

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2000.03.01</b>	(73) Titular(es): <b>CENTOCOR, INC.</b>
(30) Prioridade(s): <b>1999.03.02 US 260953</b> <b>1999.12.17 US 465691</b>	<b>200 GREAT VALLEY PARKWAY MALVERN, PA</b> <b>19355-1307</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2001.12.05</b>	(72) Inventor(es): <b>GEORGE TREACY</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.11.17</b> <b>037/2011</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANTI-TNF ALFA NA TERAPÊUTICA DA ASMA RESISTENTE A ESTERÓIDES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UTILIZAÇÕES DE UM ANTICORPO ANTI-TNFA OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO DO MESMO, PARA A FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO, NO TRATAMENTO DA ASMA OU INFLAMAÇÃO DAS VIAS RESPIRATÓRIAS, NUM INDIVÍDUO QUE O NECESSITA. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA A UTILIZAÇÃO DE UM ANTICORPO ANTI-TNFA OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO DO MESMO, PARA A FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO, PARA A SUA UTILIZAÇÃO NA REDUÇÃO DA ACUMULAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NOS PULMÕES, NUM INDIVÍDUO QUE DELE NECESSITA.

**RESUMO****"ANTI-TNF ALFA NA TERAPÊUTICA DA ASMA RESISTENTE A  
ESTERÓIDES"**

A presente invenção proporciona utilizações de um anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, para a fabricação de um medicamento, no tratamento da asma ou inflamação das vias respiratórias, num indivíduo que o necessita. A presente invenção também proporciona a utilização de um anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, para a fabricação de um medicamento, para a sua utilização na redução da acumulação de células inflamatórias nos pulmões, num indivíduo que dele necessita.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ANTICORPOS ANTI-TNF ALFA NA TERAPÊUTICA DA ASMA RESISTENTE A ESTERÓIDES"**

#### Descrição

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias respiratórias que normalmente se apresenta em forma de episódios recorrentes de sibilâncias, dificuldades respiratórias, opressão torácica e tosse, particularmente durante a noite ou de madrugada. Estes episódios associam-se normalmente com a obstrução generalizada embora variável do fluxo do ar que frequentemente é reversível espontaneamente ou com tratamento.

Muitas células e elementos celulares desempenham um papel na inflamação das vias respiratórias, em particular, mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos, e células epiteliais. A inflamação está associada com a exsudação plasmática, edema, hipertrofia do músculo liso, obstrução mucosa e alterações epiteliais. A inflamação também produz um aumento associado com a hipersensibilidade brônquica existente face a uma diversidade de estímulos.

A obstrução variável do fluxo do ar e a hiperactividade brônquica (específica e não específica) são características centrais na asma sintomática. A inflamação das vias respiratórias produz contracção do músculo liso das vias respiratórias, filtração microvascular e hipersensibilidade brônquica. Quando a reactividade das vias respiratórias é alta, os sintomas são mais graves e persistentes e a magnitude das flutuações diurnas na função pulmonar é maior. O mecanismo através do qual a inflamação das vias respiratórias está relacionada com a reactividade brônquica é confuso. Investigações recentes indicam que o

factor de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que é expressado em quantidades aumentadas nas vias respiratórias de pessoas asmáticas, pode associar-se com hipersensibilidade aumentada das vias respiratórias (Shah *et al*, Clin. Exper. Allergy, 25:1038-1044 (1995)). Por exemplo, a administração intravenosa de TNF $\alpha$  recombinado a ovelhas deu como resultado uma notável intensificação da reactividade das vias respiratórias induzida por histamina ((Wheeler *et al*, J. Appl. Physiol., 68: 2542-2549 (1990)) enquanto a exposição de ratos a TNF $\alpha$  aerossolizado aumentou a hipersensibilidade das vias respiratórias e induziu um menor grau de inflamação das vias respiratórias ((Kips *et al*, Am. Rev. Respir. Dis., 145:332-336 1992)). Em sujeitos humanos normais, a inalação de TNF $\alpha$  recombinado produz actividade brônquica aumentada (Yates *et al*, Thorax, 48:1080 (1993)), enquanto análises imuno-histoquímicos de biopsias bronquiais de pessoas asmáticas alérgicas leves revelou que o aumento da imuno-actividade de TNF $\alpha$  se correlacionava com a hipersensibilidade das vias respiratórias (Hosselet *et al*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 149: A957(1994)).

A asma é muito comum. Afecta quase a 5% da população em países industrializados, sendo que está infra-diagnosticada e infra-tratada. Existem provas de que a frequência e o predomínio da asma estão em aumento. Estas tendências produzem-se apesar dos aumentos nas terapêuticas disponíveis para a asma, o que sugere que os métodos actuais do tratamento da asma são inadequados ou não estão a ser utilizados apropriadamente.

O documento WO9208474 descreve o tratamento de doenças pulmonares com ciclosporina A ou outros agentes imuno-supressores adequados.

O documento WO9846642 descreve moléculas de TNF $\alpha$  modificadas, ADN que codifica essas moléculas de TNF $\alpha$

modificadas e vacinas que compreendem essas moléculas de TNF $\alpha$  modificadas e ADN.

O documento WO9104054 descreve um tratamento do Síndrome de Dificuldade Respiratória (SDR) do adulto.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao descobrimento de que através do tratamento com um anticorpo anti-TNF $\alpha$ , os sinais clínicos e os sintomas associados com a asma podem melhorar. Como resultado, a presente invenção proporciona utilizações de um anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a sua utilização no tratamento da asma resistente a esteróides como se define nas reivindicações.

Numa execução preferida, o anticorpo é um anticorpo quimérico como o anticorpo monoclonal cA2.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS GRÁFICOS

A Figura 1 é um gráfico de barras que apresenta uma acumulação de células inflamatórias em líquido de lavagem broncoalveolar (LBA) (acumulação total e acumulação de eosinófilos), 72 horas após exposição a albumina de ovo (OA; a 5% durante 20 minutos) ou solução salina (n=10) em ratos sensibilizados tratados por via intravenosa 1 h antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA com (1) veículo (PBS; n=10, (2) anticorpo cV1qmuG2a (1 mg/kg, n=10) ou (3) anticorpo cV1q muG2a (10 mg/kg, n=9). Um grupo adicional de 10 ratos foi tratado por via intra-peritoneal 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA com dexametasona a 1 mg/kg. O símbolo \* indica diferencia estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo tratado com veículo.

A Figura 2 é um gráfico de barras que apresenta uma acumulação de eosinófilos em líquido de LBA 72 horas após a exposição a OA (a 5% durante 20 minutos) ou a solução salina (n=10) em ratos sensibilizados tratados por via intravenosa 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a

OA com (1) veículo (PBS, n=10), (2) anticorpo cVlqmuG2a (1 mg/kg, n=10) ou (3) anticorpo cVlqmuG2a (10 mg/kg, n=9). Um grupo adicional de 10 ratos foi tratado por via intraperitoneal 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA com dexametasona a 1 mg/kg: os valores apresentam-se como um % de média de células totais  $\pm$  ETM. O símbolo \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo tratado com veículo.

A Figura 3 é um gráfico de barras que apresenta a IgE total em soro 72 horas após a exposição a OA (a 5% durante 20 minutos) ou a solução salina (n=10) em ratos sensibilizados tratados por via intravenosa 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA com (1) veículo (PBS, n=10), (2) anticorpo cVlqmuG2a (1 mg/kg, n=10) ou (3) anticorpo cVlqmuG2a (10 mg/kg, n=9). Um grupo adicional de 10 ratos tratou-se por via intraperitoneal 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA com dexametasona a 1mg/kg.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao descobrimento inesperado e surpreendente de que a acumulação nos pulmões de células inflamatórias, associadas com a asma, particularmente eosinófilos, leucócitos perivasculares, leucócitos intersticiais e leucócitos pleurais, em lavagem bronco-alveolar (LBA), reduz-se significativamente mediante tratamento com um anticorpo anti-TNF $\alpha$ . A infiltração das vias respiratórias por células inflamatórias, particularmente de eosinófilos nos pulmões, é um dos aspectos característicos da asma (Holgate, Eur. Respir. J., 6:1507-1520 (1993)). Estudos de biopsia brônquica realizados em doentes com asma alérgica demonstraram que, no tecido das vias respiratórias e na LBA, existe uma quantidade aumentada de eosinófilos e linfócitos T activados.

Demonstrou-se que a quantidade de eosinófilos no sangue periférico e no líquido de LBA se correlaciona com o grau de hiper-reatividade brônquica e com a gravidade da asma (Corrigan and Kay, *Immunology Today*, 13:501-507 (1992)). Os eosinófilos armazenam 4 proteínas básicas nos seus grânulos: proteína básica principal, neurotoxina derivada de eosinófilos, proteína catiónica eosinofílica e peroxidase eosinofílica. A libertação destas proteínas pode ser responsável pelas lesões tecidulares nas vias respiratórias e de hipersensibilidade brônquica em pessoas asmáticas (Flavahan *et al*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138:685-688 (1988)).

Os linfócitos T produzem citocinas que activam a imunidade mediada por células assim como as respostas imunes humorais (IgE). A asma alérgica é dependente de uma resposta de IgE controlada por linfócitos T e B e activada pela interacção do antigénio com moléculas de IgE unidas a mastócitos.

Os resultados descritos no presente documento demonstram que a terapêutica com um anticorpo anti-TNF $\alpha$  é benéfica no tratamento da asma ou inflamação das vias respiratórias. Os resultados no presente documento demonstram que os sinais e sintomas clínicos associados com a asma podem melhorar através do tratamento com um anticorpo anti-TNF $\alpha$ . Como resultado, descrevem-se métodos para o tratamento da asma ou inflamação das vias respiratórias num indivíduo que compreende administrar, ao indivíduo, um anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou um fragmento de ligação ao antigénio do anticorpo anti-TNF $\alpha$  e métodos para tratar a inflamação das vias respiratórias associada com a asma. Descrevem-se métodos para reduzir a acumulação de células inflamatórias nos pulmões, num indivíduo que o necessita, e métodos para reduzir a acumulação de células inflamatórias, associadas com a asma, nos pulmões. Os sintomas, como é utilizado no presente documento, referem-

se a sensações subjectivas. Por exemplo, os sintomas incluem quando um doente padece dificuldade respiratória, opressão torácica, insónia. Os sinais, como é utilizado no presente documento, refere-se a que os mesmos se observam objectivamente. Por exemplo, os sinais incluem os resultados de ensaios pulmonares e outros realizados no laboratório.

#### Factor de Necrose Tumoral Alfa

O TNF $\alpha$  é um homotrímero solúvel de 17 kD de subunidades de proteínas (Smith et al, J.Biol. Chem., 262:6951-6954 (1987)). Também existe uma forma precursora do TNF $\alpha$  de 26 kD unida à membrana (Kriegler et al, Cell, 53:45-53 (1988)). Como revisão do TNF $\alpha$ , ver Beutler et al, Nature, 320 (6063): 584-588 (1986); Old, Science, 230: 630-632. (1986); e Le et al, Lab. Invest., 56:234 (1987).

O TNF $\alpha$  está produzido por uma diversidade de células que inclui monócitos e macrófagos, linfócitos, particularmente células da linhagem de linfócitos T (Vassalli, Annu. Rev. Immunol., 10:411-452 (1992)), neutrófilos (Dubravec et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6758-6761 (1990)), células epiteliais (Ohkawara et al, Am. J. Respir. Cell. Biol., 7:985-392 (1992)) e mastócitos (Shah et al, Clin. Exper. Allergy, 25:1038-1044 (1995); Gordon et al, Nature, 346:274-276 (1990); Gordon et al, J. Exp. Med, 174:103-10.7 (1991); Bradding et al, Am. J. Respir. Cell. Mol Biol., 10:471-480 (1994); Walsh et al, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 88:4220-4224 (1991); Benyon et al, J. Immunol., 147:2253-2258 (1991); e Ohkawara et al, Am. J. Respir. Cell. Biol., 7:985-392 (1992)). Também foram sugeridos os eosinófilos como uma fonte de TNF $\alpha$  (Costa et al, J. Clin. Invest., 91:2673-2684 (1993)).

#### Anticorpos Anti-TNF $\alpha$

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo anti-factor de necrose tumoral alfa, diminui, bloqueia, inibe, anula ou interfere com, a actividade de TNF $\alpha$  in



vivo. Numa execução preferencial, o anticorpo une-se especificamente ao antígeno. O anticorpo pode ser policlonal ou monoclonal, e o termo anticorpo pretende incluir anticorpos policlonais e monoclonais. Os termos policlonal e monoclonal referem-se ao grau de homogeneidade de uma preparação de anticorpos, e não pretendem limitar-se a métodos de produção particulares. Na presente invenção também se incluem anticorpos monocatenários e quiméricos, anticorpos humanizados ou primatizados (anticorpos enxertados na CDR, com ou sem alteração na estrutura), ou revestidos, bem como anticorpos quiméricos, enxertados na CDR ou monocatenários revestidos, que compreendem partes derivadas de diferentes espécies e semelhantes e o termo "anticorpo".

Numa execução particular, o anticorpo anti-TNF $\alpha$  é um anticorpo quimérico. Numa execução preferencial, o anticorpo anti-TNF $\alpha$  é o anticorpo monoclonal quimérico cA2 (ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) ou o anticorpo monoclonal murino A2 (ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) ou tem uma especificidade epitópica semelhante à do anticorpo quimérico cA2, anticorpo monoclonal murino A2 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que incluem anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que reagem com o mesmo ou com um epitopo funcionalmente equivalente sobre um TNF $\alpha$  humano que se une através do anticorpo quimérico cA2 ou anticorpo monoclonal murino A2, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Os anticorpos com uma especificidade epitópica semelhante à do anticorpo quimérico cA2 ou anticorpo monoclonal murino A2 incluem anticorpos que podem competir com o anticorpo quimérico cA2 ou o anticorpo monoclonal murino A2 (ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) para se unir ao TNF $\alpha$  humano. Esses anticorpos ou fragmentos podem obter-se como foi descrito anteriormente. O anticorpo quimérico cA2, anticorpo monoclonal murino A2 e

métodos para a obtenção destes anticorpos também são descritos em Le *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.656.272; Le *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.698.195; Patente dos Estados Unidos N° 5.919.452; Le, J. *et al*, Publicação Internacional N° WO 92/16553 (publicada no dia 1 de Outubro de 1992); Knight, D.M. *et al*, Mol. Immunol., 30:14 43-1453 (1993); e Siegel, S.A. *et al*, Cytokine, 7 (1): 15-25 (1995). O anticorpo quimérico cA2 também é conhecido como infliximab e REMICADE™.

O anticorpo quimérico cA2 consiste na região variável de ligação ao antigénio do anticorpo IgG1 de rato anti-TNF $\alpha$  humano neutralizante de elevada afinidade, denominado A2, e as regiões constantes de uma IgG1 humana, imunoglobulina kappa. A região Fc da IgG1 humana melhora a função efectora alogénica do anticorpo, aumenta a semi-vida circulante em soro e diminui a imuno-genicidade do anticorpo. A avidéz e especificidade epitópica do anticorpo quimérico cA2 provém da região variável do anticorpo murino A2. Numa execução particular, uma fonte preferencial de ácidos nucleicos que codificam a região variável do anticorpo murino A2 é a linha celular do hibridoma A2.

O A2 quimérico (cA2) neutraliza o efeito citotóxico do TNF $\alpha$  humano natural e recombinado de uma forma dependente da dose. A partir de ensaios de ligação do anticorpo quimérico cA2 e do TNF $\alpha$  humano recombinado, calculou-se que a constante de afinidade do anticorpo quimérico cA2 era de  $1,04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ . Em Harlow, *et al*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan *et al*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, New York, (1992, 1993); Kozbor *et al*, Immunol. Today, 4: 72-79 (1983); Ausubel *et al*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York (1987, 1992, 1993); e Muller, Meth. Enzymol., 92:589-601 (1983), podem encontrar-se métodos preferenciais

para determinar a especificidade e afinidade de anticorpos monoclonais por inibição competitiva.

Numa execução particular, o anticorpo quimérico cA2 provém de uma linha celular denominada c168A e o anticorpo monoclonal murino A2 provém de uma linha celular denominada c134A.

Na técnica descrevem-se exemplos adicionais de anticorpos anti-TNF $\alpha$  (ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos) (ver, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos N° 5,231,024; Möller, A. et al, Cytokine, 2(3):162-169 (1990); Rathjen et al, Publicação Internacional N° WO 91/02078 (publicada no dia 21 Fevereiro de 1991); Rubin et al, Publicação de Patente EPO N° 0 218 868 (publicada no dia 22 Abril de 1987); Yone et al, Publicação de Patente EPO N° 0 288 088 (26 Outubro de 1988); Liang, et al, Biochem. Biophys. Res. Comm., 137:847-854 (1986); Meager, et al, Hybridoma, 6:305-311 (1987); Fendly et al, Hybridoma, 6: 359-369 (1987); Bringman, et al, Hybridoma, 6:489-507 (1987); and Hirai, et al, J. Immunol. Meth., 96:57-62 (1987).

Os anticorpos adequados estão disponíveis, ou podem sensibilizar-se contra um imunogénio apropriado, como um antigénio isolado e/ou recombinado ou uma parte do mesmo (incluindo moléculas sintéticas, como péptidos sintéticos) ou contra uma célula hospedeira que expressa um antigénio recombinado. Além disso, como imunogénios, podem ser utilizadas células que expressam o antigénio recombinado, como células transfectadas, ou numa exploração para anticorpos que se unem ao receptor (ver, por exemplo, Chuntharapai et al, J. Immunol., 152: 1783-1789 (1994); e Chuntharapai et al, Patente dos Estados Unidos N°. 5.440.021).

A preparação de antigénios imunizantes e a produção de anticorpos policlonais e monoclonais podem realizar-se utilizando qualquer técnica adequada. Foram descritos

diferentes métodos (ver, por exemplo, Kohler et al, Nature, 256: 495-497 (1975) e Eur. J. Immunol., 6: 511-519 (1976); Milstein et al, Nature, 266: 550-552 (1977); Koprowski et al, Patente dos Estados Unidos N°. 4.172.124; Harlow, E. e D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); e Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verão de 94), Ausubel et al, Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11, (1991)). Geralmente um hibridoma pode produzir-se fundindo uma linha celular imortal adequada (por exemplo, uma linha celular de mieloma como SP2/0) com células produtoras de anticorpos. As células produtoras de anticorpos, preferentemente as do baço ou gânglios linfáticos, podem ser obtidas a partir de animais imunizados com o antigénio de interesse. As células fundidas (hibridomas) podem isolar-se utilizando condições de cultura selectivas e clonar-se por diluição limitante. As células que produzem anticorpos com a especificidade pretendida podem ser seleccionadas através de um ensaio adequado (por exemplo, ELISA).

Para produzir ou isolar anticorpos de especificidade necessária, incluindo anticorpos humanos, podem utilizar-se outros métodos adequados, que incluem, por exemplo, métodos através dos quais, a partir de uma biblioteca, é seleccionado um anticorpo recombinado, ou uma parte do mesmo, como, por exemplo, por tecnologia de apresentação de fagos (ver, por exemplo, Winters et al, Annu Rev. Immunol., 12:433-455 (1994); Hoogenboom et al, documento WO 93/06213; Hoogenboom et al, Patente dos Estados Unidos N° 5.565.332; documento WO 94/13804, publicado no dia 23 de Junho de 1994; Krebber et al, Patente dos Estados Unidos N° 5.514.548; e Dower et al, Patente dos Estados Unidos N° 5.427.908), ou que se baseiam na imunização de animais transgénicos (por exemplo, ratos) que podem produzir um repertório completo de anticorpos humanos (ver, por exemplo,

Jakobovits *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al*, Nature, 362: 255-258 (1993); Kucherlapati *et al*, Patente Europeia N° EP 0 463 151 B1; Lonberg *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.569.825; Lonberg *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.545.806; e Surani *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.545.807).

As diferentes partes de anticorpos monocatenários, quiméricos, humanizados ou primatizados (anticorpos enxertados à CDR com ou sem alterações na estrutura) ou anticorpos revestidos, assim como anticorpos quiméricos, monocatenários enxertados à CDR ou revestidos, que compreendem partes provenientes de diferentes espécies, podem unir-se entre si quimicamente por técnicas convencionais ou podem preparar-se como uma proteína contígua utilizando técnicas de modificação por engenharia genética. Por exemplo, para produzir uma proteína contígua, podem expressar-se ácidos nucleicos que codificam uma cadeia quimérica ou humanizada. Ver, por exemplo, Cabilly *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly *et al*, Patente Europeia N° 0.125.023 B1; Boss *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 4.816.397; Boss *et al*, Patente Europeia N° 0.120.694 B1; Neuberger, M.S. *et al*, WO 86/01533; Neuberger, M.S. *et al*, Patente Europeia N° 0.194.76 B1; Winter, Patente dos Estados Unidos N° 5.225.539; Winter, Patente Europeia N° 0.239.400 B1; Queen *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.585.089; Queen *et al*, Patente Europeia N° 0.451.216 B1; Adair *et al*, WO 91/09967, publicado no dia 11 Julho de 1991; Adair *et al*, Patente Europeia N° 0.460.167 B1; e Padlan, E.A. *et al*, Patente Europeia N° 0.519.596 A1. Ver também, Newman, R. *et al*, BioTechnology, 10: 1455-1460 (1992), respeitante a anticorpos primatizados, e Huston *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.091.513; Huston *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 5.132.405; Ladner *et al*, Patente dos Estados Unidos N° 4.946.778 e Bird, R.E. *et al*, Science,

242: 423-426 (1988)) respeitante a anticorpos monocatenários.

Além disso, também se podem produzir fragmentos de ligação ao antígeno dos anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpos quiméricos, humanizados, primatizados, revestidos ou monocatenários e semelhantes. Por exemplo, os fragmentos de ligação ao antígeno incluem, mas sem limitação, fragmentos como fragmentos Fv, Fab, Fab', e F(ab')<sub>2</sub>. Os fragmentos de ligação ao antígeno podem produzir-se por excisão enzimática ou por técnicas recombinadas, por exemplo. Por exemplo, a excisão com papaína ou pepsina pode criar fragmentos Fab ou F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. Os anticorpos também se podem produzir em diferentes formas truncadas utilizando genes de anticorpos em que se foi introduzido uma ou mais codões de terminação a montante do sítio de terminação natural. Por exemplo, pode conceber-se um gene quimérico que codifique uma parte da cadeia pesada de F(ab')<sub>2</sub> para incluir sequências de ADN que codificam o domínio CH<sub>1</sub> e a região de charneira da cadeia pesada.

Os anticorpos anti-TNF $\alpha$  adequados para a sua utilização na presente invenção caracterizam-se por uma elevada afinidade de ligação ao TNF $\alpha$  e baixa toxicidade (incluindo a resposta de anticorpo humano anti-murino (HAMA) e/ou anticorpo humano anti-quimérico (HACA)). Na presente invenção, é adequado para a sua utilização, um anticorpo em que as componentes individuais, como a região variável, região constante e estrutura, possuem individualmente e/ou colectivamente baixa imunogenicidade. Os anticorpos que se podem utilizar na invenção se caracterizam pela sua capacidade para tratar doentes durante períodos prolongados com uma boa a excelente melhoria dos sintomas e uma baixa toxicidade. A baixa imuno-genecidade e/ou alta afinidade, assim como outras propriedades não definidas, podem contribuir para os

resultados terapêuticos conseguidos. No presente documento, "baixa imunogenicidade" define-se como que se suscitam respostas de HACA ou HAMA significativas, menores a aproximadamente 75%, ou preferentemente menores a aproximadamente 50% dos doentes tratados e/ou que produzem baixos graus nos doentes tratados (menores a aproximadamente 300, preferentemente menores a aproximadamente 100, medido com um imunoensaio enzimático antigénico duplo) (ver, por exemplo, Elliott et al, Lancet 344: 1125-1127 (1994)).

Como é utilizado no presente documento, a expressão "região de ligação ao antigénio" refere-se à parte de uma molécula de anticorpo que contém os restos aminoacídicos que interagem com um antigénio e confere ao anticorpo a sua especificidade e afinidade pelo antigénio. A região de ligação ao antigénio inclui os restos aminoacídicos "flanqueantes" necessários para manter a conformação correcta dos restos de ligação ao antigénio.

O termo antigénio refere-se a uma molécula ou a uma parte de uma molécula que se pode unir a um anticorpo que adicionalmente pode induzir a um animal a produzir anticorpos que se pode unir selectivamente a um epitopo desse antigénio. Um antigénio pode ter um ou mais do que um epitopo.

O termo epitopo significa que se refere à parte do antigénio que pode reconhecer e unir-se a um anticorpo numa ou em mais das regiões de ligação do antigénio ao anticorpo. Os epitopos normalmente consistem em agrupamentos superficiais quimicamente activas de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares e têm características estruturais tridimensionais específicas bem como características de carga específicas. Por "inibição e/ou neutralização epitópica" refere-se a um epitopo, que quando se une a um anticorpo, dá como resultado a perda de actividade biológica da molécula que contém o epitopo, *in*

vivo ou *in vitro*, mais preferentemente *in vivo*, incluindo a ligação de TNF $\alpha$  a um receptor de TNF $\alpha$ .

#### Administração

Os anticorpos anti-TNF $\alpha$  podem ser administrados a um doente em diferentes formas. Numa execução preferencial, os anticorpos anti-TNF $\alpha$  administram-se por inalação (por exemplo, num inalante ou pulverizador ou como um vapor de nebulização). Outras vias de administração incluem vias intranasal, oral, intravenosa, incluindo infusão e/ou injeção em bólus, intradérmica, transdérmica (por exemplo, em polímeros de libertação lenta), intramuscular, interperitoneal, subcutânea, tópica, epidural, bucal, etc. Também podem ser utilizadas outras vias de administração adequadas, por exemplo, para conseguir a absorção através dos revestimentos epiteliais ou mucocutâneos. Os anticorpos também podem ser administrados por terapêutica genética, em que uma molécula de ADN que codifica uma proteína ou um péptido terapêutico particular, é administrado ao doente, por exemplo, através de um vector, que faz com que a proteína ou o péptido particular seja expressado e libertado a níveis terapêuticos *in vivo*. Por outro lado, os anticorpos anti-TNF $\alpha$  podem ser administrados juntamente com outras componentes de agentes biologicamente activos, como tensioactivos farmacologicamente aceitáveis (por exemplo, glicéridos), excipientes (por exemplo, lactose), portadores, diluentes e veículos. Se pretendido, também é possível adicionar determinados agentes adoçantes, aromatizantes e/ou corantes.

Os anticorpos anti-TNF $\alpha$  podem ser administrados a um indivíduo profiláctica ou terapêuticamente, antes de, simultaneamente com o sequencialmente com, outros regimes ou agentes terapêuticos (por exemplo, regimes de fármacos múltiplos). Os anticorpos anti-TNF $\alpha$  que se administram simultaneamente com outros agentes terapêuticos podem administrar-se na mesma ou em diferentes composições.



Os anticorpos anti-TNF $\alpha$  podem formular-se como uma solução, suspensão, emulsão ou pó liofilizado juntamente com um veículo parentérico farmacologicamente aceitável. São exemplos desses veículos a água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e albumina de soro humano a 5%. Também se podem utilizar liposomas e veículos não aquosos como óleos não voláteis. O veículo ou pó liofilizado pode conter aditivos que mantêm a isotonicidade (por exemplo, cloreto de sódio, manitol) e estabilizantes químicos (por exemplo, tampões e conservantes). A formulação pode esterilizar-se por técnicas habitualmente utilizadas. Numa execução preferencial, os anticorpos anti-TNF $\alpha$  administram-se por via intranasal (por inalação). Em Remington's Pharmaceutical Sciences descrevem-se portadores farmacêuticos adequados.

No presente documento, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio define-se como a quantidade, ou dose, de anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio que, quando é administrado a um indivíduo, é suficiente para conseguir eficácia terapêutica (por exemplo, uma quantidade suficiente para reduzir ou eliminar significativamente sintomas ou sinais ou os sintomas e sinais, associados com a asma ou inflamação das vias respiratórias). A dosagem administrada a um indivíduo variará de acordo com diferentes factores, incluindo as características farmaco-dinâmicas do anticorpo anti-TNF $\alpha$  particular e o seu modo e via de administração; tamanho, idade, sexo, saúde, peso corporal e dieta do receptor; natureza e grau dos sintomas da doença ou transtorno a tratar, tipo de tratamento simultâneo, frequência de tratamento e o efeito pretendido.

A quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada em doses únicas ou divididas (por exemplo, uma série de doses separadas por intervalos de dias, semanas ou

meses) ou numa forma de libertação prolongada, segundo factores como a natureza e grau dos sintomas, tipo de tratamento simultâneo e o efeito pretendido. Também podem ser utilizados outros regimes ou agentes terapêuticos junto com a presente invenção. O ajuste e utilização dos intervalos de dosagem estabelecidos encontram-se dentro das habilidades adequadas dos especialistas na técnica.

Após a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz, pode administrar-se ao indivíduo uma quantidade de manutenção do anticorpo anti-TNF $\alpha$ . Uma quantidade de manutenção é a quantidade de anticorpo anti-TNF $\alpha$  necessária para manter a redução ou eliminação dos sintomas e/ou signos conseguidos por a dose terapêuticamente eficaz. A quantidade de manutenção pode administrar-se em forma de monodose, ou como uma série de doses separadas por intervalos de dias ou semanas (doses divididas).

As segundas ou posteriores administrações podem administrar-se a uma dosagem que seja igual, menor ou maior à dose inicial ou prévia administrada ao indivíduo. Preferentemente, realiza-se uma segunda administração ou posterior durante ou imediatamente antes da recidiva ou um agravamento da doença ou sintomas da doença. Por exemplo, a segunda e posteriores administrações podem proporcionar-se de entre aproximadamente um dia a 30 semanas a partir da primeira administração. Se necessário, podem ser administradas ao indivíduo dois, três, quatro ou mais administrações totais.

As formas de dosagem (composição) adequadas para a administração interna contêm geralmente de aproximadamente 0,1 miligramas a aproximadamente 500 miligramas do princípio activo por unidade. Nestas composições farmacêuticas o princípio activo estará normalmente presente numa quantidade de aproximadamente 0,5-95% em peso com base no peso total da composição.

A presente invenção será representada a seguir através dos seguintes exemplos, que não pretendem ser, de forma alguma, limitadores.

#### EXEMPLOS

EXEMPLO 1 Efeitos de um anticorpo anti-TNF $\alpha$  monoclonal num modelo de rato para a asma alérgica.

O rato é uma espécie padrão que é utilizado em estudos farmacológicos pulmonares. O modelo murino para a asma alérgica utilizado nas experiências descritas no presente documento simula a asma humana nas suas características fenotípicas. Em particular, as duas doenças caracterizam-se por infiltração celular inflamatória peribrônquica, particularmente uma afluência de eosinófilos nos pulmões. Por isso, o modelo murino serve como uma boa aproximação à doença humana.

#### Anticorpo anti-TNF $\alpha$

O anticorpo anti-TNF $\alpha$  cV1q muG2a construiu-se em Centocor, Inc. (Malvern, PA). As células de hibridoma que libertam o anticorpo de ratazana anti TNF $\alpha$  murino V1q provinham de Meter Krammer do Centro de Pesquisa Contra o Cancro (German Cancer Research Center), Heidelberg, Alemanha (Echtenacher et al, J. Immunol. 145:3762-3766 (1990)). Foram clonados os genes que codificam as regiões variáveis das cadeias pesada e leveira do anticorpo V1q. A cadeia pesada clonada foi inserida em quatro vectores de expressão genética diferentes para codificar a cadeia pesada de cV1q com uma região constante de IgG1 humana, IgG3 humana, IgG1 murina ou IgG2a murina. A cadeia leveira V1q foi inserida noutro vector de expressão para codificar uma região constante de cadeia leveira kappa humana ou uma murina.

Transfectaram-se células de mieloma SP2/0 com as construções genéticas de cadeia leveira e pesada diferentes. Identificaram-se clones celulares produtores do anticorpo quimérico V1q (cV1q) ensaiando líquido

sobrenadante celular para a IgG humana ou murina utilizando ensaios convencionais ELISA. Para obter linhas celulares homogêneas, subclonaram-se clones de produção alta. As versões murinas da IgG1 e IgG2a denominaram-se C257A e C258 respectivamente. O anticorpo cV1q foi purificado do líquido sobrenadante celular por cromatografia de proteína A.

O anticorpo cV1 caracterizou-se medindo a sua afinidade pelo TNF $\alpha$  murino solúvel, ensaiando a sua capacidade para proteger a células WEHI da citotoxicidade do TNF $\alpha$  murino, examinando a sua capacidade para neutralizar ou unir-se à linfotóxina murina, comparando a capacidade das versões murinas de IgG1 e IgG2 $\alpha$  para desencadear a lise, mediada pelo complemento, de células que expressam TNF $\alpha$  murino transmembrana recombinado e, examinando a capacidade da versão humana de IgG1 para proteger os ratos de doses letais de LPS (endotoxina). O cV1q une-se ao TNF murino (muTNF) com alta afinidade, neutraliza o muTNF num ensaio de citotoxicidade de células WEHI, desencadeia uma citotoxicidade, mediada pelo complemento, de uma forma dependente do isotipo, de células que expressam muTNF transmembrana. Além disso, o cV1q não neutralizou a actividade citotóxica da linfotóxina murina. No seguinte procedimento experimental utilizou-se a versão murina de IgG2a do anticorpo cV1q e no presente documento denomina-se anticorpo cV1q muG2a.

#### Procedimento Experimental.

Os dias 0, 7 e 14, sensibilizaram-se cinquenta ratos BALb/CJ fêmea, com um peso de 15-23 gramas, de 7 semanas de idade, através de injeções intraperitoniais de 10  $\mu$ g de albumina de ovo (OA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) misturada numa suspensão de 1,6 mg de gel de hidróxido de alumínio (Intergen, Inc., Purchase, NY) em 0,2 ml de solução salina estéril. Esta suspensão preparou-se uma hora antes da injeção intraperitoneal a cada rato.

Os cinquenta ratos sensibilizados dividiram-se em cinco grupos (10 ratos/grupo) e trataram-se da seguinte forma:

Grupo	N	Tratamento
1	10	Sensibilizados, tratados com veículo (solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (PBS; Centocor, Inc., Malvern, PA)) - 10 ml/kg, por via intravenosa (i. v.), 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA.
2	10	Sensibilizados, tratados com anticorpo cV1q muG2a - 1 mg/kg, i.v., 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA.
3 <sup>a</sup>	10	Sensibilizados, tratados com anticorpo cV1q muG2a, 10 mg/kg, i.v., 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA.
4	10	Sensibilizados, tratados com dexametasona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) - 1 mg/kg, por via intraperitoneal (i. p.), 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA.
5	10	Sensibilizados e expostos a solução salina a 0,9%.
<sup>a</sup> Um animal morreu após o primeiro tratamento com cV1q muG2a (10 mg/kg, i.v.)		

Os ratos foram expostos a OA por exposição a OA aerossolizada no dia 21 (solução salina estéril a 5% p/v (Baxter, Inc., Chicago, IL)) durante 20 minutos. O aerossol criou-se através de um nebulizador PARI-Master (PARI-Respiratory, Richmond, VA). A saída deste ligou-se a uma pequena câmara Plexiglas® (Pena-Plas, Jessup, PA) que continha os animais.

No dia 24, setenta e oito horas após a exposição com aerossol a OA ou a solução salina, extraiu-se sangue aos animais por via retro-orbital e o soro foi recolhido e congelado para a análise de IgE total no soro. Após a extracção de sangue, os animais foram anestesiados com

uretano (0,2 g/kg) e foi realizada a lavagem broncoalveolar (LBA). Brevemente, descobriu-se a traqueia e foi introduzida uma cânula. Os pulmões foram lavados com solução salina equilibrada com Hank estéril 2 x 0,5 ml (HBSS; Gibco, Grand Island, NY) sem  $\text{Ca}^{2+}$  nem  $\text{Mg}^{2+}$ , que continha EDTA a 0,1%. Após 30 segundos, o líquido de lavagem foi recolhido, por aspiração cuidadosa, e agrupado por cada animal. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos a 5° C. Os sedimentos individuais reconstituíram-se com 1 ml de HBSS sem  $\text{Ca}^{2+}$  nem  $\text{Mg}^{2+}$ , que continha EDTA a 0,1%. A contagem de células totais e células brancas (eosinófilos) diferenciais na LBA, determinou-se utilizando um Technicon H1 (Roche Diagnostics, Suíça) e um porta-objectos celular, respectivamente.

O soro foi separado de cada amostra e foi ensaiado para determinar os anticorpos IgE através do ensaio de ELISA. Brevemente, revestiram-se placas de microtitulação com 100 µl de um anticorpo monoclonal de ratazana anti-IgE de rata e incubou-se durante 1 hora ( $\pm 15$  min) a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ) e durante uma noite a 4° C ( $\pm 2^\circ$ ). As placas foram bloqueadas com 300 µl de albumina de soro bovino (BSA) a 1% durante 1 hora ( $\pm 15$  min) a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ). As placas foram lavadas 5 vezes. O soro do ensaio foi diluído 1:3, 1:6, 1:12 e 1:24 com BSA a 1% em solução salina tamponada com fosfato mais Tween-20 a 0,05% (PBST). Às cavidades foram adicionados 100 µl do soro diluído, por duplicado, e incubaram-se durante 1,5 horas ( $\pm 15$  min) a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ). As cavidades exteriores, em torno da placa, não foram utilizadas para evitar os efeitos do perímetro. Adicionaram-se, a cada cavidade, 100 µl de IgE de coelho anti-rato e as placas incubaram-se durante 1,5 horas ( $\pm 15$  min) a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ). Adicionaram-se, a cada cavidade, 100 µl de IgG de cabra anti-coelho biotinilada e as placas incubaram-se durante 1,5 horas ( $\pm 15$  min) a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ).

Adicionou-se, a cada cavidade, peroxidase de rábano-silvestre conjugado com estreptavidina (100 µl) e as placas incubaram-se 15 minutos ( $\pm 2$  min) a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ). Entre cada incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBST. A cada cavidade foi adicionado substrato de peroxidase TMB (100 µl) e incubou-se a 37° C ( $\pm 2^\circ$ ). Para finalizar a reacção, a cada cavidade adicionaram-se 100 µl de ácido fosfórico 1M. Foi lida a absorvância a 450 nm utilizando um leitor UVMax Microplate de Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, CA). Com este ensaio processou-se uma curva padrão utilizando um anti-DNP monoclonal de IgE de rato (SPE-7) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Utilizando um ANOVA, compararam-se os níveis de células totais, eosinófilos e IgE em soro de diferentes grupos de tratamento seguido de um ensaio de comparação múltiplo (Zar, J.H., Biostatistical Analysis, Prentice Hall: Englewood, NJ, p. 185 (1984)).

Células totais, eosinófilos e IgE em soro

Na Tabela 1, são apresentados os níveis na LBA de células totais, eosinófilos e IgE total em soro, dos diferentes grupos de tratamento.

TABELA 1: Acumulação de células inflamatórias pulmonares induzidas por antigénio nos dados animais de ratos individuais

Grupo Número	Anima l Número	Peso corpora l (g)	Células totais ( $\times 10^6$ /ml)	EOS <sup>a</sup> ( $\times 10^6$ /ml)	EOS <sup>a</sup> (% do total)	IgE total em soro (ng/ml)
1	1	22	0,87	0,50	57	328
	2	21	0,6	0,23	39	218
	3	21	2,19	1,20	55	243
	4	21	0,97	0,44	45	419
	5	21	0,47	0,14	30	305

	6	21	0,16	0,09	58	242
	7	20	0,80	0,48	60	292
	8	19	1,30	0,81	62	241
	9	19	0,28	0,12	44	366
	10	20	0,62	0,23	37	410
	1	22	0,87	0,50	57	328
	2	21	0,6	0,23	39	218
	3	21	2,19	1,20	55	243
	4	21	0,97	0,44	45	419
	5	21	0,47	0,14	30	305
	6	21	0,16	0,09	58	242
	7	20	0,80	0,48	60	292
	8	19	1,30	0,81	62	241
	9	19	0,28	0,12	44	366
	10	20	0,62	0,23	37	410
2	11	21	0,68	0,22	33	159
	12	20	0,60	0,16	27	124
	13	22	0,55	0,05	9	134
	14	21	0,92	0,35	38	208
	15	15	0,79	0,04	5	312
	16	23	0,68	0,12	18	345
	17	22	0,55	0,14	25	116
	18	21	0,68	0,08	12	280
	19	20	0,68	0,13	19	250
	20	21	0,67	0,11	16	402
3	21	20	0,58	0,12	20	325
	22	18	0,67	0,01	2	269
	23	19	-	-	-	-
	24	21	0,06	0	4	361
	25	20	0,07	0,02	22	316
	26	21	0,69	0,01	1	374
	27	20	0,55	0,15	27	173
	28	21	0,47	0,06	13	130
	29	21	1,07	0,33	31	502



	30 <sup>b</sup>	20	0,02	-	-	502
4	31	19	0,57	0,11	20	284
	32	20	0,24	0,01	5	553
	33	21	0,31	0,01	2	545
	34	22	0,80	0,32	40	106
	35	20	0,31	0,05	17	105
	36	22	0,53	0,09	17	254
	37	20	0,88	0,43	49	136
	38	20	0,73	0,16	22	191
	39	21	0,51	0,08	15	149
	40	18	0,45	0,01	2	154
5	41	19	0,76	0	0	184
	42	21	0,06	0	0	230
	43	19	0,33	0	0	157
	44	20	0,42	0	0	262
	46	21	0,70	0,01	1	348
	47	18	0,50	0	0	176
	48	21	0,59	0	1	133
	49	20	0,54	0	0	119
	50	19	0,35	0,01	2	63
<sup>a</sup> EOS = eosinófilos <sup>a</sup> Animal morto encontrado um dia após a exposição a OA <sup>b</sup> Animal não incluído nos dados do resumo						

Como é representado no Gráfico 1, uma exposição de 20 minutos a OA (5%) em ratos sensibilizados, produziu um aumento aproximado de duas vezes de células totais na LBA em comparação com os ratos expostos a solução salina. Na lavagem broncoalveolar, os eosinófilos aumentaram desde praticamente 0, em ratos expostos a solução salina, a  $0,42 \pm 0,11 \times 10^6$ , 72 horas após a exposição a OA (Gráfico 1). O aumento de células totais na LBA, 72 horas após a exposição a OA, resultou principalmente do aumento de eosinófilos (Gráfico 2). Como é representado no Gráfico 3, os níveis

totais de IgE em soro aumentaram 56% após a exposição a antigénio, em ratos sensibilizados, em comparação com ratos sensibilizados expostos a solução salina.

O controlo positivo, dexametasona (1mg/kg, i. p., um anti-inflamatório esteróide) administrado 1 hora antes e de 24 a 48 horas após a exposição a OA inibiu aumentos induzidos por antigénio em células totais e eosinófilos 36% e 69%, respectivamente, em comparação com o grupo tratado com veículo (Gráfico 1). A dexametasona também produziu uma redução de 30% nos níveis de IgE totais em soro em comparação com o grupo tratado com veículo (Gráfico 3).

A administração intravenosa do anticorpo cV1q muG2a, um anticorpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ , a 1 e 10 mg/kg, 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a antigénio (exposição a OA) produziu uma redução de 18% e de 37%, respectivamente em células totais em comparação com o grupo tratado com veículo (Gráfico 1) ( $0,52 \pm 0,09 \times 10^6/\text{ml}$  no grupo tratado com 10 mg/kg de anti-TNF $\alpha$  face a  $0,83 \pm 0,18 \times 10^6/\text{ml}$  no grupo tratado com veículo, NS). Além disso, a administração do anticorpo cV1q muG2a a 1 e 10 mg/kg inibiu os aumentos induzidos por antigénio (induzidos por OA) em eosinófilos na LBA 67% e 79% respectivamente em comparação com os animais tratados com veículo (Gráfico 1) ( $0,09 \pm 0,04 \times 10^6/\text{ml}$  no grupo tratado com 10 mg/kg de anti-TNF $\alpha$  face a  $0,42 \pm 0,11 \times 10^6/\text{ml}$  no grupo tratado com veículo,  $p < 0,05$ ). Estes resultados indicam que, em ratos sensibilizados, o anticorpo anti-TNF $\alpha$  modula a acumulação de células inflamatórias pulmonares induzida por antigénio.

Em resumo, a administração intravenosa do anticorpo cV1q muG2a a 1 e 10 mg/kg, 1 hora antes e de 24 a 48 horas após a exposição a OA produziu uma redução de 67% e 79%, respectivamente, de eosinófilos na LBA em comparação com animais tratados com veículo. Por isso, o tratamento com anticorpo anti-TNF $\alpha$  produz uma redução significativa no número de células totais e eosinófilos na LBA.

### Cinética farmacológica

Analisaram-se concentrações do anticorpo cVlq nas amostras de soro por imuno-ensaio enzimático (EIA). Em resumo, revestiu-se um anticorpo monoclonal anti-idiotípico específico para o anticorpo cVlq (Lote SM970109; Centocor, Inc., Malvern, PA) sobre uma placa de microtitulação de 96 cavidades. Depois as placas foram lavadas e bloqueadas com albumina de soro bovino a 1% (BSA)/ solução salina tamponada com fosfato (PBS) para evitar a ligação não específica. Esta solução bloqueante foi retirada. Adicionaram-se à placa padrões de anticorpo cVlq muG2a e amostras de ensaio diluídas para uma incubação de 2 horas. As placas foram lavadas e adicionaram-se às cavidades uma versão biotinilada de um anticorpo monoclonal anti-cVlq diferente para uma incubação de duas horas. As placas foram lavadas e incubadas com um conjugado de estreptavidina com peroxidase de rábano-silvestre durante um terceiro período de incubação. Realizou-se uma etapa de desenvolvimento de cor enzimática final utilizando, como substrato, o-fenilendiamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O desenvolvimento de cor deteve-se adicionando ácido sulfúrico 4N e a leitura da absorvância lumínica leu-se utilizando um espectrofotômetro de placa de microtitulação a 490nm. As concentrações padrão do anticorpo cVlq e os seus correspondentes valores de densidade óptica utilizaram-se para construir uma curva padrão através de um ajuste de mínimos quadrados criado informaticamente segundo uma equação de quatro parâmetros. Depois, as concentrações do anticorpo cVlq na amostra determinaram-se utilizando a curva padrão e o factor de diluição em soro para esta amostra.

### Resultados

Na Tabela 2, na fila superior e inferior, são apresentadas as concentrações do anticorpo cVlq nas

amostras de soro e na LBA, respectivamente, dos ratos tratados com 1 e 10 mg/kg do anticorpo cV1q.

TABELA 2: Concentrações do anticorpo cV1q em soro e no LBA ( $\mu\text{g/ml}$ )

Anticorpo cV1q muG2a (1 mg/kg. i. v.)											
Rat o	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Médi a $\pm$ DT
Sor o	29,7	28,5	37,6	23,8	23,4	26,7	21,0	31,2	21,4	27,8	27,1 $\pm$ 5,06
LBA	0,04 2	0,05 5	<0,0 4	0,06 9	0,11 8	0,06 2	0,05 5	0,07 1	0,11 9	0,07 6	0,06 7 $\pm$ 0,03 5
Anticorpo cV1q muG2a (10 mg/kg, i. v.)											
Rat o	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	Médi a $\pm$ DT
Sor o	317	282	NS	295	4 02	289	301	291	257	284	302 $\pm$ 40,8
LBA	1,65	0,53 7	NS	0,62 6	0,17 6	0,39 1	0,42 9	0,30 6	0,85 1	<0,0 4	0,55 $\pm$ 0,48
NS = Sem amostra											

As amostras de soro e de lavagem broncoalveolar (LBA) do grupo de controlo com veículo em (=10) não apresentou níveis detectáveis do anticorpo cV1q muG2a (cV1q) ( $<0.04 \mu\text{lg/ml}$ ). Após múltiplas administrações intravenosas ( $n=3$ ) de anticorpo cV1q a 1mg/kg, as amostras de soro destes ratos tratados com o anticorpo ( $n=10$ ) tinham uma média  $\pm$  desvio padrão de concentração do anticorpo cV1q de  $27.1 \pm$

5.06 µg/ml; as amostras de LBA destes ratos apresentaram uma média de concentração de anticorpo cV1q  $0,067 \pm 0,035$  µg/ml. A concentração média do anticorpo cV1q em soro (n=9) após múltiplas administrações intravenosas (n=3) de 10 mg/kg do anticorpo, era de  $302 \pm 40,8$  µg/ml; a concentração média do anticorpo cV1q das amostras de LBA destes ratos era de  $0,55 \pm 0,48$  µg/ml.

As concentrações determinadas do anticorpo cV1q das amostras de rato de soro e de LBA confirmam um tratamento dependente da dose com anticorpo anti-TNFα e que o anticorpo pode detectar-se na LBA após uma administração intravenosa.

EXEMPLO 2 Acumulação de células inflamatórias pulmonares induzida por antigénio no rato: avaliação histopatológica

Realizou-se uma avaliação histopatológica nos pulmões de ratos fêmea Balb/CJ sensibilizados.

Procedimento Experimental

Sensibilizaram-se vinte em ratos fêmea Balb/CJ de semanas de idade por injeções intraperitoniais de 10 µg de OA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) misturado em 1,6 mg de suspensão de gel de hidróxido de alumínio (Intergen, Inc., Purchase, NY) em 0,2 ml de solução salina estéril os dias 0,7 e 14. Esta suspensão foi preparada uma hora antes da injeção intraperitoneal a cada rato.

Os vinte sensibilizados dividiram-se em dois grupos (10 ratos/grupo). A um grupo de ratos foi administrado por via intravenosa 10 mg/kg de anticorpo cV1q muG2a (Grupo 2) 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA. Ao outro grupo de ratos administrou-se por via intravenosa 10 ml/kg de PBS de Dulbecco (Centocor, Inc., Malvern, PA) (veículo) (Grupo 1) 1 hora antes e 24 e 48 horas após a exposição a OA. Os ratos foram expostos a OA (antigénio) por exposição aerossolizada no dia 21 (5% p/w em solução salina (Baxter, Inc., Chicago, IL) durante 20 minutos. O aerossol criou-se através de um nebulizador PARI-Master

(PARI-Respiratory, Richmond, VA). A saída do mesmo ligou-se a uma pequena câmara Plexiglas® (Pena-Plas, Jessup, PA) que continha os animais.

Setenta e dois horas após a exposição ao antígeno, os ratos foram sacrificados e retirados e os pulmões preenchidos com formalina neutra tamponada (NBF; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 10%. Depois, os pulmões foram introduzidos em parafina e foram tingidos com hematoxilina e eosina. As mudanças microscópicas foram classificadas numa escala de um a quatro (mínimo, ligeiro/leve, moderado e marcado/intenso) consoante a gravidade da mudança.

## Resultados

As mudanças microscópicas que não foram possíveis classificar se indicaram como Presente (P). Na Tabela 3 apresentam-se todas as descobertas microscópicas.

TABELA 3: Mudanças Microscópicas nos Pulmões dos Ratos

[illegible]

Grupo/Tratamento	Grupo 1									
Macrófagos										
* CÓDIGO DE INTENSIDADE: 1 = MÍNIMO, 2 = LIGEIRO, 3 = MODERADO, 4 = INTENSO, P = PRESENTE										

TABELA 3: Mudanças Microscópicas nos Pulmões dos Ratos  
(continuação)

Grupo/Tratamento	Grupo 2									
Animal número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PULMÕES*										
Leucócitos	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
Edema perivascular	1			1					1	
Vasos mineralizados, focais			P							
Leucócitos intersticiais	1	1			1					
Depósitos eosinofílicos intersticiais	2	1			1	1	2	1		
Leucócitos alveolares	1	1			1				1	1
Macrófagos alveolares				2	1		1		1	1
Hemorragia alveolar										2
Leucócitos pleurais	2	2			1				2	2
Macrófagos pleurais										4
Gânglios linfáticos peribronquiais										
Macrófagos						3				4
* CÓDIGO DE INTENSIDADE: 1 = MÍNIMO, 2 = LIGEIRO, 3 = MODERADO, 4 = INTENSO, P = PRESENTE										

As acumulações de células inflamatórias estavam presentes e foram enumeradas em três áreas dos pulmões de ratos individuais nos dois grupos do ensaio. As acumulações de leucócitos avaliaram-se nos tecidos perivasculares em torno dos vasos nas áreas bronquiais, nos tecidos intersticiais das áreas alveolares e nos tecidos pleural/subpleural. Nos dois grupos, alguns ratos apresentaram edema perivascular em torno dos vasos nas áreas bronquiais. Ratos individuais nos dois grupos apresentaram depósitos eosinofílicos de tipo fibrina nos capilares dos tecidos intersticiais. Os números 6 e 10 dos ratos do Grupo 2 apresentaram acumulações moderadas e intensas, respectivamente, de macrófagos com tinção eosinofílica nos nódulos linfáticos peribronquiais. O número 10 dos ratos do grupo 2, também apresentou acumulações intensas de macrófagos com tinção eosinofílica nos tecidos pleurais e tecidos peribronquiais junto com células inflamatórias.

Como um grupo, quando se comparou com o Grupo 1 (ratos tratados com veículo), análises histopatológicas revelaram redução significativa no número de leucócitos perivasculares, leucócitos intersticiais e leucócitos pleurais nos ratos do Grupo 2 (ratos tratados com cVlq). Estes resultados demonstram que, em ratos sensibilizados, o anticorpo anti-TNF $\alpha$  modula a acumulação de células inflamatórias pulmonares induzida por antigénio.

EXEMPLO 3 Terapêutica com Infliximab para a Asma Resistente a Esteróides.

Uma mulher de 53 anos (N.L.) com doença pulmonar obstrutiva crónica leve e asma grave dependente de esteróides, desenvolveu um agravamento da asma durante várias semanas apesar do tratamento intensivo com 40 mg de prednisona por via oral, esteróides inalados, ipratropium inalado, albuterol inalado, salmeterol inalado, teofilina e zileuton oral. Os efeitos secundários deste substancial mas



ineficaz programa incluíram aumento de peso, diminuição da espessura da pele e hematoma.

O tratamento com infliximab estabeleceu-se de acordo com a Tabela 4.

TABELA 4: Infusão com Infliximab (Doente N.L.)

Dia	Número de infusão	Dose de Infusão (mg)	Dose acumulativa (mg)
0	1	200	200
4	2	200	400
16	3	400	800
45	4	400	1.200

A doente recebeu quatro infusões de um total de 1200 mg de infliximab durante o período de tratamento.

#### Resultados

Houve uma diminuição dos sintomas da asma, cese de despertares nocturnos, uma redução da utilização de esteróides e menos dependência à medicação inalada. Esta melhoria começou às 24 horas da terapêutica com infliximab e documenta-se na Tabela 5, o diário da doente.

TABELA 5: Diário da doente

Dia	Sintomas asmáticos após de 24 horas*	Número de vezes que acordou a noite passada pela asma	Número de descargas de Proventil utilizadas nas últimas 24 horas	Número de tratamentos de nebulizações utilizadas nas últimas 24 horas	Utilização de esteróides (dose total diária) (mg)	Pontuação de fluxo máximo (ml/min) **	
						AM	PM
2	4	1	6	4	20	200	160
3	2	0	0	2	15	200	400
4	2	0	0	2	15	205	400
5	2	0	0	2	10	275	400
6	2	0	2	2	10	255	400
7	2	0	0	2	0	200	400

Dia	Sintomas asmáticos após de 24 horas*	Número de vezes que acordou a noite passada pela asma	Número de descargas de Proventil utilizadas nas últimas 24 horas	Número de tratamentos de nebulizações utilizadas nas últimas 24 horas	Utilização de esteróides (dose total diária) (mg)	Pontuação de fluxo máximo (ml/min)**	
						AM	PM
8	2	0	0	1	10	205	400
9	2	0	0	2	0	205	400
10	2	0	0	2	10	200	400
11	2	0	2	2	0	195	400
12	2	0	0	2	10	195	400
13	2	0	0	2	0	245	400
14	2	0	0	1,5	10	225	400
15	2	0	0	2	0	245	400
16	2	0	0	2	10	200	400P/350A
17	2	0	0	2	0	180P/160A	400/310
18	2	0	0	2	10	220/200	400/320
19	2	0	0	2	0	370/225	400/320
20	2	0	0	2	10	370/270	400/340
21	2	0	0	2	0	305/260	400/330
22	2	0	0	2	10	230/200	400/350
23	2	0	0	2	0	205/240	400/330
24	2	0	0	2	10	250/210	400/340
25	2	0	0	2	0	220/200	400/350
26	2	0	0	2	10	175/200	400/355
27	2	0	0	2	0	200/210	400/350
28	2	0	0	3	10	235/210	400/350
29	2	0	0	2	0	225/200	400/340
30	4	0	0	3	10	200/ 170	300/280
31	2	0	0	2	0	180/180	400/330
32	2	0	0	2	10	225/ 190	400/350
33	1	0	0	2	0	275/250	400/340
34	1	0	0	2	10	210/240	400/345

Dia	Sintomas asmáticos após de 24 horas*	Número de vezes que acordou a noite passada pela asma	Número de descargas de Proventil utilizadas nas últimas 24 horas	Número de tratamentos de nebulizações utilizadas nas últimas 24 horas	Utilização de esteróides (dose total diária) (mg)	Pontuação de fluxo máximo (ml/min)**	
						AM	PM
35	2	0	0	2	0	300/200	400/340
36	2	0	0	2	10	230/220	400/350
37	1	0	0	2	0	275/250	400/350
38	1	0	0	2	10	210/190	400/340
39	1	0	0	2	0	245/ 180	400/335
40	1	0	0	2	10	195/ 180	400/340
41	1	0	0	2	0	180/ 170	400/350
42	3	0	0	2	10	230/210	400/340
43	3	0	0	2	0	235/210	400/340
44	2	0	0	2	10	190/ 170	380/290
45	-	0	-	-	0	175/ 180	-
<p>* As pontuações dos sintomas asmáticos realizaram-se cada manhã utilizando a seguinte escala:</p> <p>0 = Sem sintomas durante o dia</p> <p>1 = Sintomas durante um período curto durante o dia</p> <p>2 = Sintomas durante dois ou mais períodos curtos durante o dia</p> <p>3 = Sintomas durante a maior parte do dia que não influíram nas actividades normais diárias</p> <p>4 = Sintomas durante a maior parte do dia que influíram nas actividades normais diárias</p> <p>5 = Sintomas tão graves que causam ausência ao trabalho ou não poder realizar as actividades normais diárias</p> <p>** As pontuações de fluxos máximos mediram-se utilizando um fluxómetro pediátrico ou um fluxómetro pediátrico (P) e um fluxómetro adulto (A), como se indica.</p>							

A pontuação de fluxo máximo é a maior velocidade do fluxo de ar registada para a doente como se mede numa

espirometria. A diferença das pontuações de fluxo máximo de 160 a 200 ml/min anteriores ao tratamento, durante o programa de tratamento com infliximab registaram-se máximos de 340 a 400 ml/min. As pontuações de fluxo máximo mais altas são melhores que as pontuações mais baixas.

Durante o tratamento com infliximab, não foi necessário albuterol inalado. Além disso, o esteróide utilizado reduziu-se a 10 mg cada dois dias.

A qualidade de vida da doente melhorou enormemente quando recebeu infliximab. Por exemplo, comparando a qualidade vida das respostas da doente, a asma da doente controlou-se bem e os despertares nocturnos tinham desaparecido dois dias após o tratamento com infliximab.

A Tabela 6 representa a melhoria objectiva em estudos de função pulmonar.

TABELA 6: Ensaios de Função Pulmonar (doente N.L.)

Dia	Capacidade Voluntária Forçada	Volume Expiratório Forçado em	FEV <sub>1</sub> /CVF	Fluxo Expiratório Forçado
2 (início)	54%	33%	56%	13%
16 (tratamento)	82%	60%	73%	25%
22 (tratamento)	71%	50%	57%	22%
28 (tratamento)	79%	55%	57%	23%
36 (tratamento)	87%	66%	61%	32%
45 (tratamento)	80%	54%	67%	22%

A capacidade voluntária forçada (CVF) é uma medição de fluxo expiratório. O volume expiratório forçado em 1

segundo ( $VEF_1$ ) é a quantidade máxima de ar que o doente pode soprar num 1 segundo. O fluxo expiratório forçado (FEF 25-75) é uma medição da velocidade entre o primeiro e terceiro quarto de segundo. Os valores mais elevados são melhores que os valores mais baixos. Os valores de VEF observados foram os mais elevados documentados pela doente durante o seu cuidado aproximado de dois anos.

Esta doente de 53 anos teve uma melhoria imediata e prolongada tanto nos sinais como nos sintomas do tratamento resistente à asma durante a terapêutica com infliximab. A terapêutica com infliximab reduziu ou eliminou a necessidade de terapêuticas ineficazes ou mal toleradas.

**DOCUMENTOS CITADOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos citados pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente citados na descrição**

- WO 9208474 A [0005] [0025]
- WO 9846642 A [0006] • EP 0463151 B1 [0025]
- WO 9104054 A [0007] • US 5569825 A, Lonberg
- US 5656272 A, Le [0018] [0025]
- US 5698195 A, Le [0018] • US 5545806 A, Lonberg
- US 5919452 A [0018] [0025]
- WO 9216553 A, Le, J. [0018] • US 5545807 A, Surani
- [0018] [0025]
- US 5231024 A [0022] • US 4816567 A, Cabilly
- WO 9102078 A, Rathjen [0026]
- [0022] • EP 0125023 B1 [0026]
- EP 0218868 A, Rubin • US 4816397 A, Boss [0026]
- [0022] • EP 0120694 B1 [0026]
- EP 0288088 A, Yone [0022] • WO 8601533 A, Neuberger,
- US 5440021 A, M.S. [0026]
- Chuntharapai [0023] • EP 0194276 B1 [0026]
- US 4172124 A, Koprowski • US 5225539 A, Winter
- [0024] [0026]
- WO 9306213 A, Hoogenboom • EP 0239400 B1 [0026]
- [0025] • US 5585089 A, Queen
- US 5565332 A, Hoogenboom [0026]
- [0025] • EP 0451216 B1 [0026]
- WO 9413804 A [0025] • WO 9109967 A, Adair
- US 5514548 A, Krebber [0026]
- [0025] • EP 0460167 B1 [0026]
- US 5427908 A, Dower • EP 0519596 A1 [0026]

- US 5091513 A, Huston  
[0026]
- US 5132405 A, Huston  
[0026]

- US 4946778 A, Ladner  
[0026]

#### Literatura não relacionada com patentes citada na descrição

- **Shah et al.** *Clin. Exper. Allergy*, 1995, vol. 25, 1038-1044 [0003] [0016]
- **Wheeler et al.** *J. Appl. Physiol.*, 1990, vol. 68, 2542-2549 [0003]
- **Kips et al.** *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, vol. 145, 332-336 [0003]
- **Yates et al.** *Thorax*, 1993, vol. 48, 1080 [0003]
- **Hosselet et al.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, vol. 149, A957 [0003]
- **Holgate.** *Eur. Respir. J.*, 1993, vol. 6, 1507-1520 [0011]
- **Corrigan ; Kay.** *Immunology Today*, 1992, vol. 13, 501-507 [0012]
- **Flavahan et al.** *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, vol. 138, 685-688 [0012]
- **Smith et al.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 6951-6954 [0015]
- **Kriegler et al.** *Cell*, 1988, vol. 53, 45-53 [0015]
- **Beutler et al.** *Nature*, 1986, vol. 320 (6063), 584-588 [0015]
- **Old.** *Science*, 1986, vol. 230, 630-632 [0015]
- **Le et al.** *Lab. Invest.*, 1987, vol. 56, 234 [0015]
- **Vassalli.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1992, vol. 10, 411-452 [0016]
- **Dubravec et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6758-6761 [0016]
- **Ohkawara et al.** *Am. J. Respir. Cell. Biol.*, 1992, vol. 7, 985-392 [0016]
- **Gordon et al.** *Nature*, 1990, vol. 346, 274-276 [0016]
- **Gordon et al.** *J. Exp. Med*, 1991, vol. 174, 103-10.7 [0016]
- **Bradding et al.** *Am. J. Respir. Cell. Mol Biol.*, 1994, vol. 10, 471-480 [0016]

- **Walsh et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1991, vol. 88, 4220-4224 [0016]
- **Benyon et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 2253-2258 [0016]
- **Costa et al.** *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 91, 2673-2684 [0016]
- **Knight, D.M. et al.** *Mol. Immunol.*, 1993, vol. 30, 1443-1453 [0018]
- **Siegel, S.A. et al.** *Cytokine*, 1995, vol. 7 (1), 15-25 [0018]
- **Harlow et al.** *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0020]
- *Current Protocols in Immunology*. Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1992 [0020]
- **Kozbor et al.** *Immunol. Today*, 1983, vol. 4, 72-79 [0020]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Inter-science, 1987 [0020]



**REIVINDICAÇÕES**

1. Um anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a sua utilização no tratamento da asma resistente a esteróides num indivíduo que necessita do tratamento, compreendendo esse anticorpo uma região constante humana, em que esse anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio inibe competitivamente a ligação do cA2 (REMICADE® infliximab) ao TNF $\alpha$  humano.
2. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que essa asma resistente a esteróides está associada a uma acumulação de células inflamatórias nos pulmões desse indivíduo que necessita do tratamento.
3. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o anticorpo é um anticorpo quimérico.
4. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo quimérico é o anticorpo monoclonal cA2 (REMICADE® infliximab).
5. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que esse fragmento é seleccionado do grupo que consiste em Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv.
6. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que esse anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio é da classe IgG1 de imunoglobulina.
7. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de

acordo com a reivindicação 1, em que esse anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio é administrado ao ser humano através de administração parentérica.

8. O anticorpo o fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que esse anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio é administrado ao ser humano através da inalação, administração intranasal, infusão, administração intravenosa, administração subcutânea ou administração intramuscular.

9. O anticorpo ou fragmento ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que esse anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio é administrado numa quantidade terapêuticamente eficaz, compreendendo a quantidade terapêuticamente eficaz uma dose única ou dividida que contém aproximadamente de 0,1 mg a 500 mg desse anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio.

10. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que esse anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio é administrado numa quantidade terapêuticamente eficaz, compreendendo a quantidade terapêuticamente eficaz quatro infusões de um total de 1200 mg desse anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio.

11. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que esse anticorpo compreende uma região constante humana e esse anticorpo anti-TNF $\alpha$  ou fragmento de ligação ao antigénio (i) compreende as regiões de cA2 (REMICADE® infliximab) de ligação ao antigénio e (ii) liga-se a um epitopo neutralizante de TNF $\alpha$  humano com uma afinidade de  $1,04 \times$

$10^{10}$  litros/mol, medido como uma constante de associação ( $K_a$ ).

12. Uma composição que compreende o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1 e um veículo farmacologicamente aceitável.

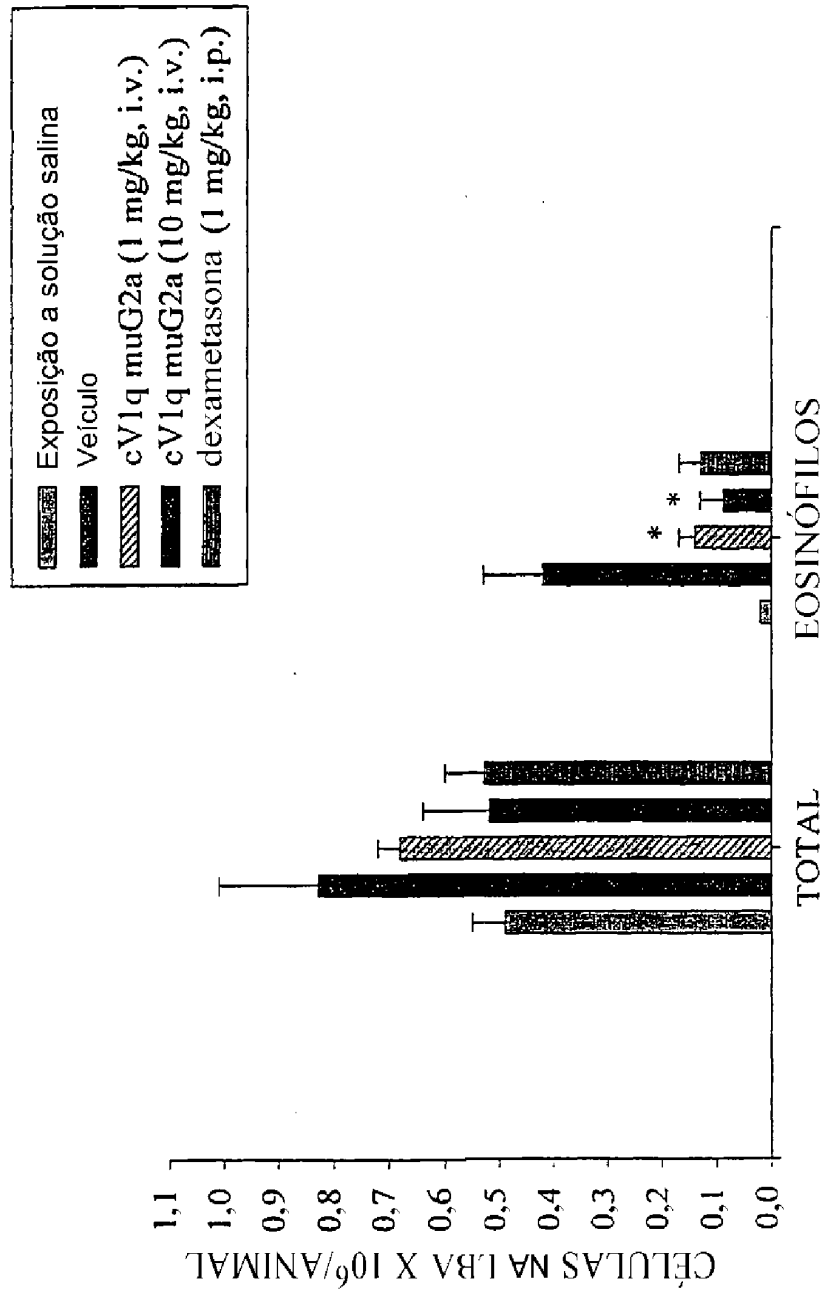


Fig. 1

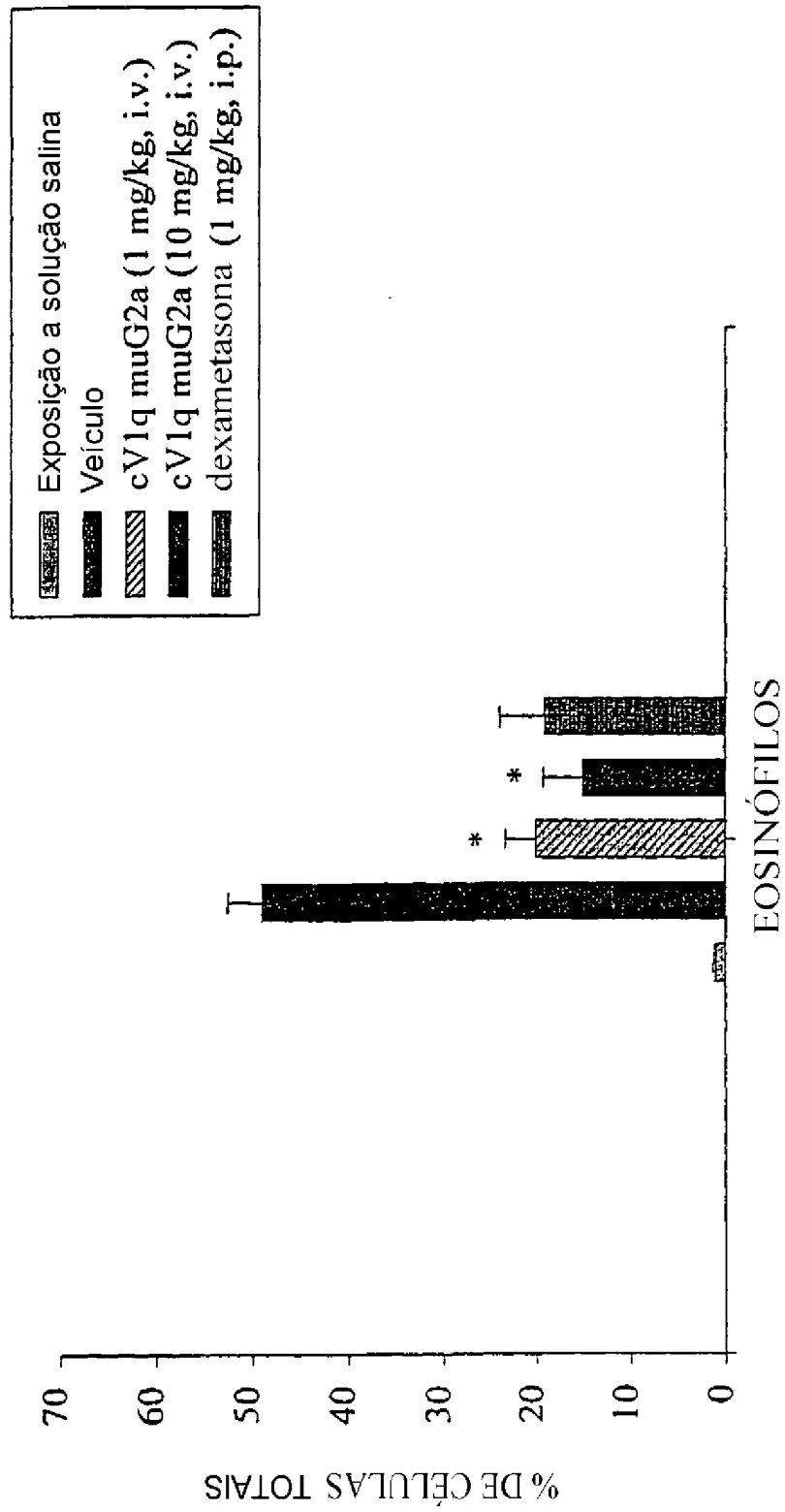


Fig. 2

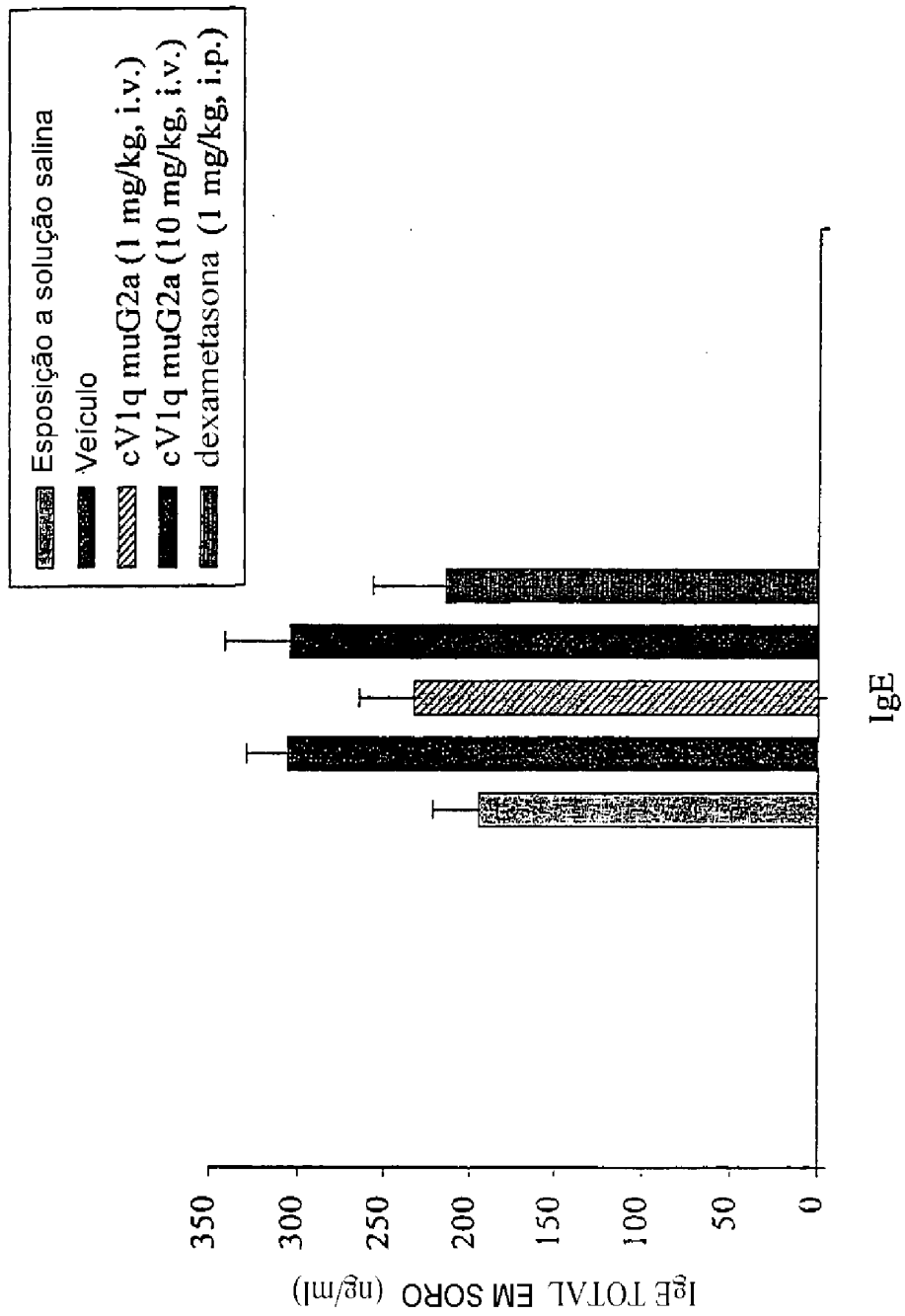


Fig. 3