 de V_H está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas en una especie. La región marco de un anticuerpo, que es las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR y regiones marco pueden determinarse usando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, *por ejemplo*, Kabat, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT), y AbM (véase, *por ejemplo*, Johnson et al., *supra*; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments J. Mol. Biol. 227, 799-817; Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol 1997, 273(4)). También se describen definiciones de sitios de combinación con el antígeno en los siguientes documentos: Ruiz et al., IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics. Nucleic Acids Res., 28, 219-221 (2000); y Lefranc, M.-P. IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics. Nucleic Acids Res. 1 de enero; 29(1): 207-9 (2001); MacCallum et al, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, J. Mol. Biol., 262 (5), 732-745 (1996); y Martin et al, Proc. Natl Acad. Sci. Estados Unidos, 86, 9268-9272 (1989); Martin, et al, Methods Enzymol., 203, 121-153, (1991); Pedersen et al, Immunomethods, 1, 126, (1992); y Rees et al, en Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 1996).

"Epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden estar formados a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan

típicamente en exposición a disolventes desnaturalizantes mientras que los epítomos formados mediante plegamiento terciario se pierden típicamente en tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítomo típicamente incluye al menos 3 y, más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos de determinación de la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que se une a GM-CSF e impide la señalización por el receptor de GM-CSF, o inhibe la unión de GM-CSF a su receptor.

Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo quimérico" se refiere a una molécula de inmunoglobulina en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, es alterada, sustituida o intercambiada de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está enlazado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que otorga nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, es alterada, sustituida o intercambiada con una región variable, o parte de la misma, que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada; o con secuencias correspondientes de otras especies o de otra clase o subclase de anticuerpos.

Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula de inmunoglobulina en la que las CDR de un anticuerpo humano receptor son sustituidas por CDR de un anticuerpo donador. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos de origen donador en las secuencias marco. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. La humanización puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica (*por ejemplo*, Jones et al., Nature 321: 522-525; 1986; Riechmann et al., Nature 332: 323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536, 1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596, 1992; Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), incluyendo técnicas tales como anticuerpos "superhumanizantes" (Tan et al., J. Immunol. 169: 1119, 2002) y "acondicionamiento superficial" (*por ejemplo*, Staelens et al., Mol. Immunol. 43: 1243, 2006; y Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91: 969, 1994).

Un anticuerpo "humanizado" en el contexto de esta invención se refiere a un anticuerpo humano manipulado que tiene una especificidad de unión de un anticuerpo de referencia. Un anticuerpo "humanizado" para su uso en esta invención tiene una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Típicamente, un anticuerpo se "humaniza" uniéndose a una secuencia de ADN que codifica un determinante de especificidad de unión (BSD) a partir de la región CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo de referencia a la secuencia del segmento V_H humano y un BSD de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo de referencia a una secuencia del segmento V_L humano. Un "BSD" se refiere a una región CDR3-FR4, o una parte de esta región que media en la especificidad de unión. Un determinante de la especificidad de unión, por lo tanto, puede ser una CDR3-FR4, una CDR3, un determinante de especificidad de unión esencial mínima de una CDR3 (que se refiere a cualquier región más pequeña que la CDR3 que otorga especificidad de unión cuando está presente en la región V de un anticuerpo), el segmento D (con respecto a una región de cadena pesada), u otras regiones de CDR3-FR4 que otorgan la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia. Los métodos para humanización se proporcionan en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005025552 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060134098.

El término "heterólogo", cuando se usa en referencia a partes de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que normalmente no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias, por ejemplo, de genes no relacionados ordenados para componer un nuevo ácido nucleico funcional. Análogamente, una proteína heteróloga se referirá a menudo a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza.

El término "recombinante" cuando se usa en referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que, en caso contrario, se expresan de forma anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto. Por la expresión "ácido nucleico recombinante" en el presente documento se entiende ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. De esta manera, se consigue la unión de forma operativa de diferentes secuencias. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consideran ambos recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez que un ácido nucleico recombinante se ha preparado y reintroducido en una célula u organismo huésped, se replicará de forma no recombinante, es decir, usando la

maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de manipulaciones *in vitro*, sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente replicados de forma no recombinante, siguen siendo considerados recombinantes para los fines de la invención. Análogamente, una “proteína recombinante” es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se ha representado anteriormente.

La frase “se une específica (o selectivamente)” a un anticuerpo o “inmunorreactivo específica (o selectivamente) con”, cuando se refiere a una proteína o un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otros elementos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una secuencia proteica particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones requiere un anticuerpo que es seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, anticuerpos policlonales generados para una proteína particular, variantes polimórficas, alelos, ortólogos y variantes modificadas de forma conservativa, o variantes de corte y empalme, o partes de los mismos, pueden seleccionarse para obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con la proteína de GM-CSF y no con otras proteínas. Esta selección puede conseguirse sustrayendo anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con otras moléculas.

Tal como se usa en el presente documento, un “agente terapéutico para una enfermedad inflamatoria crónica” se refiere a un agente que, cuando se administra a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria crónica, en una dosis terapéuticamente eficaz, curará, o al menos detendrá parcialmente los síntomas de la enfermedad y complicaciones asociadas con la enfermedad.

25 I. INTRODUCCIÓN

La invención se refiere a administrar un anticuerpo anti-GM-CSF para el tratamiento de pacientes a los que se ha diagnosticado artritis reumatoide (AR). El paciente está sometido a tratamiento con metotrexato. El anticuerpo anti-GM-CSF y el metotrexato se administran en una cantidad que no induce neutropenia clínicamente significativa en la que el recuento absoluto de neutrófilos es menor de $0,5 \times 10^9/l$. Los anticuerpos anti-GM-CSF impiden la señalización que normalmente resulta de la unión de GM-CSF a su receptor relacionado.

Los anticuerpos anti-GM-CSF adecuados para su uso con la presente invención pueden ser monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados, humanipulados o humanos.

35 II. Pacientes

Los pacientes típicos a tratar con los anticuerpos anti-GM-CSF son aquellos que tienen AR que también están sometidos a tratamiento con metotrexato y que no han desarrollado neutropenia. Los pacientes son tratados con metotrexato de acuerdo con directrices clínicas establecidas y son tratados con dosis semanales de metotrexato en el intervalo de 7,5 a 25 mg de metotrexato por semana.

El metotrexato es estructuralmente similar al folato y puede unirse a los sitios activos de una serie de enzimas que normalmente usan folato como coenzima para la biosíntesis de los nucleótidos purídnicos y pirimidínicos precursores de ADN y para la interconversión de aminoácidos durante la biosíntesis de proteínas. El metotrexato compete con el cofactor de folato por sitios de unión de la enzima, inhibiendo de este modo la actividad enzimática.

En algunos casos, el metotrexato puede usarse en una terapia de combinación con uno o más análogos de metotrexato y/o otros compuestos antifolato y un anticuerpo anti-GM-CSF. El metotrexato se administra en una cantidad que no produce neutropenia. La cantidad es de 7,5, 10, 12,5, 15, 20 a 25 mg por semana. La cantidad de metotrexato administrado como agente antiinflamatorio es a menudo una cantidad que es de dos a tres órdenes logarítmicos inferior a las cantidades de metotrexato usadas en el tratamiento del cáncer.

Pueden usarse métodos bien conocidos en la técnica para determinar si un paciente es neutropénico. El recuento absoluto de neutrófilos (ANC) se usa para determinar si el paciente es neutropénico. Los pacientes no son considerados neutropénicos si los recuentos de neutrófilos y leucocitos (WBCC) están dentro del intervalo normal. Se entiende que el intervalo normal para neutrófilos está representado por un recuento de más de $1 \times 10^9/l$; se entiende que el intervalo normal para leucocitos está representado por un recuento mayor de $3,5 \times 10^9/l$. La neutropenia se considera clínicamente significativa si el ANC es menor de $0,5 \times 10^9/l$. Ninguna neutropenia clínicamente significativa es inducida en pacientes tratados usando el anticuerpo anti-GM-CSF de la presente invención. En cualquier caso, el tratamiento no causa ninguna neutropenia detectable.

En algunas realizaciones, un paciente que tiene AR activa es tratado con el anticuerpo anti-GM-CSF de la invención. La respuesta de un paciente con AR a una terapia y/o el avance de la enfermedad pueden evaluarse monitorizando cualquiera de los parámetros clínicos asociados con AR. Típicamente, un paciente que muestra una respuesta terapéutica al tratamiento es determinado mediante una serie de parámetros, incluyendo parámetros farmacológicos.

Por ejemplo, puede emplearse la valoración del *American College for Rheumatology* (ACR) para AR (ACR 20, ACR 50 y ACR 70). Los criterios de valoración compuestos del ACR para AR incluyen: rigidez matinal, recuento de articulaciones blandas, recuento de articulaciones hinchadas, evaluación del dolor del paciente, evaluación global del paciente, evaluación global del facultativo; velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR), niveles de proteína C reactiva (CRP) en plasma, y medición del factor reumatoide. Otros marcadores farmacodinámicos que pueden usarse para evaluar la respuesta del paciente incluyen evaluación de los niveles de neopterinina en sangre o en la orina, evaluación de los niveles de citoquinas proinflamatorias sistémicamente (en la sangre) o localmente (por ejemplo, en un sitio de inflamación localizado tal como una articulación). Las citoquinas proinflamatorias son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de citoquinas proinflamatorias que pueden usarse para evaluar la respuesta del paciente a la terapia de esta invención incluyen, aunque sin limitarse a, TNF- α , GM-CSF, Interleuquina-1, Interleuquina-6 e Interleuquinas-8 y -17.

La administración de anticuerpos anti-GM-CSF con metotrexato detiene al menos parcialmente el avance de la enfermedad o reduce los síntomas de la enfermedad (según lo evaluado mediante parámetros, tales como los parámetros ejemplares indicados anteriormente). Por lo tanto, la administración de un anticuerpo anti-GM-CSF y metotrexato puede reducir el avance de la erosión articular. El avance de la erosión articular puede evaluarse usando técnicas conocidas tales como autorradiografía para evaluar el hueso y el cartilago en las articulaciones.

III. Antagonistas de GM-CSF

Tal como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona anticuerpos anti-GM-CSF para tratar AR, administrando el anticuerpo anti-GM-CSF y metotrexato a un paciente que padece la enfermedad. Los anticuerpos anti-GM-CSF adecuados para su uso en la invención interfieren selectivamente en la inducción de señalización por el receptor de GM-CSF causando una reducción de la unión de GM-CSF al receptor.

Métodos de biología molecular general, incluyendo métodos de expresión, pueden encontrarse, *por ejemplo*, en manuales de instrucciones, tales como, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Current Protocols in Molecular Biology* (2006) John Wiley and Sons ISBN: 0-471-50338-X.

Pueden emplearse diversos sistemas de expresión de proteínas de base procarionota y/o eucariota para producir un anticuerpo para GM-CSF. Muchos de dichos sistemas están ampliamente disponibles de proveedores comerciales. Estos incluyen sistemas de expresión tanto procarionotas como eucariotas.

Anticuerpos para GM-CSF

El antagonista de GM-CSF es un anticuerpo que se une a GM-CSF. Los anticuerpos pueden generarse contra proteínas, o fragmentos, de GM-CSF, o producirse de forma recombinante. Los anticuerpos para GM-CSF de la invención pueden ser anticuerpos neutralizantes o pueden ser no neutralizantes que se unen a GM-CSF e incrementan la velocidad de aclaramiento *in vivo* de GM-CSF de modo que el nivel de GM-CSF en la circulación se reduce. A menudo, el anticuerpo para GM-CSF es un anticuerpo neutralizante.

Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia (por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory manual* (1988); *Methods in Immunology*). Pueden generarse anticuerpos policlonales en un mamífero mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. El agente inmunizante incluye una proteína de GM-CSF, *por ejemplo*, una proteína de GM-CSF humano o fragmento de la misma.

En algunas realizaciones, un anticuerpo para GM-CSF de la invención se purifica a partir de plasma humano. En dichas realizaciones, el anticuerpo para GM-CSF es, típicamente, un anticuerpo policlonal que se aísla de otros anticuerpos presentes en el plasma humano. Dicho procedimiento de aislamiento puede realizarse, *por ejemplo*, usando técnicas conocidas, tales como cromatografía de afinidad.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, es inmunizado típicamente con un agente inmunizante, tal como GM-CSF humano, para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. El agente inmunizante preferentemente incluye proteína de GM-CSF humano, fragmentos de la misma, o proteína de fusión de la misma.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole et al., y Boerner et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1): 86-95 (1991)). Análogamente, pueden prepararse anticuerpos humanos

introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, *por ejemplo*, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Después de la estimulación, se observa la producción de anticuerpo humano, que se asemeja estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reorganización de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, *por ejemplo*, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-GM-CSF son anticuerpos quiméricos o monoclonales humanizados. Tal como se ha indicado *supra*, las formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) de anticuerpo humano son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Un anticuerpo que se emplea en la invención puede estar en cualquier formato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo completo incluyendo una región constante, *por ejemplo*, una región constante humana, o puede ser un fragmento o derivado de un anticuerpo completo, por ejemplo, un Fd, un Fab, Fab', F(ab')₂, un scFv, un fragmento Fv, o un anticuerpo de dominio único, tal como un nanocuerpo o un anticuerpo de camélido. Dichos anticuerpos pueden, adicionalmente, ser manipulados de forma recombinante mediante métodos bien conocidos por expertos en la materia. Tal como se ha indicado anteriormente, dichos anticuerpos pueden producirse usando técnicas conocidas.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo es manipulado adicionalmente para reducir la inmunogenicidad, *por ejemplo*, de modo que el anticuerpo sea adecuado para repetir la administración. Los métodos para generar anticuerpos con inmunogenicidad reducida incluyen procedimientos de humanización/humanización y técnicas de modificación tales como desinmunización, en la que un anticuerpo es manipulado adicionalmente, *por ejemplo*, en una o más regiones marco, para eliminar epítopos de células T.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo humano manipulado que tiene una especificidad de unión de un anticuerpo de referencia, que puede obtenerse uniendo una secuencia de ADN que codifica un determinante de la especificidad de unión (BSD) de la región CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo de referencia a la secuencia del segmento VH humano y un BSD de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo de referencia a una secuencia del segmento VL humano. Los métodos para humanización se proporcionan en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20050255552 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060134098.

Un anticuerpo puede desinmunizarse además para eliminar uno o más epítopos de células T predichos de la región V de un anticuerpo. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en el documento WO 00/34317.

En algunas realizaciones, la región variable está compuesta por secuencias del gen V humanas. Por ejemplo, una secuencia de región variable puede tener al menos el 80% de identidad, o al menos el 85% de identidad, al menos el 90% de identidad, al menos el 95% de identidad, al menos el 96% de identidad, al menos el 97% de identidad, al menos el 98% de identidad o al menos el 99% de identidad, o más, con una secuencia del gen V de una línea germinal humana.

Un anticuerpo de la invención puede incluir una región constante humana. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada es, a menudo, una región constante de cadena gamma, por ejemplo, una región constante gamma-1, gamma-2, gamma-3 o gamma-4.

En algunas realizaciones, *por ejemplo*, cuando el anticuerpo es un fragmento, el anticuerpo puede estar conjugado a otra molécula, *por ejemplo*, para proporcionar una semivida prolongada *in vivo* tal como un polietilenglicol (pegilación) o albúmina de suero. Los ejemplos de PEGilación de fragmentos de anticuerpo se proporcionan en Knight et al (2004) *Platelets* 15: 409 (para abciximab); Pedley et al (1994) *Br. J. Cancer* 70: 1126 (para un anticuerpo anti-CEA) Chapman et al (1999) *Nature Biotech.* 17: 780.

Especificidad del anticuerpo

Un anticuerpo de la invención se une a GM-CSF. Pueden usarse cualquier número de técnicas para determinar la especificidad de unión del anticuerpo. Véase, *por ejemplo*, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica de un anticuerpo.

Un anticuerpo ejemplar adecuado para su uso con la presente invención es c19/2. En algunas realizaciones, se usa un anticuerpo monoclonal que compite por la unión al mismo epítipo que c19/2, o que se une al mismo epítipo que

c19/2. La capacidad de un anticuerpo particular de reconocer el mismo epítipo que otro anticuerpo se determina típicamente mediante la capacidad del primer anticuerpo para inhibir de forma competitiva la unión del segundo anticuerpo al antígeno. Puede usarse cualquiera de una serie de ensayos de unión competitiva para medir la competencia entre dos anticuerpos por el mismo antígeno. Por ejemplo, un ensayo ELISA en sándwich puede usarse para este fin. Esto se lleva a cabo usando un anticuerpo de captura para revestir la superficie de un pocillo. A continuación, se añade una concentración de subsaturación de antígeno marcado a la superficie de captura. Esta proteína se unirá al anticuerpo a través de una interacción específica anticuerpo:epítipo. Después de lavar, un segundo anticuerpo, que se ha unido covalentemente a un resto detectable (por ejemplo, HRP, con el anticuerpo marcado estando definido como el anticuerpo de detección) se añade al ELISA. Si este anticuerpo reconoce al mismo epítipo que el anticuerpo de captura, será incapaz de unirse a la proteína diana, dado que ese epítipo particular ya no estará disponible para la unión. Si, sin embargo, este segundo anticuerpo reconoce un epítipo diferente en la proteína diana, será capaz de unirse y esta unión puede detectarse cuantificando el nivel de actividad (y, por lo tanto, el anticuerpo unido) usando un sustrato relevante. El fondo se define usando un único anticuerpo como anticuerpo tanto de captura como de detección, mientras que la señal máxima puede establecerse capturando con un anticuerpo específico del antígeno y detectando con un anticuerpo para la marca en el antígeno. Usando las señales de fondo y máxima como referencias, pueden evaluarse anticuerpos por parejas para determinar la especificidad por un epítipo.

Se considera que un primer anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un segundo anticuerpo, si la unión del segundo anticuerpo al antígeno se reduce en al menos el 30%, habitualmente al menos aproximadamente el 40%, 50%, 60% o 75%, y a menudo en al menos aproximadamente el 90%, en presencia del primer anticuerpo usando cualquiera de los ensayos descrito anteriormente.

Mapeo epítipo

En algunas realizaciones de la invención, se emplea un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo conocido, *por ejemplo*, c19/2. En la técnica se conocen bien métodos de mapeo de epítipos. Por ejemplo, una estrategia para la localización de regiones funcionalmente activas del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF) es mapear los epítipos reconocidos neutralizando anticuerpos monoclonales anti-hGM-CSF. Por ejemplo, el epítipo al que se une c19/2 (que tiene las mismas regiones variables que el anticuerpo neutralizante LMM102) se ha definido usando fragmentos proteolíticos obtenidos mediante digestión enzimática de hGM-CSF sintetizado con bacterias (Dempsey, et al., *Hybridoma* 9: 545-558, 1990). El fraccionamiento por RP-HPLC de un digesto triptico dio como resultado la identificación de un péptido "núcleo triptico" inmunorreactivo que contiene 66 aminoácidos (el 52% de la proteína). La digestión adicional de este "núcleo triptico" con proteasa V8 de *S. aureus* produjo un único producto de hGM-CSF inmunorreactivo que comprendía dos péptidos, residuos 86-93 y 112-127, enlazados por un puente disulfuro entre los residuos 88 y 121. Los péptidos individuales, no fueron reconocidos por el anticuerpo.

Determinación de la afinidad de unión

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención tienen una unión de alta afinidad por el GM-CSF humano. La unión de alta afinidad entre un anticuerpo y un antígeno existe si la constante de disociación (K_D) del anticuerpo es < 1 nM y, preferentemente, < 100 pM. Pueden usarse diversos métodos para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo por su antígeno diana tal como ensayos de resonancia del plasmón superficial, ensayos de saturación, o inmunoensayos tales como ELISA o RIA, tal como son bien conocidos por expertos en la materia. Un método ejemplar para determinar la afinidad de unión es mediante análisis de resonancia del plasmón superficial en un instrumento BIAcore™ 2000 (Biacore AB, Friburgo, Alemania) usando chips sensores CM5, tal como describen Krinner et al., (2007) *Mol. Immunol. Feb*; 44(5): 916-25. (Epub del 11 de mayo de 2006)).

Ensayo de proliferación celular para identificar anticuerpos neutralizantes

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-GM-CSF son anticuerpos neutralizantes, que se unen de una manera que interfiere en la unión de GM-CSF. Los anticuerpos neutralizantes y otros antagonistas de GM-CSF pueden identificarse usando cualquier número de ensayos que evalúen la función de GM-CSF. Por ejemplo, ensayos a base de células para señalización del receptor de GM-CSF, tales como ensayos que determinan la velocidad de proliferación de una línea celular dependiente de GM-CSF en respuesta a una cantidad limitante de GM-CSF, se usan convenientemente. La línea celular TF-1 humana es adecuada para su uso en dicho ensayo. Véase, Krinner et al., (2007) *Mol. Immunol.* En algunas realizaciones, los anticuerpos neutralizantes de la invención inhiben la proliferación de células TF-1 estimuladas por GM-CSF en al menos el 50% cuando se usa una concentración de GM-CSF que estimula el 90% de la proliferación máxima de células TF-1. En otras realizaciones, los anticuerpos neutralizantes inhiben la proliferación estimulada por GM-CSF en al menos el 90%. Por lo tanto, típicamente, un anticuerpo neutralizante de la invención, tiene una CE_{50} de menos de 10 nM (*por ejemplo*, Tabla 1). Ensayos adicionales adecuados para su uso en la identificación de anticuerpos neutralizantes adecuados para su uso con la presente invención serán bien conocidos por los expertos en la materia.

Anticuerpos ejemplares

Los anticuerpos para su uso en la invención son conocidos en la técnica y pueden producirse usando técnicas rutinarias. Se describen anticuerpos ejemplares. Se entiende que los anticuerpos ejemplares pueden manipularse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica y resumidos en el presente documento para producir fragmentos de anticuerpo, quimeras y similares mediante tecnología química o recombinante.

Un anticuerpo quimérico ejemplar adecuado para su uso como antagonista de GM-CSF es c19/2. El anticuerpo c/19/2 se une a GM-CSF con una afinidad de unión monovalente de aproximadamente 10 pM según lo determinado mediante análisis de resonancia del plasmón superficial. Las SEC ID N° 1 y 2 muestran la secuencia de la región variable de cadena pesada y ligera de c19/2 (por ejemplo, WO03/068920). Las CDR, tal como se definen de acuerdo con Kabat, son:

CDRH1	DYNIH
CDRH2	YIAPYSGGTGYNQEFKN
CDRH3	RDRFPYYFDY
CDRL1	KASQNVGSNVA
CDRL2	SASYRSG
CDRL3	QQFNRSPLT.

Las CDR también pueden determinarse usando otras definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y AbM.

En algunas realizaciones, un anticuerpo usado en la invención compite por la unión a, o se une a, el mismo epítipo que c19/2. El epítipo de GM-CSF reconocido por c19/2 se ha identificado como un producto que tiene dos péptidos, residuos 86-93 y residuos 112-127, enlazados por un puente disulfuro entre los residuos 88 y 121. El anticuerpo c19/2 inhibe la proliferación dependiente de GM-CSF de una línea celular TF-1 de leucemia humana con una CE₅₀ de 30 pM cuando las células son estimuladas con 0,5 ng/ml de GM-CSF. En algunas realizaciones, el anticuerpo usado en la invención se une al mismo epítipo que c19/2.

Un anticuerpo para administración, tal como c19/2, puede manipularse adicionalmente. Por ejemplo, el anticuerpo c19/2 puede manipularse adicionalmente para contener segmentos del gen V humano.

Otro anticuerpo anti-GM-CSF neutralizante ejemplar es el anticuerpo E10 descrito en Li et al., (2006) PNAS 103(10): 3557-3562. E10 es un anticuerpo de clase IgG que tiene una afinidad de unión de 870 pM por GM-CSF. El anticuerpo es específico para unión a GM-CSF humano tal como se muestra en un ensayo ELISA, y muestra una potente actividad neutralizante según lo evaluado con un ensayo de proliferación de células TF1.

Un anticuerpo anti-GM-CSF neutralizante ejemplar adicional es el anticuerpo MT203 descrito por Krinner et al., (Mol Immunol. 44: 916-25, 2007; Epub 11 de mayo de 2006). MT203 es un anticuerpo de clase IgG1 que se une a GM-CSF con afinidad picomolar. El anticuerpo muestra potente actividad inhibitora según lo evaluado mediante ensayo de proliferación de células TF-1 y su capacidad para bloquear la producción de IL-8 en células U937.

Anticuerpos adicionales adecuados para su uso con la presente invención serán conocidos por los expertos en la materia.

III. Administración terapéutica

La invención típicamente posibilita administrar metotrexato y un anticuerpo anti-GM-CSF como una composición farmacéutica a un paciente que tiene AR en una cantidad terapéuticamente eficaz usando un régimen de dosificación adecuado para el tratamiento de la enfermedad.

Los pacientes que padecen AR son tratados con metotrexato a una dosis semanal de hasta aproximadamente 25 mg y un anticuerpo específico para GM-CSF, a una dosis que no induce neutropenia clínicamente significativa y conduce a una mejora en uno o más marcadores de inflamación. En algunas realizaciones, la respuesta del paciente al tratamiento se determina mostrando una reducción significativa de la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) a dentro del intervalo normal. El intervalo de ESR normal depende de la edad y del género. Para hombres, la ESR normal puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula: 0,5 x (edad en años). Para mujeres, la ESR normal puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula: 0,5 x (edad en años +10) (Wallach J. Interpretation of Laboratory Tests, 6ª Edición. Little Brown and Company. 1996).

La composición puede formularse para su uso en diversos sistemas de administración de fármacos. Uno o más excipientes o vehículos fisiológicamente aceptables también pueden estar incluidos en las composiciones para formulación apropiada. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Para una breve a revisión de métodos para administración de fármacos, véase, Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

El anticuerpo anti-GM-CSF de la invención se proporciona en una solución adecuada para inyección al paciente tal como una solución acuosa isotónica estéril para inyección. El anticuerpo anti-GM-CSF se disuelve o se suspende a una concentración adecuada en un vehículo aceptable. En algunas realizaciones el vehículo es acuoso, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, y similares. Las composiciones pueden contener sustancias farmacéuticas auxiliares según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, y similares.

Las composiciones farmacéuticas son administradas a un paciente que padece AR en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad o síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”. Una dosis terapéuticamente eficaz se determina monitorizando la respuesta de un paciente a la terapia. Puntos de referencia típicos indicativos de una dosis terapéuticamente eficaz se conocen en la técnica. Para AR, los puntos de referencia incluyen niveles en plasma de CRP, ESR, niveles en sangre u orina de neopterin, niveles de citoquinas proinflamatorias (*por ejemplo*, TNF- α , GM-CSF, Interleuquina-1, Interleuquina-6 e Interleuquinas 8 y 17) o cambios de los niveles de otros marcadores farmacodinámicos. Otros criterios para evaluar una respuesta terapéutica también pueden usarse, *por ejemplo*, evaluando el número y/o la gravedad de blandura e hinchazón de las articulaciones, los niveles de dolor, y similares.

Las cantidades que se administran que son eficaces dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente, incluyendo otros factores tales como edad, peso, género, vía de administración, etc. Pueden administrarse administraciones individuales o múltiples del anticuerpo, dependiendo de la dosificación y la frecuencia según se requiera y sea tolerado por el paciente. En cualquier caso, los métodos proporcionan una cantidad suficiente de anticuerpo anti-GM-CSF junto con metotrexato para tratar eficazmente al paciente.

En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-GM-CSF usado para tratar AR se proporciona en terapia de combinación con metotrexato y uno o más agentes adicionales, *por ejemplo*, un agente antiinflamatorio no esteroideo. Por lo tanto, los pacientes pueden recibir terapias adicionales para tratar su enfermedad. Dichas terapias incluyen, aunque sin limitarse a, hidroxiclороquinona, sulfasalazina, oro, minociclina, leflunomida, corticoesteroides, antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept, infliximab o adalimumab), antagonistas de IL-1 (por ejemplo, como anakinra) o anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, rituximab). Los pacientes pueden recibir uno o más de estos agentes terapéuticos adicionales como terapia concomitante. Como alternativa, los pacientes pueden ser tratados secuencialmente con agentes terapéuticos adicionales.

A. Administración

La invención proporciona un anticuerpo anti-GM-CSF para el tratamiento de pacientes con AR administrando el anticuerpo en combinación con metotrexato. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF se administra mediante inyección o infusión a través de cualquier vía adecuada incluyendo, aunque sin limitarse a, vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En una realización ejemplar, el anticuerpo anti-GM-CSF se diluye en una solución salina fisiológica para inyección antes de la administración al paciente. Dicho anticuerpo se administra, por ejemplo, mediante infusión intravenosa durante un periodo de entre 15 minutos y 2 horas. En otras realizaciones más, el procedimiento de administración es mediante inyección subcutánea o intramuscular.

El anticuerpo anti-GM-CSF se administra mientras el paciente está siendo tratado con metotrexato. En el contexto de esta invención, un paciente “que está siendo tratado con metotrexato” o “sometido a tratamiento con metotrexato” significa un paciente al que se le ha prescrito metotrexato y, por lo tanto, está recibiendo, o ha recibido recientemente, una dosis de metotrexato. Típicamente, el metotrexato se toma una vez a la semana. Por lo tanto, por ejemplo, un anticuerpo anti-GM-CSF puede administrarse en cualquier periodo de tiempo durante la semana entre dosis. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF puede administrarse después de que un paciente ha recibido una dosis de metotrexato, pero aún no ha tomado la siguiente dosis, por ejemplo, a lo largo de una semana después de la última dosis de metotrexato. Se sigue considerando que dicho paciente está sometido a tratamiento con metotrexato si la terapia de metotrexato sigue estando prescrita para el paciente.

B. Dosificación

La dosis de anticuerpo anti-GM-CSF se selecciona para proporcionar terapia eficaz para un paciente que tiene AR. La dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 g por paciente. La dosis está a menudo en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg/paciente. La dosis puede repetirse a una frecuencia apropiada que puede estar en el intervalo de una vez al día a una vez cada tres meses, dependiendo de la farmacocinética de los antagonistas (por ejemplo semivida del anticuerpo en la circulación) y la respuesta farmacodinámica (por ejemplo la duración del efecto terapéutico del anticuerpo). En algunas realizaciones, la semivida *in vivo* de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 25 días y la dosificación de anticuerpo se repite entre una vez a la semana y una vez cada 3 meses. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra aproximadamente una vez al mes.

Los protocolos de tratamiento y la dosis para administrar metotrexato se conocen en la técnica. Por ejemplo, recomendaciones para la dosificación de metotrexato en AR, tales como las directrices de la *British Society for Rheumatology* (julio de 2000) son 7,5 mg de metotrexato semanalmente, incrementando en 2,5 mg cada seis meses hasta una dosis máxima semanal de 25 mg.

5 El metotrexato y el anticuerpo anti-GM-CSF se administran en un intervalo que no induce neutropenia detectable. Por ejemplo, los pacientes reciben metotrexato a una dosis de hasta aproximadamente 25 mg/semana y de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 mg/kg de anticuerpo anti-GM-CSF.

10 Ejemplos

Ejemplo 1 - Anticuerpos humanipulados ejemplares para GM-CSF

15 Un panel de moléculas Fab' humanipuladas con la especificidad de c19/2 se generaron a partir de bibliotecas de segmentos V humanos enfocados en el epítipo tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 20060134098.

20 Los fragmentos Fab' se expresaron a partir de *E. coli*. Las células se cultivaron en medio 2xYT hasta una DO600 de 0,6. La expresión se indujo usando IPTG durante 3 horas a 33°C. El Fab' ensamblado se obtuvo a partir de fracciones periplasmáticas y se purificó mediante cromatografía de afinidad usando la Proteína G de estreptococos (columnas HiTrap Protein G HP; GE Healthcare) de acuerdo con métodos convencionales. Los Fab' se eluyeron en tampón a pH 2,0, se ajustaron inmediatamente a pH 7,0 y se dializaron contra PBS a pH 7,4.

25 Las cinéticas de unión se analizaron mediante resonancia del plasmón superficial (SPR) Biacore 3000. El antígeno de GM-CSF humano recombinante se biotiniló y se inmovilizó sobre un chip sensor de estreptavidina CM5. Las muestras de Fab se diluyeron a una concentración de partida de 3 nM y se sometieron a una serie de dilución de 3 veces. Los ensayos se realizaron en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 0,1 mg/ml de BSA y p20 al 0,005% a pH 7,4 y 37°C. Cada concentración se ensayó dos veces. Los ensayos de unión de Fab' se realizaron en dos superficies de densidad antigénica proporcionando conjuntos de datos por duplicado. La afinidad media (K_D) para cada uno de 6 clones de Fab anti-GM-CSF humanipulados, calculada usando un modelo de unión de Langmuir 1:1, se muestra en la tabla 1.

35 Se ensayó la neutralización de GM-CSF de los Fab usando un ensayo de proliferación de células TF-1. La proliferación dependiente de GM-CSF de células TF-1 humanas se midió después de la incubación durante 4 días con 0,5 ng/ml de GM-CSF usando un ensayo MTS (Cell titer 96, Promega) para determinar las células viables. Todos los Fab inhibían la proliferación celular en este ensayo indicando que estos son anticuerpos neutralizantes. Existe una buena correlación entre afinidades relativas de los Fab anti-GM-CSF y la CE_{50} en el ensayo a base de células. Los anticuerpos anti-GM-CSF con afinidades monovalentes en el intervalo de 18 pM - 104 pM demuestran neutralización eficaz de GM-CSF en el ensayo basado en células.

40 Tabla 1: Afinidad de Fab anti-GM-CSF determinada mediante análisis de resonancia del plasmón superficial en comparación con actividad (CE_{50}) en un ensayo de proliferación de células TF-1 dependiente de GM-CSF

Fab	Afinidad de unión monovalente determinada mediante SPR (pM)	CE_{50} (pM) en el ensayo de proliferación de células TF-1
94	18	165
104	19	239
77	29	404
92	58	539
42	104	3200
44	81	7000

Ejemplo 2 - Protocolo clínico ejemplar para la administración de un anticuerpo anti-GM-CSF

45 Un anticuerpo anti-GM-CSF se almacena a 10 mg/ml en solución salina acuosa isotónica estéril para inyección a 4°C y se diluye en 100 ml o 200 ml de cloruro sódico al 0,9% para inyección antes de la administración al paciente. El anticuerpo se administra a un paciente que tiene AR mediante infusión intravenosa en el transcurso de 1 hora a una dosis de entre 0,2 y 10 mg/kg.

50 Los pacientes para inclusión en este protocolo de tratamiento se seleccionan en base a los siguientes criterios: los pacientes muestran signos de AR activa, los pacientes están recibiendo actualmente tratamiento con metotrexato donde los pacientes han estado recibiendo dosis estables de FARME durante al menos 6 semanas. Además, los pacientes incluidos en este estudio muestran los siguientes síntomas: recuento de articulaciones hinchadas de al menos 6 (usando un recuento de 66 articulaciones), recuento de articulaciones blandas de al menos 6 (usando un

55

recuento de 68 articulaciones). Al menos dos de los siguientes criterios también están incluidos en los criterios de inclusión: ESR \geq 20 mm/h, CRP \geq 15 mg/l, rigidez matinal temprana de \geq 45 minutos.

5 Los pacientes reciben placebo (cloruro sódico al 0,9% para inyección) o anticuerpo anti-GM-CSF mediante infusión intravenosa el día 1 a una de las siguientes dosis: 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg. Los pacientes son monitorizados durante 29 días. Todos los pacientes siguen recibiendo FARME, metotrexato a una dosis de hasta 25 mg/semana, prednisolona hasta 10 mg/día y FAINE, según sea clínicamente apropiado junto con medicación para cualesquiera otras afecciones médicas. Durante toda la duración del estudio, se realizan los siguientes ensayos como evaluación de la seguridad del estudio: examen físico, medición de los signos vitales, electrocardiograma con 10 12 derivaciones (ECG), pruebas de laboratorio incluyendo hematología, bioquímica y análisis de orina, pruebas de la función pulmonar e incontinencia e intensidad de acontecimientos adversos (AE)

15 La eficacia del tratamiento se evalúa en dos fases. La evaluación primaria implica una respuesta de ACR 20 en cualquier momento antes de o el día 29 de tratamiento. La evaluación secundaria incluye medir el tiempo hasta ACR 20, la proporción de pacientes que alcanzan una respuesta de ACR 50 y 70 y la ESR y CRP medidas los días 8, 15 y 29.

20 Los acontecimientos adversos, acontecimientos adversos graves y anomalías de laboratorio se tabulan por grupo de tratamiento y se comparan con los del grupo de placebo reunido. La eficacia del anticuerpo anti-GM-CSF se analiza calculando las respuestas de ACR 20/50/70 para la pretensión a tratar usando un procedimiento de ensayo cerrado. Los grupos activos reunidos se comparan con los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 3 - Tratamiento de un paciente con metotrexato y anticuerpo anti-GM-CSF

25 Un paciente que tiene AR activa se trató con metotrexato y un anticuerpo anti-GM-CSF de acuerdo con el protocolo clínico descrito en el ejemplo 2. El paciente recibió 0,2 mg/kg de anticuerpo anti-GM-CSF. El paciente también estaba sometido a tratamiento con 25 mg/semana de metotrexato.

30 Se determinaron los hemogramas mediante métodos convencionales y incluían determinación de los números de: hemoglobina (HGB); leucocitos totales (WBCC); plaquetas (PLT); neutrófilos (Neut; también llamado recuento absoluto de neutrófilos ANC); linfocitos (LYMPH); monocitos (MONO); eosinófilos (EOSIN); basófilos (BASO), hematocrito (HCT). Además, se determinaron la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR), la proteína C reactiva (CRP). Los hemogramas, ESR y CRP antes del tratamiento y hasta dos semanas después del tratamiento se muestran en la Tabla 2. Tal como puede verse, después de dos semanas, la ESR caía desde un valor anormal de 35 40 a 18, que está dentro del intervalo normal para un individuo del mismo sexo y la misma edad que el paciente tratado, mientras que el recuento de neutrófilos permanecía sin cambios. Por consiguiente, una terapia de combinación que comprende tratamiento con metotrexato y tratamiento con un antagonista anti-GM-CSF, en este caso un anticuerpo anti-GM-CSF, proporcionaba un beneficio terapéutico para el tratamiento de artritis reumatoide.

40 El día "1" en la tabla 2 indica cuándo se administró el antagonista anti-GM-CSF. El paciente había sido tratado previamente con metotrexato y continuaba recibiendo tratamiento con metotrexato con el tratamiento con el antagonista anti-GM-CSF.

45 Tabla 2. Hemogramas y ESR de un paciente tratado con dosis semanales de metotrexato y al que se le administra una única dosis de anticuerpo anti-GM-CSF el Día 1. Los números de las diversas células (plaquetas, neutrófilos, linfocitos, etc.) son en $\times 10^9/l$. La ESR se expresa en mm/h.

Días post- tratamiento	HGB	WBCC	PLT	NEUT	LYMPH	HCT	MONO	EOSIN	BASE	ESR
-2	133	5,0	202	3,04	1,26	0,4	0,52	0,16	0,02	40
1	127	4,4	208	2,64	1,23	0,38	0,36	0,15	0,03	
8	129	5,4	189	3,01	1,41	0,39	0,76	0,17	0,04	23
15	131	4,8	193	2,76	1,39	0,39	0,46	0,15	0,04	18
28	130	5,0	180	2,79	1,71	0,4	0,25	0,21	0,04	20

50 Los ejemplos anteriores se proporcionan a modo de ilustración solamente y no a modo de limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente diversos parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para dar resultados esencialmente similares.

ES 2 432 173 T3

Secuencias ejemplares

SEC ID N° 1: secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada de 19/2 murino

Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu
Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser

5

SEC ID N° 2: secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera de 19/2 murino

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln
Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro
Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly
Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
Ser Ser Lys Gly Glu Phe

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-GM-CSF para su uso para reducir los síntomas de artritis reumatoide en un paciente sometido a tratamiento con metotrexato sin inducir neutropenia clínicamente significativa, en el que el recuento absoluto de neutrófilos es menor de $0,5 \times 10^9/l$, donde el anticuerpo anti-GM-CSF es un antagonista de GM-CSF, donde el metotrexato se proporciona en una cantidad de 7,5 mg a 25 mg/semana y donde el anticuerpo anti-GM-CSF se proporciona en una cantidad de 0,1 a 25 mg/kg.
2. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo
- (a) es un anticuerpo policlonal;
 - (b) es un anticuerpo monoclonal;
 - (c) es un fragmento de anticuerpo que es un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$, un scFv o un dAB;
 - (d) es un anticuerpo de alta afinidad que tiene una K_D para unión a GM-CSF humano de menos de 100 pM;
 - (e) es un anticuerpo neutralizante;
 - (f) es un anticuerpo recombinante;
 - (g) es un anticuerpo quimérico;
 - (h) es un anticuerpo humano;
 - (i) comprende una región variable humana;
 - (j) comprende una región constante de cadena ligera humana;
 - (k) comprende una región constante de cadena pesada humana;
 - (l) se une al mismo epítipo que el 19/2 quimérico;
 - (m) comprende las regiones V_H y V_L de 19/2 quimérico;
 - (n) comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región V_H y la región V_L de 19/2 quimérico; o
 - (o) comprende la CDR3 de la región V_H y la CDR3 de la región V_L de 19/2 quimérico.
3. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y, opcionalmente, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo recombinante.
4. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el anticuerpo es humanizado.
5. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal neutralizante que se une al mismo epítipo que 19/2 quimérico.
6. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el anticuerpo tiene una K_D que varía entre aproximadamente 5 pM y aproximadamente 50 pM.
7. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el anticuerpo tiene una K_D de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 30 pM.
8. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal recombinante neutralizante que se une al mismo epítipo que 19/2 quimérico y tiene una K_D de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 30 pM.
9. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que es un Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv o dAB y está conjugado a polietilenglicol.
10. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana gamma, opcionalmente una región gamma 1.
11. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende las regiones V_H y V_L de 19/2 quimérico y una región constante de cadena pesada humana.
12. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde la región constante de cadena pesada humana es una región gamma, opcionalmente una región gamma 1.
13. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo anti-GM-CSF comprende un Fab' humanizado con la especificidad de unión de 19/2 quimérico y tiene una K_D que varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 pM.
14. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo se administra por vía subcutánea o por vía intravenosa.
15. El anticuerpo anti-GM-CSF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo se proporciona en una cantidad de 0,2 a 10 mg/kg.

16. Uso de un anticuerpo anti-GM-CSF para la preparación de un medicamento para reducir los síntomas de artritis reumatoide en un paciente sometido a tratamiento con metotrexato sin inducir neutropenia clínicamente significativa, en el que el recuento absoluto de neutrófilos es menor de $0,5 \times 10^9/l$, donde el anticuerpo anti-GM-CSF es un antagonista, donde el anticuerpo anti-GM-CSF se proporciona en una cantidad de 0,1 a 25 mg/kg y donde el metotrexato se proporciona en una cantidad de 7,5 mg a 25 mg/semana.
- 5