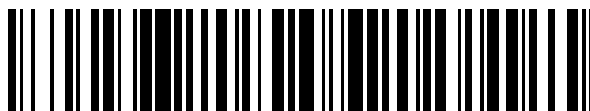


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 872**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10824210 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2488202**

54 Título: **Agentes terapéuticos de anticuerpos con actividad local en el tracto digestivo**

30 Prioridad:

15.10.2009 US 251996 P

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

09.10.2015

73 Titular/es:

**AVAXIA BIOLOGICS, INC. (100.0%)
128 Spring Street, Suite 620
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**FOX, BARBARA S. y
STAFFORD, DOUGLAS C.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 547 872 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

Agentes terapéuticos de anticuerpos con actividad local en el tracto digestivo

5 Antecedentes de la invención

Los agentes terapéuticos de anticuerpos han resultado ser agentes farmacéuticos valiosos. Sin embargo, a menudo su uso está limitado por efectos secundarios debidos a la actividad del anticuerpo en sitios de todo el cuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para el TNF (Remicade, Humira, Cimzia) son eficaces en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino. Sin embargo, su uso está asociado con un mayor riesgo de malignidad y un mayor riesgo de infecciones graves (Bongartz *et al.*, 2006, JAMA, 295, 2275-85), probablemente debido a una inmunosupresión sistémica. Por lo tanto, existe la necesidad de generar métodos y composiciones farmacéuticas de agentes terapéuticos de anticuerpos que sean capaces de dirigir el anticuerpo a la localización en la que sea mayor el efecto clínico beneficioso al mismo tiempo que se minimiza la actividad del anticuerpo en otros sitios. Más particularmente, existe la necesidad de generar métodos y composiciones farmacéuticas de agentes terapéuticos de anticuerpos que sean capaces de dirigir el anticuerpo al tracto digestivo para el tratamiento de enfermedades del tracto digestivo, y de minimizar al mismo tiempo la actividad del anticuerpo en otros sitios.

El uso de agentes terapéuticos de anticuerpos también está limitado a menudo por la inmunogenicidad del anticuerpo administrado. La inducción de anticuerpos contra el agente terapéutico está asociada con una pérdida de actividad y con la posibilidad de que se produzcan reacciones adversas a la infusión. La inmunogenicidad se observa más claramente en casos en los que el anticuerpo procede de una especie no humana. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de respuestas de anticuerpos humanos anti-humanos (HABA) y estas son la causa de una preocupación clínica significativa (Ritter *et al.*, 2001, Cancer Res, 61, 6851-9; Tracey *et al.*, 2008, Pharmacol Ther, 117, 244-79). Por lo tanto, existe la necesidad de generar métodos y composiciones farmacéuticas de agentes terapéuticos de anticuerpos que puedan minimizar la inmunogenicidad y mantener al mismo tiempo la eficacia.

En el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, los pacientes tratados con anticuerpos anti-TNF administrados por vía sistémica a menudo dejan de responder a la terapia de anticuerpos debido a la inducción de anticuerpos neutralizadores (Tracey *et al.*, 2008, Pharmacol Ther, 117, 244-79). Existe la necesidad de generar métodos y composiciones farmacéuticas que puedan usarse para tratar a pacientes que han dejado de responder a agentes terapéuticos de anticuerpos anti-TNF existentes.

El documento WO2009/04616 desvela el uso de anticuerpos policlonales anti-TNF procedentes de ganado bovino para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino.

Sumario de la invención.

Un anticuerpo policlonal anti-TNF procedente de leche o calostro para su uso en un método para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente, donde, después de la administración del anticuerpo policlonal anti-TNF en el tracto digestivo del paciente, el nivel máximo de anticuerpo policlonal anti-TNF en el suero del paciente, medido por ELISA, es menor de 500 ng/ml.

Breve descripción de las figuras.

La Figura 1 es un gráfico que muestra la puntuación por endoscopia después de la administración oral de diversas dosificaciones de anticuerpo anti-TNF, AVX-470, en comparación con el control, en un modelo de ratón de enfermedad inflamatoria del intestino.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la curva patrón de un ensayo ELISA para la detección de los niveles en suero de anticuerpo inmunoglobulina bovina.

La Figura 3 es una micrografía de secciones teñidas de abazón de hámster, que demuestra que podría detectarse inmunoglobulina bovina en el abazón izquierdo irradiado (panel A), pero solo se encontró en la cara exterior del abazón derecho no irradiado (panel B).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la supervivencia (como %) de ratones con síndrome GI de radiación aguda después del tratamiento con anticuerpo anti-TNF por vía oral.

La Figura 5 es una micrografía de secciones teñidas de la lámina propia del yeyuno de ratones con síndrome GI de radiación aguda después de la administración del anticuerpo anti-TNF por vía oral.

Descripción detallada de la invención.

Para los fines de la invención, el "tracto digestivo" consiste en la boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), intestino grueso (ciego, colon, recto) y ano. Para los fines de la invención, se entiende que

la "cavidad oral" incluye la boca, la faringe y el esófago. Para los fines de la invención, se entiende que el "tracto gastrointestinal" o "tracto GI" incluye el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), el intestino grueso (ciego, colon, recto) y el ano.

5 Los niveles séricos de anticuerpos anti-TNF, por ejemplo, asociados con efectos clínicos beneficiosos son concentraciones por encima de 0,5 µg/ml (Nestorov, 2005, J Rheumatol Suppl, 74, 13-8; Tracey *et al.*, 2008, Pharmacol Ther, 117, 244-79). Aunque no se conocen de forma precisa los niveles séricos de anticuerpo anti-TNF asociados con acontecimientos adversos, se cree que son mayores que los niveles necesarios para conseguir un efecto clínico beneficioso (Nestorov, 2005, J Rheumatol Suppl, 74, 13-8). De esta manera, en comparación con los antagonistas de TNF parenterales existentes, las composiciones terapéuticas y métodos de la presente invención están asociados con una reducción de la inmunosupresión sistémica, una reducción de la distribución sistémica, una reducción de la inmunogenicidad, una reducción de la taquifilaxis (causada por la inducción de anticuerpos neutralizadores o por otro mecanismo) y una reducción de los efectos secundarios (por ejemplo, reacciones a la infusión).

15 Las composiciones de anticuerpo terapéutico descritas en el presente documento minimizan la actividad del anticuerpo terapéutico fuera del tracto digestivo y minimizan además la inducción de una respuesta inmunitaria neutralizadora contra el anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos se administran tópicamente en la cara luminal del tracto digestivo. Los anticuerpos pueden administrarse tópicamente en el tracto digestivo, por ejemplo, mediante administración oral o administración rectal y la administración incluye todas las formas de administración en la cavidad oral tales como películas mucoadhesivas bucales y similares. Los anticuerpos pueden atravesar la barrera mucosa del tracto digestivo para entrar en el espacio submucoso e interactuar con sus dianas, pero no entran en la circulación sistémica. El uso de anticuerpos incluye el uso de anticuerpos dirigidos a dianas biológicas expresadas en o cerca de la superficie luminal del tracto digestivo así como debajo de la barrera mucosa, tal como en el lado basal del epitelio, dianas expresadas en la submucosa, dianas expresadas en el espacio intercelular lateral y dianas expresadas en la lámina propia.

25 En una realización de la presente invención, los anticuerpos de la invención atraviesan la barrera mucosa como resultado de las lesiones preexistentes en la barrera mucosa. En sujetos sanos, el tracto digestivo normalmente es relativamente impermeable a las proteínas aplicadas en la cara luminal. Sin embargo, en muchas patologías, el tracto digestivo presenta una mayor permeabilidad (McGuckin *et al.*, 2009, Inflamm Bowel Dis, 15, 100-13). Esta mayor permeabilidad permite que el anticuerpo aplicado en la cara luminal del conducto digestivo atraviese la barrera mucosa (Worledge *et al.*, 2000, Dig Dis Sci, 45, 2298-2305).

30 En una realización de la presente invención, los anticuerpos de la invención atraviesan la barrera mucosa como resultado de aspectos específicos de la formulación que facilitan el tránsito del anticuerpo a través de la barrera mucosa. Se dispone de potenciadores de la infiltración, incluyendo quitosano, poli L-arginina y Carbopol.

35 Los pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, conocidas colectivamente en la técnica como enfermedades inflamatorias del intestino, con frecuencia se tratan con anticuerpos dirigidos contra la citocina inflamatoria TNF. En estos pacientes, existe una correlación entre el efecto clínico beneficioso conseguido por el anticuerpo y las concentraciones mínimas en suero del anticuerpo anti-TNF administrado (Seow *et al.*, Gut., 1/2010; 59(1): 49-54) (Karmiris *et al.*, 11/2009, Gastroenterology; 137(5): 1628-40). Estos datos indican que tiene que obtenerse una cierta concentración de anticuerpo en el suero para que el anticuerpo sea eficaz en el tratamiento de la inflamación digestiva.

40 Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que, inesperadamente, el tratamiento local de la inflamación digestiva usando anticuerpos de acuerdo con la invención es terapéuticamente eficaz. Dicha aplicación local o tópica puede conseguirse mediante la administración tópica de un anticuerpo, tal como mediante administración oral o rectal. La expresión "aplicación tópica" en el tracto digestivo se define como la administración local y/o en la superficie de la cavidad oral, la liberación mediante administración oral o rectal en el tracto digestivo, o la administración por cualquier otra vía que ponga en contacto el anticuerpo con el aspecto luminal del tracto digestivo.

45 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es tratar la inflamación digestiva mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos de la invención en el tracto digestivo mientras se mantienen niveles de anticuerpo en suero por debajo de los que previamente se consideraban necesarios para conseguir eficacia clínica cuando el anticuerpo se administra por inyección. De acuerdo con la invención, los niveles en suero de anticuerpo administrado de acuerdo con la invención son menores de 500 ng/ml, preferentemente menores de 150 ng/ml, y preferentemente menores de 50 ng/ml, como se mide usando ensayos convencionales conocidos en la técnica.

50 Las mediciones de niveles de anticuerpo en suero pueden conseguirse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica anterior. Un ensayo es un radioinmunoensayo (RIA) que detecta la unión de TNF al anticuerpo (Svenson *et al.*, Rheumatology 2007 46:1828-1834). En resumen, se añade suero de paciente al 1% a 5.000 cuentas por min/0,1 ml de ¹²⁵I-TNF. Después de la incubación durante 2 horas a 4 °C, se separan el indicador libre y el unido al anticuerpo mediante la adición de un anticuerpo de conejo específico para la especie de anticuerpo usada como anticuerpo

terapéutico. Para la detección del anticuerpo anti-TNF bovino en el suero del paciente, se usa anticuerpo de conejo específico para inmunoglobulina bovina (cadena pesada + ligera). Para la detección de infliximab (un anticuerpo quimérico IgG1: de ratón-humano) en el suero del paciente, se usa anticuerpo de conejo específico para Fcy humano. El anticuerpo de conejo se añade en una cantidad capaz de precipitar >95% de anticuerpo terapéutico disponible. Después de otras 2 horas, se añaden 2,5 ml de tampón de ensayo frío y se separan el ¹²⁵I-TNF unido y el libre por centrifugación a 4.000 g durante 10 min a 4 °C. La radiactividad en la actividad del sedimento se mide usando un contador gamma. El anticuerpo terapéutico se usa como referencia para construir una curva patrón. En el caso del infliximab, el límite de detección del ensayo es de 0,4 µg/ml de suero entero (Bendtsen, *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 54, No. 12, Diciembre 2006, pág. 3782-3789, 2006).

Otro ensayo que puede usarse para detectar niveles de anticuerpo en suero es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Wolbink, *Ann Rheum Dis* 2005; 64:704-707). En resumen, se recubren placas de microtitulación de fondo plano durante una noche a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra TNF (2 µg/ml en 100 µl por pocillo). Se añade TNF recombinante (0,1 µg/ml en 100 µl por pocillo) en tampón HPE durante 1 hora. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato/Tween al 0,2%, se añaden muestras de suero de pacientes en diferentes diluciones en tampón HPE y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan con solución salina tamponada con fosfato/Tween al 0,2%, y después se incuban con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con un anticuerpo específico para la especie de anticuerpo usada como anticuerpo terapéutico. Para la detección de anticuerpo anti-TNF bovino en el suero del paciente, se usa IgG (h+1) anti-bovina de oveja. Para la detección de infliximab, se usa IgG monoclonal anti-humana. Se añaden anticuerpos marcados con HRP en 100 ml de tampón HPE durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, después del lavado, se añade tetrametilbencidina. La reacción se detiene con H₂SO₄ 2 M. Después se determina la absorción a 450 nm. Los resultados se relacionan con una curva de titulación del anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo anti-TNF bovino o infliximab) en cada placa. El nivel mínimo de detección para infliximab es 0,2 µg/ml (Wolbink, página 704, *supra*).

Estos dos ensayos usados para medir los niveles del anticuerpo terapéutico en suero están basados en la detección de la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno diana (por ejemplo, TNF). Un ensayo alternativo mide la presencia del propio anticuerpo terapéutico. Este no sería preferido cuando el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado, porque es difícil diferenciar el anticuerpo terapéutico del anticuerpo presente normalmente en el paciente. Sin embargo, este método puede usarse para detectar un agente terapéutico de anticuerpo no-humano (véase el Ejemplo 3). En el caso de un anticuerpo policlonal, solo una parte del anticuerpo administrado será específica para la unión al antígeno diana. En el contexto de la presente invención, la concentración de anticuerpo que es importante medir es la concentración de anticuerpo terapéutico específico para el antígeno diana, ya que este es el componente con actividad biológica. Por lo tanto, cuando se cuantifican los niveles en suero del anticuerpo administrado mediante la detección del propio anticuerpo, tienen que realizarse experimentos para determinar el porcentaje del anticuerpo administrado que es específico para el antígeno diana. En el Ejemplo 1 se proporciona una descripción de un método que puede usarse para determinar el porcentaje.

Se han notificado niveles máximos en plasma para el infliximab a 118 µg/ml y para adalimumab a 4,7 µg/ml (Tracey, 2008 *supra*). Los niveles plasmáticos máximos obtenidos dependerán de la vía de administración y del programa de dosificación. Son concentraciones en suero clínicamente eficaces para los anticuerpos anti-TNF inyectados 0,8-1,4 µg/ml (Tracey *et al.*, 2008, *Pharmacol Ther*, 117, 244-79).

En una realización de la presente invención, los anticuerpos liberados en el tracto digestivo que son específicos para las citocinas solubles reducen los niveles de estas citocinas en el tracto digestivo, pero no en la circulación sistémica. Los niveles de citocinas pueden determinarse por medición directa de la citocina o por el análisis de un marcador sustituto que responda a la citocina. En un aspecto de la presente invención, los anticuerpos liberados en el tracto digestivo que son específicos para citocinas solubles reducen los niveles de esas citocinas en el tracto digestivo y en la circulación sistémica.

En una realización de la presente invención, los anticuerpos liberados en el tracto digestivo que tienen un efecto clínico beneficioso no inducen una respuesta de anticuerpos contra el anticuerpo administrado que sea suficiente para inhibir la respuesta a dosis posteriores del anticuerpo o para producir una respuesta perjudicial a dosis posteriores del anticuerpo.

En una realización de la presente invención, la ausencia de una respuesta de anticuerpos inducida se observa después de la terapia de mantenimiento. En una realización de la presente invención, la ausencia de una respuesta de anticuerpos inducida se observa después de una dosificación episódica. La respuesta de anticuerpos puede medirse por medición directa de anticuerpos específicos para el anticuerpo terapéutico o por la evaluación de la respuesta fisiológica a dosis repetidas del anticuerpo terapéutico.

En una realización preferida, menos del 2% de los pacientes desarrollan anticuerpos contra los anticuerpos terapéuticos de la invención después de la exposición a 3 o más dosis del anticuerpo terapéutico. En una realización preferida, la administración de 3 o más dosis del anticuerpo de acuerdo con la invención no reduce la eficacia del

anticuerpo. De acuerdo con la invención, la eficacia del anticuerpo no disminuye después de la administración de 1, 2, 3 o más dosis durante un período de aproximadamente 1 mes desde la fecha de la primera administración del anticuerpo y, preferentemente, durante un período de aproximadamente 6 meses desde la fecha de la primera administración del anticuerpo, más preferentemente durante un período de aproximadamente 1 año desde la primera administración del anticuerpo, e incluso más preferentemente durante un período de aproximadamente 10 años desde la primera administración del anticuerpo.

Las mediciones de la respuesta de anticuerpos al anticuerpo terapéutico (TA) puede realizarse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica anterior. Un ensayo es un RIA (Svenson 2007 *supra*). El anticuerpo terapéutico se marca con ^{125}I usando cloramina-T, se purifica por cromatografía de exclusión molecular y se ensaya para asegurar que conserva la unión a anticuerpos apropiados que se sabe que son específicos para el anticuerpo terapéutico. El TA marcado con ^{125}I se incubaba durante 18 horas a 4 °C con suero del paciente (al 1% o menos). La actividad anti-TA se evalúa por la unión de ^{125}I -TA a una matriz de afinidad que contiene un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente a >80% del AA en suero al 10%. En el caso del infliximab, este segundo anticuerpo es anticadena ligera λ humana. En el caso del anticuerpo anti-TNF bovino, este segundo anticuerpo es anti-IgG (h +1) bovina. Se calcula la unión de fondo media y se usa el doble del valor de fondo para discriminar entre muestras positivas y negativas.

Otro ensayo que puede usarse para detectar respuestas de anticuerpo al anticuerpo terapéutico es un RIA en fase sólida (Svenson, 2007 *supra*). El TA (8 $\mu\text{g/ml}$) se une a placas de microtitulación seguido del bloqueo de los sitios no ocupados con albúmina de suero humano. Se añaden sueros de paciente por duplicado, usando niveles del 10% o menores a 100 $\mu\text{l/pocillo}$. Después de la incubación durante una noche a 4 °C, los pocillos se lavan con tampón de ensayo frío y se añaden 0,1 ml de 6.000 cpm de TA marcado con ^{125}I por pocillo. Después de 3 horas a 4 °C, los pocillos se lavan y se determinan la cpm unidas.

Es bien sabido por los expertos en la materia que será necesario adaptar los ensayos de la respuesta de anticuerpos al anticuerpo terapéutico a la situación específica y los métodos y consideraciones son bien entendidos (Gorovits, The AAPS Journal, Vol. 11, No. 1, marzo 2009). Tiene una importancia particular la posible presencia de respuestas de anticuerpo preexistentes al anticuerpo terapéutico que pueden complicar el análisis estadístico de los datos recogidos para calcular el parámetro de corte del ensayo, usado para distinguir una muestra positiva de una negativa. Para el ensayo de respuestas de anticuerpo contra los agentes terapéuticos de anticuerpo bovino, se prefiere usar una comparación directa de los resultados de la muestra antes del tratamiento y después del tratamiento para un paciente dado. Se define que un paciente tiene una respuesta de anticuerpos inducida contra el anticuerpo terapéutico si los niveles de anticuerpo anti-TA aumentan significativamente durante el transcurso del tratamiento con el anticuerpo terapéutico. Para anticuerpos terapéuticos en los que no se detectan respuestas de anticuerpo preexistentes, se define que un paciente tiene una respuesta de anticuerpos inducida contra el anticuerpo terapéutico si la respuesta de anticuerpos es mayor que dos veces el nivel de fondo.

Se observaron respuestas de anticuerpos contra el anticuerpo terapéutico durante la terapia de mantenimiento para la enfermedad inflamatoria del intestino en un 2,8% - 3,7% de los pacientes tratados con adalimumab, en un 5% - 18% de los pacientes tratados con infliximab y en un 8% - 12,3% de los pacientes tratados con certolizumab (Cassinotti, Inflamm Bowel Dis, Vol. 15(8), agosto 2009). La dosificación episódica dio como resultado una mayor frecuencia de respuestas de anticuerpos al anticuerpo terapéutico, generando un 36% - 61% de los pacientes que recibieron infliximab respuestas de anticuerpos.

La barrera mucosa del tracto digestivo puede romperse o verse comprometida por un traumatismo mecánico, que incluye, pero sin limitación, heridas dentales y orales, heridas esofágicas, o traumatismos inducidos quirúrgicamente debido a una resección parcial del tracto digestivo, yeyunostomía, ileostomía, colostomía u otros procedimientos quirúrgicos. La barrera mucosa del tracto digestivo también puede romperse por una lesión de isquemia o reperfusión. La barrera mucosa del tracto digestivo también puede romperse por lesiones producidas por una quimioterapia contra un cáncer, radioterapia contra un cáncer o una exposición a alta dosis de radiación fuera de una situación terapéutica.

La barrera mucosa del tracto digestivo puede romperse o verse comprometida debido a una gran inflamación y/o ulceración, incluyendo pero sin limitación una enfermedad periodontal, estomatitis aftosa, infecciones bacterianas, víricas, fúngicas o parasitarias del tracto digestivo, úlceras pépticas, úlceras asociadas con estrés o infección por *H. pylori*, lesiones producidas por reflujo esofágico, enfermedad inflamatoria del intestino, lesiones producidas por cáncer del tracto digestivo, intolerancia alimentaria, incluyendo la enfermedad celíaca, o úlceras inducidas por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) u otros fármacos ingeridos o administrados sistémicamente.

La ruptura o el compromiso de la barrera mucosa del tracto digestivo puede ser una que se haya descrito clínicamente, pero en la que no se entiende bien la base biológica del defecto de la barrera, incluyendo pero sin limitación las pérdidas de función de la barrera del tracto digestivo asociadas a quemaduras externas, traumatismos, septicemia o shock, síndrome del intestino irritable, diabetes (en particular diabetes de tipo I), dermatitis atópica, pacientes que padecen trastornos autoinmunitarios, incluyendo espondilitis anquilosante, síndrome de Sjogren,

insuficiencia cardíaca congestiva o esclerosis múltiple. Las infecciones con patógenos también pueden producir alteraciones específicas de la función de la barrera.

En algunas enfermedades o trastornos a los que puede aplicarse la presente invención, puede estar presente una permeabilidad alterada de la barrera antes del desarrollo de la inflamación y/o ulceración evidente y pueden aplicarse anticuerpos en el momento de la alteración de la permeabilidad de la barrera así como durante el período de la inflamación y ulceración. Las enfermedades y trastornos que incluyen un aumento de la permeabilidad antes de la inflamación incluyen, pero sin limitación, mucositis inducida por quimioterapia o radioterapia, por exposición a altos niveles de radiación no terapéutica, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad celíaca.

En algunas enfermedades o trastornos a los que puede aplicarse la presente invención, puede estar presente una alteración de la permeabilidad de la barrera en partes discretas del tracto digestivo mientras que está presente una inflamación y/o ulceración evidente en otras partes del tracto digestivo. Las enfermedades y trastornos que incluyen regiones físicamente separadas de mayor permeabilidad e inflamación o ulceración incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para acceder a las regiones de permeabilidad alterada así como a las regiones de inflamación y ulceración evidentes.

Para trastornos de la cavidad oral, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en un enjuague bucal, colutorio, pasta, gel u otra formulación adecuada. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse usando formulaciones diseñadas para aumentar el contacto entre el anticuerpo activo y la superficie de la mucosa, tales como parches bucales, cintas bucales, películas mucoadhesivas, comprimidos sublinguales, grageas, obleas, comprimidos masticables, comprimidos de disolución rápida, comprimidos efervescentes o un sólido bucal o sublingual. Para trastornos del tracto digestivo, el anticuerpo puede administrarse por ingestión oral en forma de una cápsula, comprimido, formulación líquida o una forma similar diseñada para introducir el fármaco en el tracto digestivo. Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse mediante un supositorio o enema para liberación en el tracto digestivo inferior. Dichas formulaciones son bien conocidas para los expertos en la materia.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos", como se usan en el presente documento, se refieren a un polipéptido que comprende una región marco conservada de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de la misma que se unen específicamente y reconocen a un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente la región de unión a antígeno de un anticuerpo será la más crítica en la especificidad y afinidad de unión a un receptor diana. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "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.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por degradación con diversas peptidasas que pueden competir con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique otra cosa en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_{H-CH1} por un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ puede reducirse en condiciones suaves rompiéndose el enlace disulfuro en la región de bisagra, y convirtiéndose de esta manera el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la degradación de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* químicamente o usando la metodología de ADN recombinante. De esta manera, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos enteros, o los sintetizados *de novo* usando metodologías químicas o de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario, fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR) o polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión específica del receptor al polipéptido) o los identificados usando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990)).

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpos monoclonales", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de anticuerpos de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular de un receptor diana.

Un "epítipo" es la parte de una molécula que se une a un anticuerpo. Un epítipo puede comprender partes no contiguas de la molécula (por ejemplo, en un polipéptido, restos de aminoácidos que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del polipéptido, están suficientemente cerca entre sí como para unirse a un anticuerpo).

La expresión "anticuerpo policlonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición de moléculas de anticuerpo diferentes que es capaz de unirse a o reaccionar con varios determinantes antigénicos específicos diferentes presentes en el mismo o en diferentes antígenos. La variabilidad en la especificidad de antígeno de un anticuerpo policlonal está localizada en las regiones variables de los anticuerpos individuales que constituyen el anticuerpo policlonal, en particular, en las regiones determinantes de complementariedad (CDR)1, CDR2 y CDR3. Preferentemente, el anticuerpo policlonal se prepara por inmunización de un animal con el antígeno diana o partes del mismo como se especifica de más adelante. Como alternativa, el anticuerpo policlonal puede prepararse mezclando múltiples anticuerpos monoclonales (por ejemplo, Nowakowski, A. *et al.*, 2002. Proc Natl Acad Sci USA 99, 11346-11350 y Patente de Estados Unidos N° 5.126.130) que tienen la especificidad deseada por un receptor diana.

Las preparaciones de anticuerpos policlonales aisladas a partir de leche o calostro de animales inmunizados típicamente incluyen anticuerpos que no son específicos por el inmunógeno además de anticuerpos específicos por el antígeno diana. Los anticuerpos específicos por el antígeno diana pueden purificarse de la preparación de anticuerpo policlonal o la preparación de anticuerpo policlonal puede usarse sin purificación adicional. De esta manera, la expresión "anticuerpo policlonal", como se usa en el presente documento, se refiere tanto a preparaciones de anticuerpo enriquecidas con el anticuerpo específico para el antígeno diana como preparaciones que no están purificadas. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas para enriquecer anticuerpos policlonales para conseguir anticuerpos contra dianas específicas. Recientemente se ha desarrollado una tecnología para la producción recombinante de anticuerpos policlonales muy específicos adecuados para la administración profiláctica y terapéutica (documento WO 2004/061104). El anticuerpo policlonal recombinante (rpAb) puede purificarse de un biorreactor de producción como una sola preparación sin etapas separadas de manipulación, fabricación, purificación o caracterización de los miembros individuales que constituyen la proteína policlonal recombinante.

El anticuerpo es un anticuerpo policlonal procedente de leche o calostro. En una realización, el anticuerpo policlonal procede de la leche o calostro de un rumiante tal como una vaca, cabra, oveja, camello o búfalo. En otra realización, el anticuerpo se aísla a partir de la leche o calostro de una mujer. En una realización preferida, el anticuerpo policlonal se aísla de la leche o calostro de una vaca, preferentemente una vaca inmunizada. El calostro bovino (primera leche) es una fuente preferida de anticuerpos para esta invención. En las vacas, el anticuerpo no atraviesa la placenta y por lo tanto toda la inmunidad pasiva se transfiere al ternero recién nacido a través de la leche. Como resultado, las vacas secretan una gran cantidad de anticuerpo en el calostro inmediatamente después del parto y aproximadamente un 50% de la proteína presente en el calostro es inmunoglobulina. En las primeras 4 horas después del nacimiento, típicamente se encuentran en el calostro concentraciones de inmunoglobulina de 50 mg/ml (Butler and Kehrl, 2005, Mucosal Immunology, 1763-1793), que se reducen a 25 - 30 mg/ml 24 horas después (Ontsouka *et al.*, 2003, J Dairy Sci, 86, 2005-11). El calostro y la leche son una fuente especialmente segura de anticuerpos policlonales para administración oral. Ya hay una amplia exposición humana a la inmunoglobulina bovina, ya que la leche normal contiene 1,5 g/l de IgG.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, está alterada, reemplazada o cambiada de forma que el sitio de unión a antígenos (región variable) está asociada a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula totalmente diferente que confiere 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, se ha alterado, reemplazado o cambiado por una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 y Morrison, 1985, Science 229:1202-07.

La divulgación contempla además el uso de moléculas destinadas a imitar anticuerpos tales como aptámeros, nanocuerpos y miméticos de anticuerpo basados en fibronectina. La divulgación también contempla el uso de "proteínas de fusión" en las que una parte de una molécula de anticuerpo se ha fusionado al ligando para el receptor diana y de esta forma se ha hecho específica para el receptor diana. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un derivado de un anticuerpo específico para una diana. El anticuerpo modificado puede comprender cualquier molécula o sustancia que proporcione una propiedad deseada al anticuerpo, tal como una mayor semivida en un uso particular. El anticuerpo modificado puede comprender, por ejemplo, un resto detectable (o marcador) (por ejemplo, una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, una perla detectable (tal como una molécula magnética o electrodensa (por ejemplo, perla de oro), o una molécula que se une a otra molécula (por ejemplo, biotina o estreptavidina)), un resto terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, un resto radiactivo, citotóxico, o farmacéuticamente activo), o una molécula que aumenta la idoneidad del anticuerpo para un uso particular (por ejemplo, administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos *in vivo* o *in vitro*). Los ejemplos de moléculas que pueden usarse para modificar un anticuerpo incluyen albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano) y polietilenglicol (PEG). Los derivados unidos a albúmina PEGilados de los anticuerpos pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en este campo. En una realización, el anticuerpo se conjuga o se une de otra manera a transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR puede modificarse químicamente, por ejemplo, con un agente químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinil pirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados y alcoholes polivinílicos.

Los anticuerpos de la invención se usan en métodos para tratar a un paciente. El término “paciente”, como se usa en el presente documento, se refiere a un animal. Preferentemente, el animal es un mamífero. Más preferentemente, el mamífero es un ser humano. Un “paciente” también se refiere, por ejemplo, a perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, cobayas, peces, aves y similares. De esta manera, los anticuerpos de la invención son igualmente adecuados para tratamientos veterinarios. En una realización de la invención, los anticuerpos se usan para tratar enfermedades o trastornos de animales de compañía, animales de trabajo o animales destinados a la alimentación. En una realización de la invención, se usan anticuerpos estabilizados para proporcionar inmunidad pasiva a animales recién nacidos, preferentemente vacas, caballos, ovejas o cerdos.

Los términos “tratamiento” y “tratar” incluyen el alivio, curación o prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno, enfermedad, malestar u otra afección (denominados colectivamente en el presente documento “afección”) o la reducción de la gravedad de la afección, y similares. No es necesario que una composición de la invención produzca una curación completa o erradique todos los síntomas o manifestaciones de una enfermedad para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de una patología dada, pero no es necesario que eliminen todas las manifestaciones de la enfermedad para considerarse agentes terapéuticos útiles. De forma similar, no es necesario que un tratamiento administrado profilácticamente sea completamente eficaz en la prevención de la aparición de una afección para constituir un agente profiláctico viable. Simplemente es suficiente la reducción del impacto de una enfermedad (por ejemplo, al reducirse el número o gravedad de sus síntomas, o al aumentarse la eficacia de otro tratamiento, o al producirse otro efecto beneficioso), o la reducción de la probabilidad de que se produzca o empeore la enfermedad en un sujeto. En una realización, una indicación de que se ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición al paciente es una mejora sostenida con respecto al punto inicial de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención formulado junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por “cantidad terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo de la invención se entiende una cantidad de la composición que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico es suficiente para “tratar” al paciente, como se usa dicho término en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable” significa una carga, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo, inerte y no tóxica, sólida, semisólida o líquida. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y aromatizantes, conservantes y antioxidantes, que también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua, u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saborizantes y aromatizantes.

Las composiciones para administración rectal preferentemente son supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o en la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo. En una realización, las composiciones para administración rectal están en forma de un enema.

Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo está mezclado con al menos un excipiente o vehículo inerte y farmacéuticamente aceptable tal como citato sódico o fosfato dicálcico y/o: a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, c) humectantes tales como

glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes para retrasar la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonítica, y i) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas, blandas y duras, usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Aunque los anticuerpos estabilizados tienen mejor estabilidad frente a la degradación gástrica, puede ser deseable en algunas condiciones proporcionar niveles adicionales de protección contra la degradación gástrica. Si se desea esto, hay muchas opciones para el recubrimiento entérico (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.330.338 y 4.518.433). En una realización, los recubrimientos entéricos tienen la ventaja del cambio de pH después de la exposición al jugo gástrico para disolver un recubrimiento de película y la liberación del ingrediente activo. Se han desarrollado recubrimientos y formulaciones para liberar agentes terapéuticos proteicos en el intestino delgado y estas estrategias podrían adaptarse para la liberación de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, se ha desarrollado una forma con recubrimiento entérico de insulina para administración oral (Toorisaka *et al.*, 2005, *J Control Release*, 107, 91-6).

Además, las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con otros recubrimientos y cubiertas bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificadores y también pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente o los ingredientes activos únicamente, o preferentemente, en cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las dosis eficaces variarán dependiendo de la vía de administración, así como de la posibilidad de uso conjunto con otros agentes. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico correspondiente dentro del alcance de un criterio médico razonable. El nivel de dosificación terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; el momento de administración del compuesto con respecto a la ingesta de alimentos; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma contemporánea con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

De acuerdo con la invención, las vías de administración incluyen la administración oral a través de un catéter o un tubo de alimentación.

Las realizaciones particulares de la presente invención implican administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención a una dosificación de aproximadamente 1 mg al día a aproximadamente 1 g/día, más preferentemente de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 500 mg/día y aún más preferentemente de aproximadamente 20 mg/día a aproximadamente 100 mg/día, a un sujeto. En una realización, una preparación de anticuerpo policlonal se administra a una dosificación de anticuerpo de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 50 g/día, más preferentemente de aproximadamente 500 mg/día a aproximadamente 10 g/día, y aún más preferentemente de aproximadamente de 1 g/día a aproximadamente 5 g/día a un sujeto, donde la preparación de anticuerpo policlonal no se ha enriquecido en anticuerpos específicos para el antígeno diana.

Los regímenes de tratamiento incluyen la administración de una composición de anticuerpo de la invención una vez al día, dos veces al día o tres veces o más al día, para tratar un trastorno médico desvelado en el presente documento. En una realización, una composición de anticuerpo de la invención se administra cuatro veces al día, 6 veces al día u 8 veces al día para tratar un trastorno médico desvelado en el presente documento. En una realización, una composición de anticuerpo de la invención se administra una vez al día, dos veces por semana o tres o más veces por semana, para tratar un trastorno médico desvelado en el presente documento.

El anticuerpo de la invención puede usarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para tratar la afección que padece el paciente. Los ejemplos de dichos agentes incluyen fármacos tanto proteicos como no proteicos. Cuando se administran conjuntamente múltiples agentes terapéuticos, las dosificaciones pueden ajustarse de acuerdo con esto, como se reconoce en la técnica pertinente. La "coadministración" y la terapia de combinación no se limitan a la administración simultánea, sino que también incluyen regímenes de tratamiento en los que un anticuerpo de la invención se administra al menos una vez durante un trascurso de tratamiento que implica la administración de al menos otro agente terapéutico al paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1. Análisis de anticuerpo anti-TNF bovino.

Se generó anticuerpo policlonal bovino anti-TNF (AVX-470) inmunizando vacas con TNF murino y recogiendo el calostro después del parto. Se purificó inmunoglobulina a partir del suero del calostro por precipitación con sulfato amónico; se observó que la preparación tenía una pureza del 70% por SDS-PAGE. En paralelo, se purificó inmunoglobulina bovina de control a partir del calostro de vacas que se habían inmunizado con gluten. La concentración de proteína de las preparaciones de inmunoglobulina semipurificadas se determinó usando el ensayo BCA.

La actividad neutralizadora de TNF de AVX-470 se ensayó usando el ensayo L929 convencional. Como los primeros experimentos funcionales realizados con AVX-470 se realizaron en hámsteres, se evaluó la capacidad de neutralizar TNF de hámster. Se estimularon esplenocitos de hámster con LPS a una concentración de 2 ng/ml durante 24 h y el sobrenadante se usó como fuente de TNF de hámster. Se incubaron concentraciones variables de AVX-470, anticuerpo bovino anti-gluten de control o anticuerpo de conejo anti-TNF purificado (Biovision) durante 2 h a 37°C con una dilución 1:100 del sobrenadante de LPS de hámster (denominado en lo sucesivo TNF de hámster). La combinación de anticuerpo de TNF de hámster se transfirió, junto con 1 µg/ml de actinomicina D, a células L929 (3,5 x 10⁴ células por pocillo) que se habían cultivado durante una noche. Los cultivos se incubaron durante una noche y se midió la proliferación celular usando WST. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Como se muestra en la Tabla I, el TNF de hámster inhibió la proliferación de células L929. Esta inhibición se bloqueó de una forma dependiente de la dosis por el anticuerpo anti-TNF de conejo purificado y por AVX-470, pero no por el anticuerpo bovino anti-gluten de control. La mitad de la inhibición máxima se consiguió por 0,5 µg/ml de anticuerpo anti-TNF purificado y por 200 µg/ml de AVX-470. Basándose en estos datos, se estima que un 0,25% del anticuerpo en AVX-470 es específico para TNF.

	conc. (µg/ml)	Media ± EEM	% inhibición
Medio		0,842 ± 0,076	
TNF de hámster		0,301 ± 0,001	
Anti-TNF de conejo	0,50	0,602 ± 0,016	56%
	0,17	0,367 ± 0,010	12%
	0,06	0,317 ± 0,002	3%
AVX-470	336,00	0,710 ± 0,019	76%
	112,00	0,419 ± 0,022	22%
	37,33	0,367 ± 0,008	12%
Anti-gluten	238,00	0,306 ± 0,003	1%
	79,33	0,326 ± 0,003	5%
	26,44	0,335 ± 0,001	6%

Ejemplo 2. Tratamiento de colitis inducida por TNBS con anticuerpo anti-TNF oral

Se aisló anticuerpo anti-TNF policlonal bovino (AVX-470) a partir del calostro de vacas que se habían inmunizado con TNF murino. Se produjo suero de calostro desnatando el calostro y precipitando la caseína por incubación a pH 4,6. Se reunió el suero de las vacas inmunizadas y se purificó por cromatografía de adsorción tiónica. El anticuerpo de control se purificó a partir del calostro de un animal no inmunizado en paralelo.

A ratones C57BL/6 ((de 8-9 semanas de edad) Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se les administraron 0,1 ml de TNBS (trinitrobenzeno sulfonato) (4 mg) en etanol al 50% por vía intrarrectal. El modelo de TNBS es un modelo bien aceptado de enfermedad inflamatoria del intestino. A los animales de control se les administró etanol solo. Se usaron doce animales en el grupo tratado con TNBS y ocho animales en cada uno de los otros grupos. A los animales se les administró AVX-470 (5 mg, 1,5 mg o 0,5 mg), anticuerpo bovino de control (1,5 mg) o solución salina dos veces al día mediante una sonda oral en 0,1 ml. El anticuerpo se administró desde el día -1 al día 3.

Cada ratón se analizó usando videoendoscopia, bajo anestesia con isoflurano, el día 5 justo antes de sacrificar a los animales. Durante cada procedimiento endoscópico se grabaron imágenes fijas así como vídeos para evaluar el grado de colitis y la respuesta al tratamiento. La gravedad de la colitis se puntuó por un observador con un diseño ciego usando una escala de 0-4 (0= normal; 1= pérdida de vascularidad; 2= pérdida de vascularidad y friabilidad; 3= friabilidad y erosiones; 4= úlceras y hemorragia). Las diferencias entre grupos se analizaron usando el ensayo T de Student.

Como se muestra en la Figura 1, la administración oral de AVX-470 redujo la gravedad de la colitis en este modelo bien aceptado de enfermedad inflamatoria del intestino.

Ejemplo 3. Niveles en suero de anticuerpo después de tratamiento de la colitis inducida por TNBS con anticuerpo anti-TNF oral

Después del sacrificio de los ratones del Ejemplo 2, se recogieron muestras de sangre por punción cardíaca y se preparó y congeló el suero. El suero de cada ratón individual se ensayó con respecto a la presencia de inmunoglobulina bovina por ELISA. Las placas se recubrieron con anticuerpo de oveja anti-IgG (h+1) bovina a 5 µg/ml (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Se analizaron diluciones en serie de suero de ratón (diluciones de 3 veces, empezando a una dilución de 1:100) por duplicado. El anticuerpo se detectó con anticuerpo de oveja anti-IgG (h+1) bovina marcado con HRP a 10 ng/ml y sustrato TMB (SigmaAldrich, St. Louis, MO). Se realizó una curva patrón usando suero de referencia bovino (Bethyl Laboratories) en todas las placas ELISA. Como se muestra en la Figura 2, el ensayo detecta fácilmente las concentraciones de inmunoglobulina bovina mayores de 10 ng/ml.

El suero de todos los ratones se analizó en el ELISA. 31 de los 32 ratones que recibieron la dosificación de anticuerpo bovino (AVX-470 o anticuerpo de control) no tuvieron un nivel detectable de inmunoglobulina bovina en el suero el día 5. El límite de detección del ELISA era 10 ng/ml y el suero se ensayó a una dilución de 1:100. Por lo tanto, las muestras de suero contenían < 1 µg/ml de inmunoglobulina bovina.

Se detectaron niveles muy altos de inmunoglobulina bovina en el suero del ratón N° 23 (0,95 mg/ml). Este ratón estaba en el grupo tratado con máxima dosis de AVX-470 (5 mg). El volumen de suero de un ratón es de aproximadamente 1 ml, y estos datos sugerirían que en el suero estaba presente el 20% de la dosis aplicada. Sin embargo, dado que los otros 7 ratones de este grupo tuvieron niveles en suero de inmunoglobulina bovina < 1 µg/ml (>1000 veces menores), es probable que este resultado refleje la contaminación de la muestra. Debe tenerse en cuenta que el ratón N° 23 tuvo la máxima puntuación de endoscopia en el grupo tratado con la dosis elevada.

Los datos mostrados en el Ejemplo 1 indican que <1% de la inmunoglobulina en AVX-470 es específica para el TNF. Por lo tanto, la concentración en suero del anticuerpo específico para TNF es menor de 10 ng/en este experimento en el que se observó un efecto clínico significativo. Las concentraciones en suero clínicamente eficaces para los anticuerpos anti-TNF inyectados son 0,8-1,4 µg/ml (Tracey *et al.*, 2008, *Pharmacol Ther*, 117, 244-79).

Ejemplo 4. Tratamiento de mucositis oral con anticuerpo anti-TNF tópico

Se aisló anticuerpo anti-TNF policlonal bovino (AVX-470) a partir del calostro de vacas que se habían inmunizado con TNF murino. Se produjo suero de calostro desnatando el calostro y precipitando la caseína por incubación a pH 4,6. Se reunió el suero de las vacas inmunizadas y se purificó por precipitación con sulfato amónico. En paralelo se purificó anticuerpo de control a partir del calostro de vacas que se había inmunizado con gluten.

Se anestesiaron hámsteres Syrian Golden (8 hámsteres por grupo) y se evirtió el abazón izquierdo, se fijó y se aisló usando una pantalla protectora de plomo. Se administró una sola dosis de radiación (40 Gy/dosis) a todos los animales el día 0 a una velocidad de 2,0 Gy/minuto. La radiación se generó con una fuente de 16 kilovoltios de potencial (15-ma) a una distancia focal de 50 cm, endurecida con un sistema de filtración de 0,35 mm de Cu. En este modelo, la gravedad de la mucositis alcanza un máximo el día 14 y empieza a curarse el día 18. Empezando el día 0, inmediatamente después de la radiación, a los hámsteres se les administró 1 mg de AVX-470 en tampón salino en el abazón izquierdo dos veces al día a lo largo de todo el estudio de 28 días.

Se incluyeron dos grupos de control - un grupo con solución salina y un grupo dosificado con 7 mg de anticuerpo anti-gluten de calostro bovino. La gravedad de la mucositis se evaluó un día sí y otro no empezando el día 6 y continuando hasta el día 28. Los animales se anestesiaron y se evirtió y fotografió el abazón izquierdo. Al final del estudio, las imágenes se distribuyeron al azar y se evaluaron de una manera independiente por dos evaluadores que desconocían los identificadores para cada imagen.

La mucositis se evaluó visualmente por comparación con una escala fotográfica validada. Puntuación de 0: Abazón completamente sano. Sin eritema o vasodilatación; Puntuación de 1: Eritema de ligero a severo y vasodilatación. Sin erosión de la mucosa; Puntuación de 2: Eritema severo y vasodilatación. Erosión de aspectos superficiales de la mucosa que dejan áreas desnudas. Reducción de punteado de la mucosa; Puntuación de 3: Formación de úlceras blanquecinas en uno o más sitios. Las úlceras pueden tener un color amarillo/gris debido a una seudomembrana. El tamaño acumulativo de las úlceras equivale aproximadamente a la cuarta parte del abazón. Eritema severo y vasodilatación; Puntuación de 4: El tamaño acumulativo de las úlceras equivale aproximadamente al tamaño del abazón. Pérdida de flexibilidad. Eritema severo y vasodilatación; Puntuación de 5: Prácticamente todo el abazón está ulcerado. Pérdida de flexibilidad (el abazón solo puede extraerse parcialmente de la boca).

La diferencia en la gravedad de la mucositis entre los grupos se evaluó calculando el número de días en el que cada animal presentaba una úlcera (es decir, una puntuación de 3 o mayor). La ulceración es el punto en el desarrollo de la enfermedad en el que la integridad física de la mucosa oral se rompe y es un criterio de valoración clínicamente significativo. Como se muestra en la Tabla II, los animales tratados con 1 mg de AVX-470 tuvieron una reducción del 26% en el número de días que los animales tenían un grado 3 o mayor de mucositis. El tratamiento con anticuerpo anti-gluten no tuvo ningún efecto sobre el resultado de la enfermedad.

Tabla II			
Grupo	Días \geq 3	% de días \geq 3	% Reducción
Solución salina	70	36,5	
AVX-470	52	27,1	26%
Anti-gluten	68	35,4	3%

Ejemplo 5. Niveles de anticuerpo en suero después del tratamiento de una mucositis oral con anticuerpo anti-TNF tópico

5 Después del sacrificio de los hámsteres del Ejemplo 4, se recogieron muestras de sangre por punción cardíaca y se preparó y congeló el suero. El suero de cada hámster individual se ensayó con respecto a la presencia de inmunoglobulina bovina por ELISA. Las placas se recubrieron con anticuerpo de oveja anti-IgG (h+1) bovina a 5 μ g/ml (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Se analizaron diluciones seriadas de suero de ratón (diluciones de 3 veces, empezando a una dilución de 1:100) por duplicado. El anticuerpo se detectó con anticuerpo de oveja anti-IgG (h+1) bovina marcado con HRP a 10 ng/ml y sustrato TMB (SigmaAldrich, St. Louis, MO). Se realizó una curva patrón usando suero bovino de referencia (Bethyl Laboratories) en cada placa del ELISA.

15 El suero de todos los hámsteres se analizó en el ELISA. Ninguno de los hámsteres que recibió anticuerpo bovino (AVX-470 o anticuerpo anti-gluten de control) tuvo cantidades detectables de inmunoglobulina bovina en el suero el día 28. El límite de detección en el ELISA fue de 10 ng/ml y el suero se ensayó a una dilución de 1:100. Por lo tanto, las muestras de suero contenían < 1 μ g/ml de inmunoglobulina bovina.

Ejemplo 6. Anticuerpo bovino detectado en tejido local por inmunohistoquímica después de radiación del abazón

20 Hámsteres Syrian Golden recibieron una irradiación de 40 Gy en el abazón izquierdo como en el Ejemplo 4. Doce días después de la irradiación, los animales recibieron una sola dosis de 1 mg de AVX-470 en los dos abazones. Una hora después de la dosificación, los animales se sacrificaron y se escindieron los abazones, se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina y se seccionaron. Las secciones se tiñeron con respecto a la presencia de inmunoglobulina bovina usando el kit Vectastain Elite ABC de Vector Laboratories. El kit está diseñado para el reconocimiento de IgG de cabra, pero presenta reacción cruzada con inmunoglobulina bovina. Como se muestra en la Figura 3, la inmunoglobulina bovina pudo detectarse fácilmente a lo largo de todo el espacio submucoso en el abazón izquierdo (panel A), pero solo se encontró en la cara exterior del abazón derecho no irradiado (panel B).

Ejemplo 7. Tratamiento del Síndrome GI de Radiación Aguda con anticuerpo anti-TNF oral

35 Se aisló anticuerpo anti-TNF policlonal bovino (AVX-470) del calostro de vacas que se habían inmunizado con TNF murino. Se produjo suero de calostro desnatando el calostro y precipitando la caseína por incubación a pH 4.6. Se reunió el suero de las vacas inmunizadas y se purificó por cromatografía de adsorción tiófila.

40 A ratones C3H/HeNcrI se les administró una sola dosis de radiación de cuerpo entero (8 Gy/dosis) el Día 0. La radiación se generó con una fuente potencial de 160 kilovoltios (15-ma) a una distancia focal de 50 cm, endurecida con un sistema de filtración de 0,35 mm de Al usando una fuente de radiación Kimtron Polaris II. La irradiación se dirigió al cuerpo total a una velocidad de < 100 cGy/minuto. Los animales se dosificaron dos veces al día con solución salina a 6 mg de AVX-470. La primera dosis se administró 10 minutos después de la irradiación y los animales se dosificaron hasta el día 10. Se sacrificaron tres animales de cada grupo los días 1 y 7 y se usaron para el experimento descrito en el Ejemplo 8. Se supervisó la supervivencia de los 16 animales restantes por grupo.

45 Como se muestra en la Figura 4, el grupo tratado con AVX-470 (cuadrados negros) mostró una mejora estadísticamente significativa de la supervivencia en un ensayo Log Rank de Kaplan-Meier ($p=0,002$), sobreviviendo 3 ratones hasta el final del estudio en comparación con ninguno del grupo de control tratado con solución salina (círculos blancos).

Ejemplo 8. Niveles de anticuerpo en suero después del tratamiento del Síndrome GI de Radiación Aguda (GI ARS) con anticuerpo anti-TNF oral

55 Después del sacrificio de los ratones del Ejemplo 7 los días 1 y 7, se recogieron muestras de sangre por punción cardíaca y se preparó y congeló el suero. El suero de cada ratón individual se ensayó con respecto a la presencia de inmunoglobulina bovina por ELISA. Las placas se recubrieron con anticuerpo de oveja anti-IgG (h+1) bovina a 5 μ g/ml (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Se analizaron diluciones en serie de suero de ratón (diluciones triples, empezando a una dilución de 1:100) por duplicado. El anticuerpo se detectó con anticuerpo de oveja anti-IgG (h+1) bovina marcado con HRP a 10 ng/ml y sustrato TMB (SigmaAldrich, St. Louis, MO). Se realizó una curva patrón usando suero de referencia bovino (Bethyl Laboratories) en cada placa de ELISA.

60 El suero de todos los ratones se analizó en el ELISA. Ninguno de los ratones que recibieron anticuerpo bovino (AVX-470 o anticuerpo de control) tuvo un nivel detectable de inmunoglobulina bovina en el suero el día 1 o el día 7. El

límite de detección del ELISA era 10 ng/ml y el suero se ensayó a una dilución de 1:100. Por lo tanto, las muestras de suero contenían < 1 µg/ml de inmunoglobulina bovina.

5 Ejemplo 9. Anticuerpo bovino detectado en la lámina propia del intestino delgado por inmunohistoquímica después de TBI

10 A ratones C3H/HeIV se les administró una dosis de irradiación de cuerpo entero de 8,55 Gy como se describe en el Ejemplo 8. Empezando inmediatamente después de la irradiación, a los animales se les administraron una vez al día 10 mg de AVX-470. 96 h después de la irradiación, los animales se sacrificaron y se retiraron sus intestinos delgados. Las secciones del yeyuno se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina y se seccionaron. Las secciones se tiñeron para detectar la presencia de inmunoglobulina bovina usando el kit Vectastain Elite ABC de Vector Laboratories. El kit está diseñado para el reconocimiento de IgG de cabra, pero presenta reacción cruzada con inmunoglobulina bovina. Como se muestra en la Figura 5, pudo detectarse inmunoglobulina bovina en la lámina propia.

15 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente haciendo referencia a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y en los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que las realizaciones descritas en el presente documento no son mutuamente excluyentes y que, de acuerdo con la invención, pueden combinarse en su totalidad o en parte las características de las diversas realizaciones.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo policlonal anti-TNF, procedente de leche o calostro, para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente, donde después de la administración del anticuerpo policlonal anti-TNF en el tracto digestivo del paciente, el nivel máximo de anticuerpo policlonal anti-TNF en el suero del paciente medido por ELISA es menor de 500 ng/ml.
- 10 2. El anticuerpo policlonal anti-TNF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la administración de 3 o más dosis del anticuerpo anti-TNF no reduce la eficacia del anticuerpo anti-TNF durante un período de 6 meses.
- 15 3. El anticuerpo policlonal anti-TNF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel máximo de anticuerpo policlonal anti-TNF detectable en el suero del paciente después de la administración del anticuerpo policlonal anti-TNF es menor de 10 ng/ml.
- 20 4. El anticuerpo policlonal anti-TNF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que anticuerpo policlonal anti-TNF se formula para administración oral o rectal.
5. El anticuerpo anti-TNF para su uso de acuerdo con una o cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo policlonal anti-TNF procede de ganado bovino.

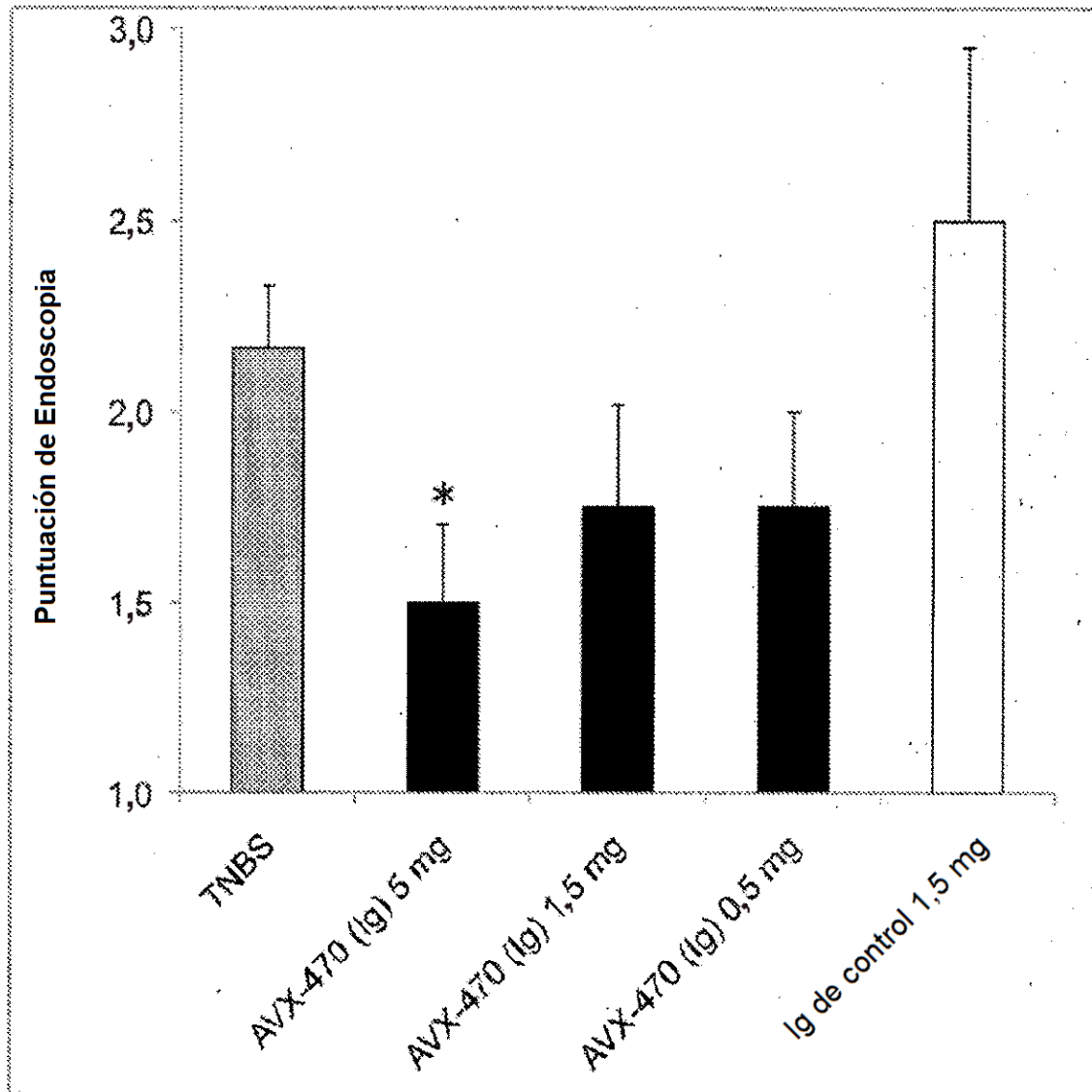


FIG. 1

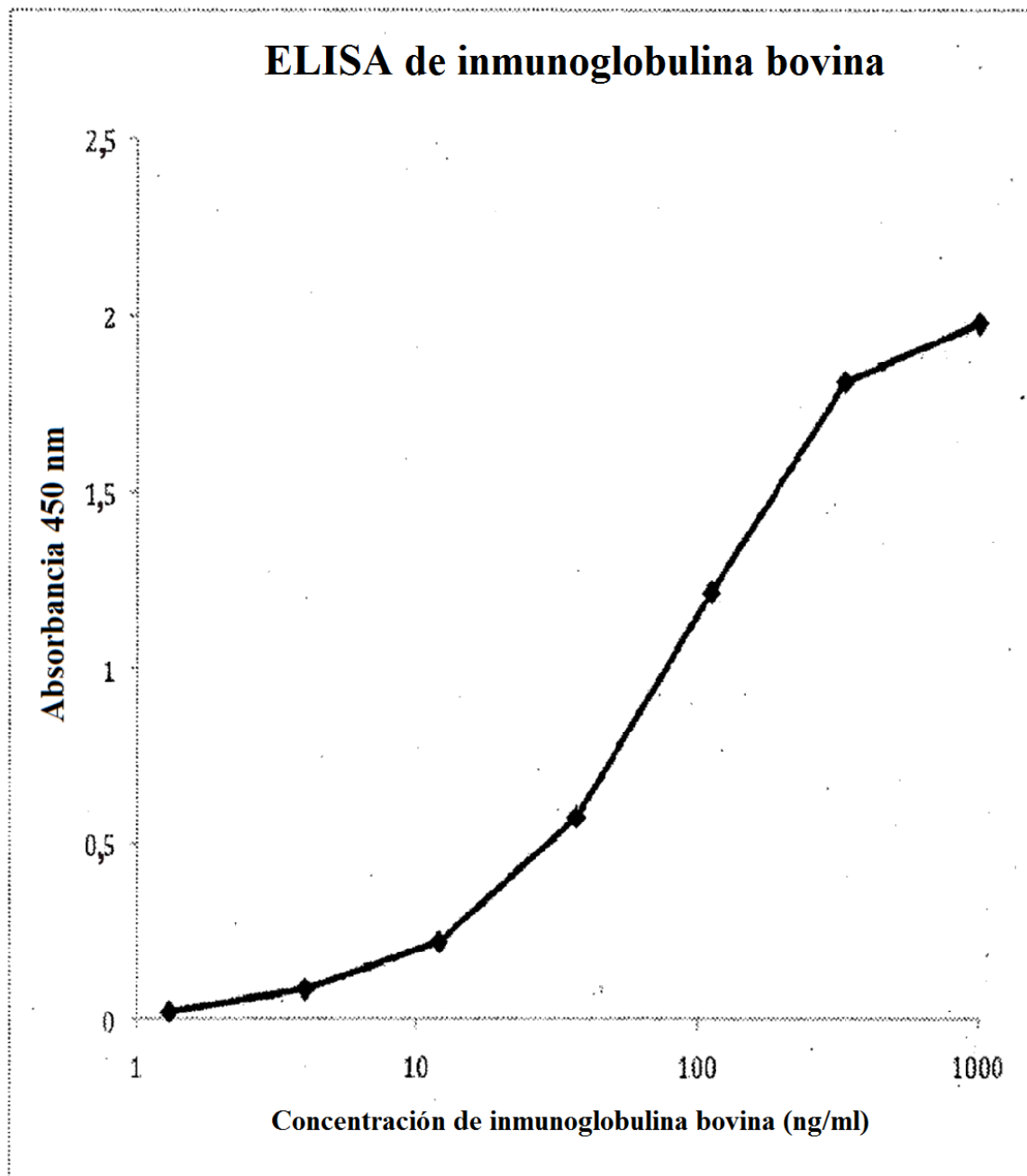
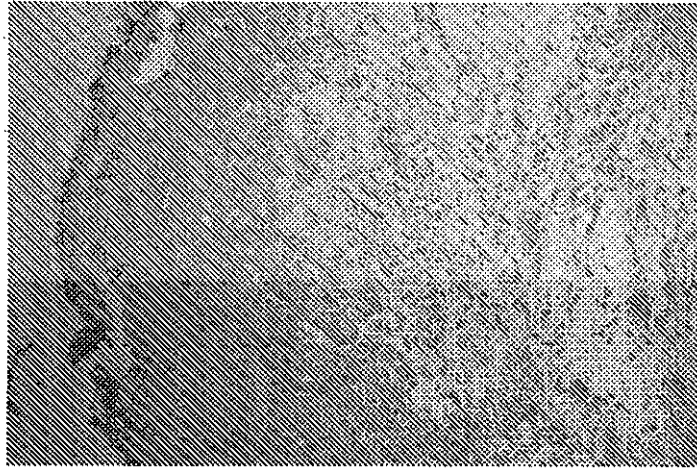


FIG. 2

Panel A.



Panel B.

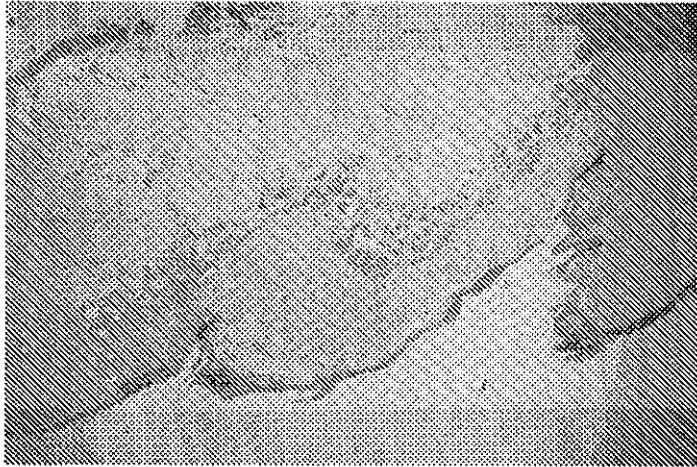


FIG. 3

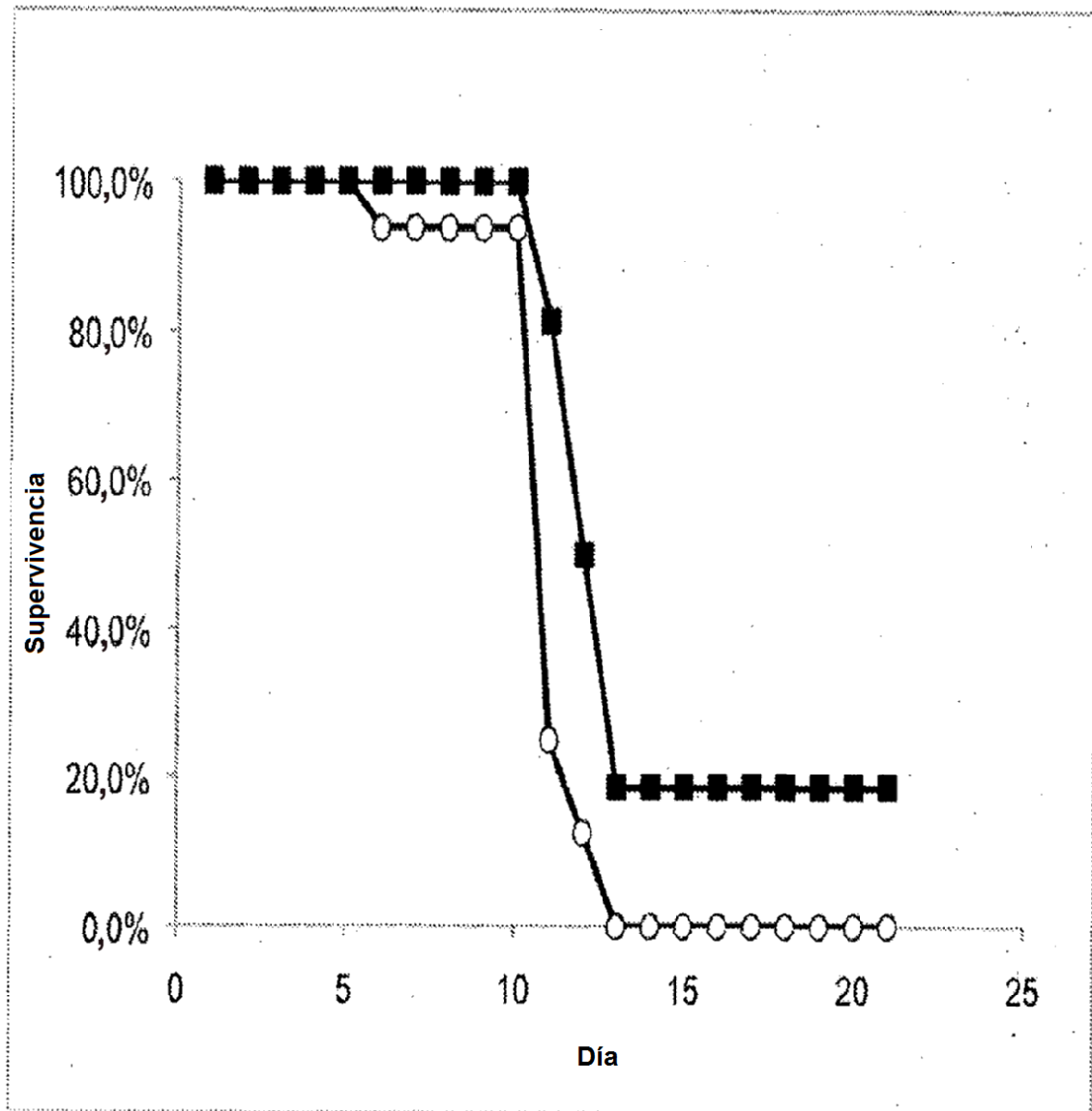


FIG. 4

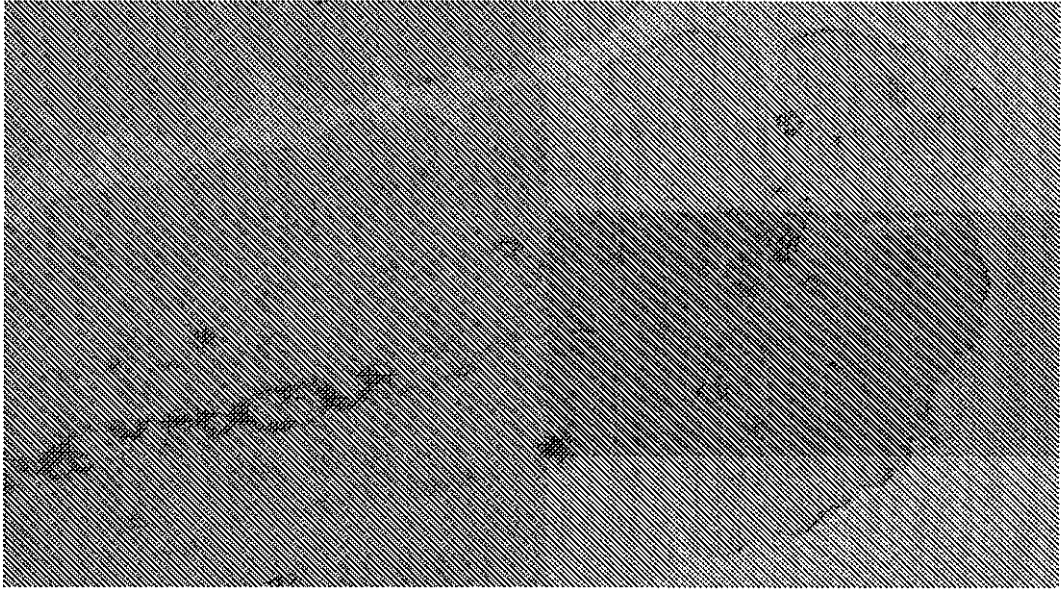


FIG. 5