



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 213 816**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **97903485 .7**
96 Fecha de presentación : **17.02.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0882067**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.1998**

54 Título: **Métodos de tratamiento de enfermedades vasculares con antagonistas de TNF.**

30 Prioridad: **16.02.1996 US 602272**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.09.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **06.11.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **06.11.2009**

73 Titular/es:
THE KENNEDY INSTITUTE OF RHEUMATOLOGY
1 Aspenlea Road
Hammersmith, London W6 8LH, GB

72 Inventor/es: **Elliott, Michael James Herdman;**
Maini, Ravinda Nath y
Feldmann, Marc

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 213 816 T5

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de enfermedades vasculares con antagonistas de TNF.

5 Las plaquetas y el fibrinógeno juegan papeles esenciales en la formación de los coágulos sanguíneos (trombos). Las plaquetas primero se adhieren a macromoléculas presentes en las regiones subendoteliales de un vaso sanguíneo dañado; y después se agregan para formar el nido de un trombo. La agregación plaquetaria está mediada por la unión del fibrinógeno a la glicoproteína de la membrana de las plaquetas activadas receptor IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Las plaquetas estimulan la activación local de factores de la coagulación plasmáticos, que conduce a la conversión del
10 fibrinógeno unido al receptor GP IIa/IIIb en monómeros de fibrina que polimerizan para formar la matriz (coágulo de fibrina) de un trombo.

Ciertos estudios epidemiológicos han demostrado que los niveles elevados de fibrinógeno en plasma está asociados con el infarto de miocardio agudo, insuficiencia cardíaca isquémica, mortalidad coronaria, apoplejía en hombres, trombosis venosa profunda y tromboflebitis (Meade *et al.*, *Eur. Heart J.* 16 Suppl A:31-35 (1995); Meade *et al.*, *Br. Med. Bull.* 33:283-288 (1977); Meade *et al.*, *Lancet* ii:533-537 (1986); Wilhelmsen *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 311:501-505 (1984); Kannel *et al.*, *JAMA* 258 1183-1186 (1987); Stone y Thorp, *J.R. Coll. Gen. Pract.* 35:565-569 (1985); Balleisen *et al.*, *Lancet* ii:461 (1987); Lee *et al.*, *J. Clin. Epidemiol.* 43:913-919 (1990); Moller y Kristensen, *Arterioscler. Thromb.* 11:344-350 (1991); Broadhurst *et al.*, *Atherosclerosis* 85:169-173 (1990); Handa *et al.*, *Atherosclerosis* 77:209-213 (1989)).
15

Los niveles aumentados de receptores GP IIa/IIIb plaquetarios también están asociados con el infarto de miocardio agudo (Brown *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.* 24 Suppl. 1:9-15 (1994); Giles *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.* 24:69-72 (1994)).

25 Las plaquetas juegan un papel importante en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas que típicamente subyacen a la enfermedad de las arterias coronarias, aneurisma aórtico, enfermedad arterial de las extremidades inferiores y enfermedad cerebrovascular.

De esta manera, los niveles circulantes elevados de fibrinógeno y/o plaquetas son factores de riesgo independientes
30 que son al menos tan significativos como el colesterol o la hipertensión para enfermedades vasculares, tales como la enfermedad cardíaca coronaria y la enfermedad cerebrovascular.

Sumario de la invención

35 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la inhibición de la actividad biológica del factor de necrosis tumoral α (TNF α) reduce los niveles de fibrinógeno y de plaquetas en individuos con artritis reumatoide activa. Como resultado del descubrimiento de los solicitantes, se proporciona el uso de un anticuerpo quimérico cA2 del factor de necrosis tumoral (TNF).

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B son representaciones gráficas de resultados que muestran el efecto del TNF α sobre la interleuquina-6 (IL-6) circulante. La figura 1A muestra un perfil detallado de tiempo/respuesta en el día 0 y 1, con los tiempos medios de muestreo indicados. La figura 1B muestra cambios en la IL-6 circulante en los tres mismos grupos
45 de pacientes a más largo plazo.

La figura 2 es una representación gráfica de resultados que muestran el efecto del bloqueo de TNF α sobre el amiloide A sérico circulante (SAA).

50 La figura 3 es una representación gráfica de resultados que muestran la velocidad de cambio en la IL-6 circulante y en proteínas de fase aguda.

Las figuras 4A-4B son representaciones gráficas de dispersión que muestran las relación entre la IL-6 circulante y la proteína C reactiva (CRP). La figura 4A muestra la relación entre la IL-6 circulante y la CRP en 73 pacientes antes del tratamiento (coeficiente de correlación de rangos de Spearman ($\rho=0,55$, $p<0,002$)). La figura 4B muestra la relación entre la reducción en la IL-6 circulante en el día 3 y la reducción en la CRP durante el mismo periodo en los 73 pacientes ($\rho=0,59$, $p<0,002$).

Descripción detallada de la invención

60 Muchos pacientes con artritis reumatoide (RA) finalmente mueren por enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Aunque indudablemente otros factores también contribuyen al exceso de mortalidad cardiovascular y cerebrovascular observada en RA (Wolfe, *et al.*, *Arthritis Rheum.* 37:481-494 (1994)), los niveles persistentemente elevados de fibrinógeno y/o plaquetas en plasma son contribuyentes principales a estas enfermedades.

65 Las plaquetas y el fibrinógeno juegan papeles integrales en la formación de los coágulos sanguíneos (trombos). Típicamente, la formación de un coágulo sanguíneo empieza con la adhesión de plaquetas a macromoléculas en las regiones subendoteliales de los vasos sanguíneos dañados. La adhesión de las plaquetas está mediada por receptores

de la superficie de las plaquetas que se unen a proteínas de la matriz extracelular en el subendotelio expuesto, tales como el factor de von Willebrand, colágeno, fibronectina, vitronectina y laminina. La adhesión de las plaquetas da como resultado una monocapa de plaquetas. Posteriormente se produce una activación de las plaquetas en respuesta a agonistas tales como epinefrina, adenosina difosfato (ADP), colágeno y trombina. La activación conduce a la exposición de los receptores GP IIb/IIIa sobre la superficie de las plaquetas. Entonces quedan disponibles receptores GP IIb/IIIa sobre las plaquetas activadas que se unen a proteínas adhesivas, típicamente fibrinógeno. Posteriormente, las plaquetas se agregan para formar el coágulo hemostático primario.

La agregación plaquetaria está mediada, al menos en parte, por entrecruzamiento de receptores GP IIb/IIIa por el fibrinógeno sobre membranas de plaquetas adyacentes. El fibrinógeno unido a los receptores GP IIb/IIIa se escinde por la trombina para dar monómeros de fibrina que después polimerizan para formar la matriz del coágulo sanguíneo. La formación de la trama de fibrina (coágulo de fibrina) proporciona un refuerzo y estabilización del tapón de plaquetas en el sitio de la rotura vascular.

En circunstancias normales, los coágulos sanguíneos sirven para prevenir el escape de células sanguíneas del sistema vascular, un efecto deseable tras la producción de una herida en un vaso sanguíneo. Sin embargo, durante ciertos estados de enfermedad, los coágulos pueden restringir u obstruir totalmente el flujo sanguíneo produciendo necrosis celular.

El trabajo descrito en este documento demuestra claramente el resultado sorprendente de que el bloqueo de TNF α a corto plazo conduce a una normalización de los niveles de fibrinógeno en muchos pacientes y sugiere que los niveles de fibrinógeno pueden controlarse por medio de un bloqueo eficaz de TNF a largo plazo. El resultado sorprendente de que el bloqueo de TNF α a corto plazo conduce a una normalización de los niveles de plaquetas se describió en el documento US-A-5698195; Elliott *et al.*, *Arthritis Rheum.* 36:1681-1690 (1993); y Elliott *et al.*, *Lancet* 344:1105-1110 (1994).

El documento WO-A-9621447 es un documento relevante según el Art. 54(3)EPC y describe el uso de compuestos de carboestirilo para la inhibición del TNF- α .

El documento WO-A-9115451 describe derivados de fenil-cicloalcanos y fenil-cicloalquenos.

El documento EP-A-0486809 describe el uso de suramina contra enfermedades relacionadas con el TNF.

Exp. Opin Ther. Patents (1995) 5(10), Davidsen S.K. et al., es una revisión de inhibidores de la síntesis de TNF α .

El documento WO-A-9519957 describe derivados del ácido hidroxámico como inhibidores de metaloproteinasas.

El documento WO-A-94-10990 describe metaloproteinasas en la inhibición de la producción del TNF.

El documento EP-A-0626389 describe anticuerpos recombinantes específicos por TNF- α .

El documento EP-A-0453898 se refiere a anticuerpos anti-TNF.

El documento EP-A-0260610 se refiere a anticuerpos monoclonales contra el TNF humano.

Al reducirse los niveles plasmáticos de fibrinógeno y de plaquetas se reduce el riesgo de desarrollar muchos trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares y trombóticos. De esta manera, el desarrollo o progresión de estos trastornos puede prevenirse o reducirse con el bloqueo a largo plazo del TNF. Los trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares y trombóticos también pueden tratarse con el bloqueo a largo plazo del TNF.

La presente invención se refiere al uso de antagonistas del factor de necrosis tumoral para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la trombosis o de enfermedades o patologías que se pueden tratar por medio de la reducción del fibrinógeno en plasma. Como se usa en este documento, un "trastorno cardiovascular" incluye infarto de miocardio agudo y trastornos trombóticos cardíacos tales como trombosis venosa profunda y tromboflebitis. Como se usa en este documento, un "trastorno cerebrovascular" incluye trastornos vasculares relacionados con el cerebro, tales como apoplejía.

Como se usa en este documento, un "trastorno trombótico" es una afección en la que un componente patógeno es una trombosis. Por ejemplo, un "trastorno trombótico" incluye trastornos tromboembólicos (por ejemplo, tromboembolia pulmonar), sucesos isquémicos (por ejemplo, ataque isquémico transitorio), apoplejía, infarto de miocardio agudo, trombosis venosa profunda y tromboflebitis.

La presente invención también se refiere a un método para reducir el fibrinógeno en plasma en un individuo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TNF al individuo. El antagonista de TNF se une con alta afinidad al TNF α en el individuo, ocasionando una reducción del fibrinógeno en plasma en el individuo. Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo, la administración del anticuerpo quimérico A2 (cA2) a 49 pacientes produjo una reducción significativa del fibrinógeno en plasma en muchos de los pacientes.

La presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir trombosis. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para prevenir trombosis en embolia pulmonar, sucesos isquémicos (por ejemplo, ataque isquémico transitorio), trombosis venosa profunda, cirugía de bypass coronario, cirugía para insertar una prótesis de válvula o vaso (por ejemplo, en injertos de vasos autólogos, no autólogos o sintéticos) o despliegue de un stent vascular (coronario o periférico). La invención también puede usarse para tratar y/o prevenir una oclusión, reoclusión, estenosis y/o reestenosis de vasos sanguíneos. Por ejemplo, la invención puede usarse para tratar y/o prevenir la reaparición de trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares y/o trombóticos.

El TNF α , una citoquina pleiotrópica liberada por células T activadas y macrófagos, se expresa como una proteína madura de 17 kDa que es activa como un trímero (Smith, R.A. y Baglioni, C. *J. Biol. Chem.* 262:6951-6954 (1987)). Las citoquinas triméricas tales como el TNF α y la proteína altamente relacionada linfotóxica (TNF β), ejercen su actividad biológica por medio de la agregación de sus receptores de la superficie celular. El trímero TNF se une a los receptores presentes en la superficie celular produciendo un entrecruzamiento localizado de los receptores de TNF proporcionando agrupamientos necesarios para la transducción de señales. Como se usa en este documento, un “antagonista del factor de necrosis tumoral” reduce, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad del TNF *in vivo*. Por ejemplo, un antagonista de TNF adecuado puede unirse al TNF e incluye anticuerpos anti-TNF y moléculas receptoras que se unen específicamente al TNF. Un antagonista de TNF adecuado también puede prevenir o inhibir la síntesis de TNF y/o la liberación de TNF, e incluye compuestos tales como talidomida, tenidap, e inhibidores de fosfodiesterasa, tales como, pero sin limitación, pentoxifilina y rolipram. Un antagonista de TNF adecuado que puede prevenir o inhibir la síntesis del TNF y/o la liberación del TNF también incluye potenciadores del receptor de adenosina A2b y agonistas del receptor de adenosina A2b (por ejemplo, 5'-(N-ciclopropil)-carboxamidoadenosina, 5'-N-etilcarboxamidoadenosina, ciclohexiladenosina y R-N⁶-fenil-2-propiladenosina). Véase, por ejemplo, Jacobson (documento GB 2 289 218 A). Un antagonista de TNF adecuado también puede prevenir y/o inhibir la señalización del receptor de TNF.

Anticuerpos Anti-TNF

Los anticuerpos anti-TNF incluyen anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados, rectificados y recombinantes, y fragmentos de los mismos, que se caracterizan por una unión de alta afinidad al TNF y por una baja toxicidad (incluyendo la respuesta de anticuerpo humano anti-murino (HAMA) y/o anticuerpo humano anti-quimérico (HACA)). En particular, en la presente invención es útil un anticuerpo en el que los componentes individuales, tales como la región variable, la región constante y la región de entramado, poseen individual y/o colectivamente baja inmunogenicidad. El anticuerpo cA2 se caracteriza por su capacidad de tratar pacientes durante períodos prolongados con un alivio de buen o excelente de los síntomas y con una baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o la alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos.

Un ejemplo de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad es el anticuerpo monoclonal murino (mAb) A2 y anticuerpos que inhiben competitivamente *in vivo* la unión al TNF α humano del mAb A2 anti-TNF α murino o un anticuerpo que tenga substancialmente las mismas características de unión específicas, así como fragmentos y regiones de los mismos. En los documentos US-A-6284471; US-A-5656272; US-A-5919452; US-A-5698195, y Le, J. *et al.*, Publicación Internacional N° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992) se describe el anticuerpo monoclonal murino A2 y derivados quiméricos del mismo.

Un segundo ejemplo de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad es el mAb murino 195 y anticuerpos que inhiben competitivamente *in vivo* la unión al TNF α humano del anticuerpo anti-TNF α murino 195 o un anticuerpo que tenga substancialmente las mismas características de unión específica, así como fragmentos y regiones de los mismos. Otros anticuerpos monoclonales de alta afinidad útiles en los métodos de la presente invención incluyen el mAb murino 114 y el mAb murino 199 y anticuerpos que inhiben competitivamente *in vivo* la unión al TNF α humano del mAb 114 o mAb 199 anti-TNF α murino o un anticuerpo que tenga substancialmente las mismas características de unión específica del mAb 114 o del mAb 199, así como fragmentos y regiones de los mismos. Möller, A. *et al.*, (*Cytokine* 2(3): 162-169 (1990)) describe anticuerpos monoclonales murinos 114, 195 y 199 y el método para su producción. Pueden encontrarse métodos preferidos para determinar la especificidad del mAb y la afinidad por la inhibición competitiva en 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. y 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); y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983).

En la técnica se describen otros ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-TNF (véase, por ejemplo, Rathjen *et al.*, Publicación Internacional N° WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991); Rubin *et al.*, Publicación de Patente EPO 0218868 (publicada el 22 de abril de 1987); Yone *et al.*, Publicación de Patente EPO 0288088 (26 de octubre 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); Hirai *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987); Moller, *et al.*, *Cytokine* 2:162-169 (1990), bibliografía que se incorpora completamente en este documento como referencia).

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina caracterizados por dos o más segmentos o porciones procedentes de especies animales diferentes. En general, la región variable del anticuerpo quimérico procede de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como un mAb murino, y la región constante de inmunoglobulina procede

de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, se selecciona una región variable con baja inmunogenicidad y se combina con una región constante humana que también tiene baja inmunogenicidad, teniendo también preferiblemente la combinación baja inmunogenicidad. “Baja” inmunogenicidad se define en este documento como una elevación significativa de las respuestas HACA o HAMA en menos de aproximadamente el 75%, o preferiblemente en menos de aproximadamente el 50% de los pacientes tratados y/o la elevación de bajas titulaciones en el paciente tratado (menor que aproximadamente 300, preferiblemente menor que aproximadamente 100 medido con un inmunoensayo enzimático de doble antígeno) (Elliott *et al.*, *Lancet* 344:1125-1127 (1994)).

Como se usa en este documento, la expresión “anticuerpo quimérico” incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes disulfuro con una cadena L quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H2L2) formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente disulfuro. También puede producirse un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región CH que forme agregados (por ejemplo, procedente de una cadena H de IgM, o una cadena μ).

Los anticuerpos comprenden cadenas de inmunoglobulina individuales pesadas (H) y/o ligeras (L). Una cadena H quimérica comprende una región de unión a antígenos derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico por el TNF, que está unida a al menos una porción de una región C de cadena H (CH), tal como CH1 o CH2. Una cadena L quimérica comprende una región de unión a antígenos derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico por TNF, unida a al menos una porción de una región C de cadena L humana (CL).

En la técnica se han descrito anticuerpos quiméricos y métodos para su producción (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne *et al.*, *Nature* 312:643-646 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 314:268-270 (1985); Taniguchi *et al.*, Solicitud de Patente Europea 171496 (publicada el 19 de febrero de 1985); Morrison *et al.*, Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Neuberger *et al.*, Solicitud PCT WO 86/01533, (publicada el 13 de marzo de 1986); Kudo *et al.*, Solicitud de Patente Europea 184187 (publicada el 11 de junio de 1986); Morrison *et al.*, Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Sahagan *et al.*, *J. Immunol* 137:1066-1074 (1986); Robison *et al.*, Publicación Internacional N° PCT/US86/02269 (publicada el 7 de mayo de 1987); Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443 (1987); Sun *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 (1987); Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988); y Barlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988).

El anticuerpo quimérico anti-TNF puede comprender, por ejemplo, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, comprendiendo cada una de las cadenas al menos parte de una región constante humana y al menos parte de una región variable (V) de origen no humano que tiene especificidad por el TNF humano, uniéndose dicho anticuerpo con alta afinidad a un epítipo de inhibición y/o neutralización del TNF humano, tal como el anticuerpo cA2. El anticuerpo también incluye un fragmento o un derivado de tal anticuerpo, tal como una o más porciones de la cadena de anticuerpo, tal como las regiones constantes o variables de la cadena pesada, o las regiones constantes o variables de la cadena ligera.

La humanización y la rectificación del anticuerpo pueden reducir adicionalmente la inmunogenicidad del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Winter (Patente de Estados Unidos N° 5.225.539 y documento EP 239.400 B1), Padlan *et al.* (documento EP 519.596 A1) y Pedersen *et al.* (documento EP 592.106 A1).

El anticuerpo cA2 útil en los métodos de la presente invención es un anticuerpo quimérico anti-TNF humano-murino de alta afinidad, y fragmentos o regiones del mismo, que tiene una potente actividad inhibidora y/o neutralizadora *in vivo* contra el TNF α humano. Tales anticuerpos y anticuerpos quiméricos pueden incluir los generados por inmunización usando TNF α recombinante purificado o fragmentos peptídicos del mismo que comprenden uno o más epítopos.

El anticuerpo quimérico es cA2 y anticuerpos que inhiben competitivamente *in vivo* la unión al TNF α humano del mAb A2 anti-TNF α murino, el mAb quimérico cA2, o un anticuerpo que tiene substancialmente las mismas características de unión específica, así como fragmentos y regiones de los mismos. El mAb quimérico cA2 se ha descrito, por ejemplo, en los documentos US-A-6284471; US-A-5656272; US-A-5919452; US-A-5698195, y por Le, J. *et al.*, (Publicación Internacional N° WO 92/16553 (publicado el 1 de octubre de 1992); Knight, D.M. *et al.* (*Mol. Immunol.* 30:1443-1453 (1993)); y Siegel, S.A. *et al.* (*Cytokine* 7(1): 15-25 (1995)).

El anticuerpo quimérico A2 anti-TNF consta de la región variable de unión a antígenos del anticuerpo IgG1 de ratón anti-TNF humano neutralizador de alta afinidad, denominado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina kappa IgG1 humana. La región Fc de la IgG1 humana mejora la función efectora del anticuerpo alogénico, aumenta la vida media en suero circulante y reduce la inmunogenicidad del anticuerpo. La aidez y la especificidad de epítipo del A2 quimérico procede de la región variable del A2 murino. El anticuerpo A2 quimérico neutraliza el efecto citotóxico del TNF humano tanto natural como recombinante de una manera dependiente de la dosis. A partir de ensayos de unión de cA2 y TNF humano recombinante, se calcula una constante de afinidad de cA2 de $1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Pueden encontrarse métodos preferidos para determinar la especificidad y afinidad del mAb por la inhibición competitiva en 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. and 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); y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983).

Como se usa en este documento, la expresión “región de unión a antígenos” se refiere a la porción de una molécula de anticuerpo que contiene los restos aminoacídicos que interaccionan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La región de anticuerpo incluye los restos aminoacídicos de “entramado” necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígenos. Generalmente, la región de unión a antígenos será de origen murino. En otras realizaciones, la región de unión a antígenos puede proceder de otra especie animal, tal como oveja, conejo, rata o hámster. Las fuentes preferidas para el ADN que codifica tal anticuerpo no humano incluyen líneas celulares que producen anticuerpos, preferiblemente líneas celulares híbridas conocidas comúnmente como hibridomas. En una realización, un hibridoma preferido es la línea de células de hibridoma A2.

Un “antígeno” es una molécula o una porción de una molécula que puede unirse por un anticuerpo y que además puede inducir en un animal la producción de anticuerpos capaces de unirse selectivamente a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo.

El término “epítipo” pretende hacer referencia a la porción del antígeno que puede reconocerse y unirse por un anticuerpo en una o más de las regiones de unión a antígenos del anticuerpo. Los epítipos normalmente constan de agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Por “epítipo inhibidor y/o neutralizador” se entiende un epítipo que, cuando se une a un anticuerpo, produce una pérdida de actividad biológica de la molécula que contiene el epítipo, *in vivo* o *in vitro*, más preferiblemente *in vivo*, incluyendo la unión del TNF a un receptor de TNF. Se han identificado epítipos de TNF dentro de los aminoácidos 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 56 a aproximadamente 77, de aproximadamente 108 a aproximadamente 127 y de aproximadamente 138 a aproximadamente 149. Preferiblemente, el anticuerpo se une a un epítipo que comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos del TNF dentro de los restos de TNF de aproximadamente 87 a aproximadamente 107, de aproximadamente 59 a aproximadamente 80 o una combinación de los mismos. Generalmente, los epítipos incluyen al menos aproximadamente 5 aminoácidos y menos de aproximadamente 22 aminoácidos que abarcan o solapan con una o más de estas regiones.

Por ejemplo, los epítipos de TNF que se reconocen y/o se unen con actividad anti-TNF a un anticuerpo, y fragmentos y regiones variables del mismo, incluyen:

59-80: Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile
(SEC ID N°: 1);

y/o

87-108: Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly
(SEC ID N°: 2).

Los anticuerpos anti-TNF, y fragmentos y regiones variables de los mismos, que se reconocen y/o se unen con actividad anti-TNF a esos epítipos bloquean la acción del TNF α sin unirse al supuesto locus de unión al receptor como se presenta por Eck y Sprang (*J. Biol. Chem.* 264(29): 17595-17605 (1989) (aminoácidos 11-13, 37-42, 49-57 y 155-157 de hTNF α)). Rathjen *et al.*, Publicación Internacional WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991), describe ligandos de TNF que pueden unirse a epítipos adicionales de TNF.

Producción de Anticuerpos Usando Hibridomas

Las técnicas para inducir anticuerpos contra secuencias peptídicas pequeñas que reconocen y se unen a esas secuencias en forma libre o conjugada o cuando se presentan como una secuencia nativa en el contexto de una proteína grande son bien conocidas en la técnica. Tales anticuerpos pueden producirse por técnicas de hibridoma o recombinantes conocidas en la técnica.

También se han descrito anticuerpos murinos que pueden usarse en la preparación de los anticuerpos en Rubin *et al.*, documento EP0218868 (publicado el 22 de abril de 1987); Yone *et al.*, documento EP0288088 (publicado el 26 de octubre 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); Hirai *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987); Möller, *et al.*, *Cytokine* 2:162-169 (1990).

Las fusiones celulares se realizan por procedimientos convencionales bien conocidos por los especialistas en el campo de la inmunología. Las líneas celulares compañeras de fusión y los métodos para fusionar y seleccionar hibridomas y para la selección de los mAb son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel *infra*, Harlow *infra*, y Colligan *infra*, cuyos contenidos se incorporan completamente en este documento como referencia.

El mAb murino específico para TNF α puede producirse en grandes cantidades por medio de la inyección de células de hibridoma o transfectoma que secretan el anticuerpo en la cavidad peritoneal de ratones y, después de un tiempo apropiado, la recolección del líquido ascítico que contiene una alta titulación del mAb, y el aislamiento del mAb a partir de dicho líquido. Para tal producción *in vivo* del mAb con un hibridoma (por ejemplo, rata o humano), las células de hibridoma preferiblemente se cultivan en ratones desnudos irradiados o atímicos. Como alternativa, los anticuerpos pueden producirse cultivando las células de hibridoma o transfectoma *in vitro* y aislando el mAb secretado del medio de cultivo de células o de forma recombinante, en células eucariotas o procariotas.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que reconoce un epítipo reconocido por A2. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico denominado quimérico A2 (cA2).

Útil en los métodos de la presente invención, el anticuerpo quimérico cA2 se produce por una línea celular denominada c168A. c168A se depositó en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland como un "Depósito de Cultivo Seguro".

Los "fragmentos" de los anticuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica a los tejidos que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Estos fragmentos se producen a partir de anticuerpos intactos usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Expresión Recombinante de Anticuerpos Anti-TNF

Pueden producirse anticuerpos recombinantes y/o quiméricos murino-humano o humano-humano que inhiben TNF usando técnicas conocidas basadas en las enseñanzas proporcionadas en los documentos US-A-6284471; US-A-5656272; US-A-5919452; US-A-5698195 y Le, J. *et al.*, Publicación Internacional N° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992), bibliografía que se incorpora completamente en este documento como referencia. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, N.Y. (1987, 1992, 1993); y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Véase también, por ejemplo, Knight, D.M., *et al.*, *Mol. Immunol* 30:1443-1453 (1993); y Siegel, S.A. *et al.*, *Cytokine* 7(1): 15-25 (1995).

El ADN que codifica un anticuerpo anti-TNF puede ser ADN genómico o ADNc que codifica al menos una de las siguientes: la región constante de la cadena pesada (Hc), la región variable de la cadena pesada (Hc), la región variable de la cadena ligera (Lv) y la región constante de la cadena ligera (Lc). Una alternativa conveniente al uso de fragmentos de genes cromosómicos como fuente de ADN que codifica el segmento de unión a antígeno de la región V murina es el uso de ADNc para la construcción de genes de inmunoglobulinas quiméricas, por ejemplo, como se informa por Liu *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439 (1987) y *J. Immunology* 139:3521 (1987)). El uso de ADNc requiere que los elementos de expresión génica apropiados para la célula hospedadora se combinen con el gen para conseguir la síntesis de la proteína deseada. El uso de secuencias de ADNc es ventajoso con respecto a las secuencias genómicas (que contienen intrones), ya que las secuencias de ADNc pueden expresarse en bacterias u otros hospedadores que carecen de los sistemas de empalme de ARN apropiados. A continuación se proporciona un ejemplo de tal preparación.

Como el código genético es degenerado, puede usarse más de un codón para codificar un aminoácido particular. Usando el código genético pueden identificarse uno o más oligonucleótidos diferentes, siendo cada uno de ellos capaz de codificar el aminoácido. La probabilidad de que un oligonucleótido particular efectivamente constituya la secuencia codificante XXX real puede estimarse considerando relaciones de emparejamiento de bases anormales y la frecuencia con la que realmente se usa un codón particular (para codificar un aminoácido particular) en células eucariotas o procariotas que expresan un anticuerpo o fragmento anti-TNF. Tales "reglas de uso de codones" se describen por Lathe, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 183:1-12 (1985). Usando las "reglas de uso de codones" de Lathe, se identifica un solo oligonucleótido o una serie de oligonucleótidos que contiene una secuencia de nucleótidos "más probable" teórica capaz de codificar secuencias de regiones variables o constantes de anticuerpos anti-TNF.

Aunque ocasionalmente una secuencia de aminoácidos puede codificarse por un solo oligonucleótido, frecuentemente la secuencia de aminoácidos puede codificarse por cualquiera de una serie de oligonucleótidos similares. De forma importante, aunque todos los miembros de esta serie contienen oligonucleótidos que son capaces de codificar el fragmento peptídico y, de esta manera, contienen la misma secuencia oligonucleotídica que el gen que codifica el fragmento peptídico, sólo un miembro de la serie contiene la secuencia de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen. Como este miembro está presente dentro de la serie, y es capaz de hibridar con el ADN incluso en presencia de los otros miembros de la serie, es posible emplear la serie no fraccionada de oligonucleótidos de la misma manera que si se empleara un solo oligonucleótido para clonar el gen que codifica la proteína.

El oligonucleótido, o serie de oligonucleótidos, que contiene la secuencia teórica "más probable" capaz de codificar un anticuerpo anti-TNF o un fragmento que incluye una región variable o constante, se usa para identificar la secuencia de un oligonucleótido o serie de oligonucleótidos complementarios que es capaz de hibridar con la secuencia o serie

de secuencias “más probable”. Un oligonucleótido que contenga tal secuencia complementaria puede emplearse como sonda para identificar y aislar el gen de la región variable o constante del anticuerpo anti-TNF (Sambrook, *et al.*, *infra*).

Un oligonucleótido adecuado, o serie de oligonucleótidos, que es capaz de codificar un fragmento de la región variable o constante del anticuerpo anti-TNF (o que es complementario a tal oligonucleótido o serie de oligonucleótidos) se identifica (usando el procedimiento descrito anteriormente), sintetiza e hibrida por medios bien conocidos en la técnica, contra un ADN o, más preferiblemente, una preparación de ADNc derivada de células que son capaces de expresar anticuerpos anti-TNF o regiones variables o constantes de los mismos. Pueden sintetizarse moléculas de oligonucleótido monocatenarias complementarias a las secuencias codificantes “más probables” del péptido de la región variable o constante del anticuerpo anti-TNF usando procedimientos que son bien conocidos para los especialistas habituales en la técnica (Belagaje, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 254:5765-5780 (1979); Maniatis, *et al.*, *En: Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression*, Nierlich, *et al.*, Eds., Acad. Press, NY (1976); Wu, *et al.*, *Frog. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.* 21:101-141 (1978); Khorana, *Science* 203:614-625 (1979)). Además, puede conseguirse una síntesis de ADN por medio del uso de sintetizadores automáticos. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y Haynes *et al.*, en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985) describen técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Ciertas técnicas tales como, o similares a las descritas anteriormente han permitido clonar satisfactoriamente genes para aldehído deshidrogenasas humanas (Hsu, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3771-3775 (1985)), fibronectina (Suzuki, *et al.*, *Bur. Mol. Biol. Organ. J* 4:2519-2524 (1985)), el gen del receptor de estrógenos humano (Walter, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7889-7893 (1985)), el activador de plasminógeno de tipo tisular (Pennica, *et al.*, *Nature* 301:214-221 (1983)) y el ADN complementario de la fosfatasa alcalina placentaria humana (Keun, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8715-8719 (1985)).

En una forma alternativa de clonación de un polinucleótido que codifica una región variable o constante anti-TNF, se prepara una biblioteca de vectores de expresión por clonación de ADN o, más preferiblemente, de ADNc (de una célula capaz de expresar un anticuerpo anti-TNF o una región variable o constante) en un vector de expresión. En la biblioteca después se seleccionan los miembros capaces de expresar una proteína que inhiba competitivamente la unión de un anticuerpo anti-TNF, tal como A2 o cA2, y que tenga una secuencia de nucleótidos que sea capaz de codificar polipéptidos que tengan la misma secuencia de aminoácidos que anticuerpos anti-TNF o fragmentos de los mismos. En esta realización, el ADN, o más preferiblemente el ADNc, se extrae y se purifica a partir de una célula que es capaz de expresar un anticuerpo anti-TNF o un fragmento del mismo. El ADNc purificado se fragmenta (por cizallamiento, digestión con endonucleasas, etc.) para producir un grupo de fragmentos de ADN o ADNc. Los fragmentos de ADN o de ADNc de este grupo después se clonan en un vector de expresión para producir una biblioteca genómica de vectores de expresión cuyos miembros contengan, cada uno, un solo fragmento de ADN o ADNc clonado, tal como en una biblioteca de fagos lambda de expresión en células procariotas (por ejemplo, bacterias) o en células eucariotas (por ejemplo, de mamíferos, levaduras, insectos u hongos). Véase, por ejemplo, Ausubel, *infra*, Harlow, *infra*, Colligan, *infra*; Nyyssonen *et al.*, *Bio/Technology* 11:591-595 (1993); Marks *et al.*, *Bio/Technology* 11:1145-1149 (octubre de 1993). Una vez aislado el ácido nucleico que codifica tal región constante o variable anti-TNF, el ácido nucleico puede expresarse apropiadamente en una célula hospedadora, junto con otros ácidos nucleicos que codifican regiones constantes o variables de la cadena pesada o ligera, para proporcionar anticuerpos monoclonales recombinantes que se unan al TNF con actividad inhibidora. Tales anticuerpos preferiblemente incluyen una región variable humana anti-TNF que contiene un resto de entramado que tiene restos determinantes de complementariedad que son responsables de la unión a los antígenos.

Los genes humanos que codifican las regiones constantes (C) de los anticuerpos quiméricos, fragmentos y regiones de la presente invención pueden obtenerse a partir de una biblioteca de hígado fetal humano, por métodos conocidos. Los genes de la región C humana pueden proceder de cualquier célula humana incluyendo las que expresan y producen inmunoglobulinas humanas. La región CH humana puede proceder de cualquiera de las clases o isotipos conocidos de cadenas H humanas, incluyendo gamma, μ , α , δ o ϵ , y subtipos de las mismas, tales como G1, G2, G3 y G4. Como el isotipo de cadena H es responsable de las diversas funciones efectoras de un anticuerpo, la elección de la región CH se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Preferiblemente, la región CH procede de gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3), gamma 4 (IgG4) o μ (IgM). La región CL humana puede proceder del isotipo de cadena L humana kappa o lambda.

Los genes que codifican las regiones C de inmunoglobulina humana se obtienen a partir de células humanas por técnicas de clonación convencionales (Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), y Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology* (1987-1993)). Los genes de la región C humana están disponibles fácilmente en clones conocidos que contienen genes que representan las dos clases de cadenas L, las cinco clases de cadena H y sus subclases. Pueden prepararse fragmentos de anticuerpos quiméricos tales como F(ab')₂ y Fab, diseñando un gen de cadena quimérica H que esté truncado de forma apropiada. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de cadena H de un fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y una región de bisagra de la cadena H, seguida de un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

Generalmente, los anticuerpos murinos, humanos y quiméricos, los fragmentos y las regiones, se producen por medio de la clonación de segmentos de ADN que codifican las regiones de unión a antígenos de la cadena H y L de un anticuerpo específico por TNF y la unión de estos segmentos de ADN a segmentos de ADN que codifican regiones

CH y CL, respectivamente, para producir genes que codifican inmunoglobulinas murinas, humanas o quiméricas. De esta manera, en una realización preferida, se crea un gen quimérico fusionado que comprende un primer segmento de ADN que codifica al menos la región de unión a antígenos de origen no humano, tal como una región V redispuesta funcionalmente con un segmento de unión (J), unido a un segmento de ADN que codifica al menos una parte de una región C humana.

Por lo tanto, el ADNc que codifica las regiones V y C del anticuerpo y el método de producción de un anticuerpo quimérico puede implicar varias etapas, indicadas a continuación:

1. Aislamiento de ARN mensajero (ARNm) a partir de la línea celular que produce un anticuerpo anti-TNF y a partir de anticuerpos adicionales opcionales que suministren regiones constantes pesada y ligera; clonación y producción de ADNc a partir de los mismos;
2. Preparación de una biblioteca de ADNc de longitud completa a partir de ARNm purificado del cual los segmentos del gen de región C y/o V apropiados de los genes de cadena L y H pueden: (i) identificarse con sondas apropiadas, (ii) secuenciarse y (iii) hacerse compatibles con un segmento de gen C o V de otro anticuerpo para un anticuerpo quimérico;
3. Construcción de secuencias codificantes de cadena H o L completas por unión de los segmentos génicos de la región V específica clonada con el gen de la región C clonada, como se ha descrito anteriormente;
4. Expresión y producción de cadenas L y H en hospedadores seleccionados, incluyendo células procariotas y eucariotas para proporcionar anticuerpos murino-murino, humano-murino, humano-humano o humano-murino.

Una característica común de todos los genes de las cadenas H y L de las inmunoglobulinas y sus ARNm codificados es la región J. Las regiones J de las cadenas H y L tienen diferentes secuencias, pero existe un alto grado de homología de secuencia (mayor del 80%) entre cada grupo, especialmente cerca de la región C. Esta homología se explota en este método y pueden usarse secuencias consenso de regiones J de cadenas H y L para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para una unión posterior de segmentos de la región V a segmentos de la región C humana.

Los vectores de ADNc de la región C preparados a partir de células humanas pueden modificarse por mutagénesis de localización dirigida para poner un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana. Por ejemplo, se puede clonar la región C de la cadena kappa humana completa (Ck) y la región C de la cadena gamma-1 humana completa (C gamma-1). En este caso, el método alternativo basado en clones de la región C genómica como fuente de vectores de la región C no permitiría que estos genes se expresaran en sistemas bacterianos donde están ausentes las enzimas necesarias para retirar las secuencias intercaladas. Se escinden segmentos de la región V clonada y se unen a vectores de la región C de la cadena L o H. Como alternativa, la región C gamma-1 humana puede modificarse introduciendo un codón de terminación generando de esta manera una secuencia génica que codifica la porción de la cadena H de una molécula de Fab. Las secuencias codificantes con regiones C y V unidas después se transfieren a vehículos de expresión apropiados para la expresión en hospedadores apropiados, procariotas o eucariotas.

Se dice que dos secuencias de ADN codificantes están “unidas operativamente” si la unión produce una secuencia que se puede traducir de forma continua sin alteración o interrupción de la fase de lectura del triplete. Una secuencia codificante de ADN está unida operativamente a un elemento de expresión génica si la unión da como resultado la función apropiada de ese elemento de expresión génica para producir la expresión de la secuencia codificante.

Los vehículos de expresión incluyen plásmidos u otros vectores. Entre éstos se prefieren vehículos que llevan una secuencia de cadena CH o CL humana funcionalmente completa que tiene sitios de restricción apropiados modificados por ingeniería genética de forma que pueda insertarse fácilmente cualquier secuencia de cadena VH o VL con extremos cohesivos apropiados. De esta forma, los vehículos que contienen secuencias de cadena CH o CL humanas sirven como intermedios para la expresión de cualquier cadena H o L completa deseada en cualquier hospedador apropiado.

Un anticuerpo quimérico, tal como un anticuerpo de ratón-humano o humano-humano, típicamente se sintetizará a partir de genes dirigidos por los promotores de genes cromosómicos nativos para las regiones V de la cadena H y L de ratón usadas en las construcciones; el empalme normalmente se produce entre el sitio donador de empalme en la región J de ratón y el sitio aceptor de empalme que precede a la región C humana y también en las regiones de empalme que existen dentro de la región C humana; la poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos cadena abajo de las regiones codificantes humanas.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un fragmento de anticuerpo anti-TNF puede recombinarse con el ADN de un vector de acuerdo con técnicas convencionales, incluyendo la creación de extremos romos o extremos escalonados para la unión, digestión con enzimas de restricción para proporcionar un extremo apropiado, rellenado de extremos cohesivos cuando sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable, y unión con ligasas apropiadas. Las técnicas para tales manipulaciones se describen, por ejemplo, por Ausubel, *supra*, Sambrook, *supra*, incorporados totalmente en este documento como referencia, y son bien conocidas en la técnica.

Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, es “capaz de expresar” un polipéptido si contiene secuencias de nucleótidos que contienen información reguladora de la transcripción y la traducción y tales secuencias están “unidas operativamente” a secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido. Un enlace operativo es un enlace en el que las secuencias de ADN reguladoras y la secuencia de ADN que se pretende expresar están conectadas de tal forma que se permita la expresión génica como péptidos anti-TNF o fragmentos de anticuerpo en cantidades recuperables. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de un organismo a otro y es bien conocida en la técnica análoga. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y Ausubel, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (1987, 1993).

Se dispone de muchos sistemas de vector para la expresión de genes de cadenas H y L de péptidos anti-TNF clonados en células de mamífero (véase Glover, ed., *DNA Cloning, Vol. II*, pág. 143-238, IRL Press 1985). Pueden seguirse diferentes estrategias para obtener anticuerpos H2L2 completos. Es posible co-expresar cadenas H y L en las mismas células para conseguir una asociación intracelular y la unión de cadenas H y L para dar anticuerpos H2L2 tetraméricos completos. La co-expresión se puede realizar usando el mismo plásmido o plásmidos diferentes en el mismo hospedador. Pueden ponerse genes para las cadenas H y L en el mismo plásmido, que después se utiliza para transfectar las células, seleccionando de esta manera directamente las células que expresan las dos cadenas. Como alternativa, las células pueden transfectarse primero con un plásmido que codifica una cadena, por ejemplo, la cadena L, seguido de la transfección de la línea celular resultante con un plásmido de cadena H que contiene un segundo marcador selectivo. Pueden transfectarse líneas celulares que producen moléculas H2L2 a través de cualquier ruta con plásmidos que codifican copias de péptidos adicionales, cadenas H, L o H más L junto con marcadores selectivos adicionales para generar líneas células con mejores propiedades, tales como una mayor producción de moléculas de anticuerpo H2L2 montadas o una mayor estabilidad de las líneas celulares transfectadas.

Moléculas de Receptor

En la presente invención también son útiles formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares (ECD) de los receptores o porciones funcionales de los mismos. Se han detectado formas truncadas de los receptores de TNF que comprenden los ECD en orina y en suero como proteínas de unión inhibitoras de TNF de 30 kDa y 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)). Las moléculas multiméricas receptoras de TNF y las moléculas de fusión inmunorreceptoras de TNF, y derivados y fragmentos o porciones de los mismos, son ejemplos adicionales de moléculas receptoras. Las moléculas receptoras se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante largos períodos con un alivio de bueno a excelente de los síntomas y una baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o la alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos.

Las moléculas multiméricas receptoras de TNF comprenden todo o una porción funcional de los ECD de dos o más receptores de TNF unidos a través de uno o más enlazadores polipeptídicos. Las moléculas multiméricas pueden comprender adicionalmente un péptido señal de una proteína secretada para dirigir la expresión de la molécula multimérica. En la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 08/437.533 (presentada el 9 de mayo de 1995), cuyo contenido se incorpora en este documento en su totalidad como referencia, se han descrito estas moléculas multiméricas y métodos para su producción.

Las moléculas de fusión inmunorreceptoras de TNF comprenden al menos una porción de una o más moléculas de inmunoglobulina y todo o una parte funcional de uno o más receptores de TNF. Estas moléculas de fusión inmunorreceptoras pueden montarse como monómeros, o hetero- u homo-multímeros. Las moléculas de fusión inmunorreceptoras también pueden ser monovalentes o multivalentes.

En la técnica se han descrito moléculas de fusión inmunorreceptoras de TNF y métodos para su producción (Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219 (1994); Butler *et al.*, *Cytokine* 6(6):616-623 (1994); Baker *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.447.851; y Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 08/442.133 (presentada el 16 de mayo de 1995)). También pueden encontrarse métodos para producir moléculas de fusión inmunorreceptoras en Capon *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.116.964; Capon *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.225.538; y Capon *et al.*, *Nature* 337:525-531 (1989).

Los derivados, fragmentos, regiones y porciones funcionales de las moléculas receptoras se parecen funcionalmente a las moléculas receptoras (es decir, se unen al TNF con alta afinidad y poseen baja inmunogenicidad). Un equivalente funcional o derivado de la molécula receptora se refiere a la porción de la molécula receptora, o la porción de la secuencia de la molécula receptora que codifica la molécula receptora, que tiene un tamaño y secuencias suficientes como para parecerse funcionalmente a las moléculas receptoras que pueden usarse en la presente invención (es decir, se une al TNF con alta afinidad y posee baja inmunogenicidad). Un equivalente funcional de la molécula receptora también incluye moléculas receptoras modificadas que se parecen funcionalmente a las moléculas receptoras que pueden usarse en la presente invención (es decir, se une al TNF con alta afinidad y posee baja inmunogenicidad). Por ejemplo, un equivalente funcional de la molécula receptora puede contener un codón “SILENCIOSO” o una o más substituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos (por ejemplo, substitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido; o substitución de un codón que codifica un aminoácido hidrófobo por otro codón que codifica

el mismo aminoácido hidrófobo u otro aminoácido hidrófobo diferente). Véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1989).

Administración

5

Los antagonistas de TNF pueden administrarse a un individuo en una diversidad de formas. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en polímeros de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural e intranasal. Puede usarse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, infusión o inyección en embolada, absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos, o por terapia génica donde al paciente se le administra una molécula de ADN que codifica el antagonista de TNF, por ejemplo a través de un vector, que hace que el antagonista de TNF se exprese y se secrete a niveles terapéuticos *in vivo*. Además, los antagonistas de TNF pueden administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, glicéridos), excipientes (por ejemplo, lactosa), soportes, diluyentes y vehículos. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes y/o colorantes. Los antagonistas de TNF pueden administrarse profiláctica o terapéuticamente a un individuo antes, simultáneamente o secuencialmente con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de múltiples fármacos), en una cantidad terapéuticamente eficaz. Los antagonistas de TNF que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos pueden administrarse en la misma composición o en diferentes composiciones.

20

Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), los antagonistas de TNF pueden formularse como una solución, suspensión o emulsión o como polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de tales vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El vehículo o el polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza por técnicas usadas comúnmente.

25

En Remington Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia convencional en este campo de la técnica, se describen vehículos farmacéuticos adecuados.

30

Por ejemplo, una composición parenteral adecuada para la administración por inyección se prepara disolviendo un 1,5% en peso de ingrediente activo en una solución de cloruro sódico al 0,9%.

35

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad que, cuando se administra, el antagonista de TNF inhibe la actividad biológica del TNF, con respecto a la actividad biológica del TNF cuando no se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista.

La dosificación administrada a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores que incluyen las características farmacodinámicas de los antagonistas particulares, y su modo y vía de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor; naturaleza y grado de los síntomas de la enfermedad o trastorno a tratar, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado. Los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de TNF en un individuo son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Tales ensayos *in vitro* pueden incluir un ensayo de citotoxicidad de TNF (por ejemplo, el ensayo WEHI o un radioinmunoensayo, ELISA). Los métodos *in vivo* pueden incluir ensayos de letalidad en roedores y/o sistemas modelo de patología en primates (Mathison *et al.*, *J. Clin. Invest.* 81:1925-1937 (1988); Beutler *et al.*, *Science* 229:869-871 (1985); Tracey *et al.*, *Nature* 330:662-664 (1987); Shimamoto *et al.*, *Immunol. Lett.* 17:311-318 (1988); Silva *et al.*, *J. Infect. Dis.* 162:421-427 (1990); Opal *et al.*, *J. Infect. Dis.* 161:1148-1152 (1990); Hinshaw *et al.*, *Circ. Shock* 30: 279-292 (1990)).

50

Los antagonistas de TNF pueden administrarse en una sola o en múltiples dosis dependiendo de factores tales como la naturaleza y el grado de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente y el efecto deseado. De esta manera, pueden usarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los métodos de la presente invención. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están bien dentro de la capacidad de los especialistas en la técnica.

55

Normalmente, una dosis diaria de ingrediente activo puede ser de aproximadamente 0,01 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. Habitualmente, son eficaces para obtener resultados deseados de 1 a 40 miligramos por kilogramo y por día administrados en dosis divididas de 1 a 6 veces al día o en forma de liberación sostenida. Puede administrarse una segunda o posteriores administraciones a una dosificación que sea igual, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo.

60

La segunda administración o la administración posterior preferiblemente se realiza durante o inmediatamente antes de una recaída o reaparición de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, la segunda y las posteriores administraciones pueden proporcionarse entre aproximadamente un día y 30 semanas desde la administración previa. Si es necesario, pueden proporcionarse dos, tres, cuatro o más administraciones totales al individuo. Los términos “recurrencia”, “reaparición” o “recaída” se definen para incluir la reaparición de uno o más síntomas del estado de enfermedad.

65

Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna generalmente contienen de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 500 miligramos de ingrediente activo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas, el ingrediente activo normalmente estará presente en una cantidad de aproximadamente un 0,5-95% en peso con respecto al peso total de la composición.

La presente invención se ilustrará a continuación por medio del siguiente ejemplo, que no pretende ser limitante de forma alguna.

Ejemplo

Métodos

Procedimientos de ensayo

La selección de pacientes para este estudio y su tratamiento se ha descrito con detalle previamente (Elliott *et al.*, *Lancet* 344:1105-1110 (1994)). En resumen, se reclutaron 73 pacientes que cumplían los criterios ACR revisados para el diagnóstico de RA (Arnett *et al.*, *Arthritis Rheum* 31:315-321 (1988)) de las clínicas de cuatro centros de ensayo cooperantes. Todos los pacientes tenían RA activa e indicios de enfermedad erosiva en las radiografías de las manos o los pies. Los pacientes que tomaban fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad abandonaron su terapia al menos 4 semanas antes de la entrada en el estudio, pero se les permitió que continuaran tomando una baja dosis oral de corticosteroides o fármacos anti-inflamatorios no esteroideos en dosificaciones estables.

cA2 es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/murino de isotipo IgG1 κ , con especificidad por el TNF α humano recombinante y natural. El anticuerpo monoclonal quimérico cA2 y el método para su producción se describe en los documentos US-A-6284471; US-A-5656272; US-A-5919452; US-A-5698195 y Le, J. *et al.*, Publicación Internacional N° WO 92/16553 (publicada el 1 de octubre de 1992). En el momento de la entrada en el estudio, los pacientes se asignaron aleatoriamente a recibir una sola infusión de 2 horas de placebo (albúmina de suero humano al 0,1%, 24 pacientes), una baja dosis de cA2 (1 mg/kg, 25 pacientes) o una alta dosis de cA2 (10 mg/kg, 24 pacientes) como un procedimiento de pacientes externos. Los pacientes después se sometieron a un seguimiento usando parámetros clínicos y de laboratorio durante un período de 4 semanas. Los pacientes, los investigadores y el personal de laboratorio desconocían el tratamiento administrado.

Se extrajeron muestras de sangre para medir las citoquinas y las proteínas de fase aguda antes de la infusión en el día 0 y en los siguientes tiempos después de terminar la infusión: 1 y 8 horas, 1 y 3 días, 1, 2, 3 y 4 semanas. Esto dio como resultado los siguientes tiempos de recogida medios: 0830, 1300, 2000 (en el día 0); 1200, 1100 (en los días 1 y 3), 1030, 1100, 1045, 1045 (en las semanas 1-4). La sangre se recogió en tubos estériles, se dejó coagular durante 30 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 minutos a 2500 rpm. Se extrajeron alícuotas del suero en tubos de plástico y se almacenaron a -70°C hasta que se ensayaron. Se preparó plasma a partir de sangre con EDTA y se manipuló de forma similar.

Mediciones de Laboratorio

La medición de las citoquinas circulantes y de las proteínas de fase aguda se realizó usando ensayos disponibles en el mercado, de acuerdo con las directrices de los fabricantes. Todas las muestras de un paciente dado se ensayaron conjuntamente, para reducir la variabilidad entre ensayos.

Citoquinas

La IL-6 se midió por una técnica de inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada, basada en un sistema de detección oligoclonal (Medgenix Diagnostics, Bruselas, Bélgica). En resumen, se incubaron muestras de suero en placas de microtitulación pre-recubiertas con un cóctel de anticuerpos monoclonales contra IL-6 y se detectó la citoquina unida por la adición de anticuerpos monoclonales complementarios contra IL-6, conjugados con peroxidasa de rábano picante. Los valores de densidad óptica obtenidos a 450 nm se compararon con los obtenidos para una serie de patrones que cubrían el intervalo de 10 a 2000 pg/ml.

Proteínas de Fase Aguda

Las CRP se midieron por inmunoensayo de polarización fluorescente usando el sistema TDX (Abbot Diagnostics, Maidenhead, UK). El sistema funciona comparando el valor de polarización obtenido para una muestra dada con un valor patrón pre-calibrado. Cada ensayo se validó por la inclusión de suero de control que contenía cantidades conocidas de CRP.

El SAA se midió por ELISA de fase sólida (Biosource Inc., Camarillo, CA). Se incubaron muestras de suero diluido en placas de microtitulación pre-recubiertas con un anticuerpo monoclonal contra SAA, junto con un segundo anticuerpo monoclonal anti-SAA complementario conjugado con una enzima. Los valores de densidad óptica se compararon con los obtenidos para una serie de patrones que cubrían el intervalo de 0 a 300 ng/ml. Los niveles mayores de 300 ng/ml se midieron repitiendo el ensayo usando diluciones de muestra adicionales.

La haptoglobina se midió usando inmunodifusión radial (Behring, Hounslow, UK). Se puso plasma con EDTA en un pocillo cortado en un gel que contenía anticuerpos contra haptoglobina. Después de 48 horas, se midió el diámetro de los anillos de precipitina resultantes y la concentración se comparó con una tabla de concentraciones predeterminada. El ensayo se validó por la inclusión en cada ensayo de sueros de control de concentración conocida.

Se midió el fibrinógeno usando inmunodifusión radial (Behring, Hounslow, UK). Se puso plasma con EDTA en un pocillo cortado en un gel que contenía anticuerpos contra el fibrinógeno. Después de 18 horas, se midió el diámetro del anillo de precipitina resultante y la concentración se comparó con una tabla de concentraciones predeterminada. El ensayo se validó por la inclusión en cada ensayo de suero de control de concentración conocida.

Parámetros Estadísticos

A las muestras que proporcionaban valores por debajo del límite de detección de ensayo se les atribuyó un valor que es la mitad del límite de detección relevante antes del análisis. Los datos se expresan como mediana con intervalo intercuartil. La variación diurna en la IL-6 se evaluó en el grupo de placebo usando el ensayo de rangos con signos de Wilcoxon. Se usó el análisis de varianza sobre las puntuaciones normales de van der Waerden para comparar los valores iniciales de IL-6, CRP y SAA así como para comparar los cambios desde el inicio a cada punto después del tratamiento. El modelo incluía términos tanto para el sitio de investigación como para el grupo de tratamiento. También se ensayaron diferencias significativas por comparación de Dunnett con el grupo de placebo. Se usó un ensayo U de Mann Whitney para comparar los datos de la haptoglobina y el fibrinógeno para los grupos de placebo y de alta dosis de cA2. También se realizó una comparación entre el porcentaje de reducción en IL-6, CRP y SAA en el grupo de alta dosis de cA2 usando el ensayo de Kruskal-Wallis. Las asociaciones entre parámetros se definieron usando un coeficiente de correlación de rangos de Spearman (ρ). No se realizó ningún ajuste para una multiplicidad de puntos de tiempo o parámetros de laboratorio. Los análisis se realizaron en un ordenador VAX usando SAS y en un ordenador PowerMacintosh usando Minitab.

Resultados

Efecto de cA2 sobre la Haptoglobina y el Fibrinógeno

Para definir adicionalmente los efectos biológicos de cA2, se midieron niveles plasmáticos de haptoglobina y fibrinógeno como representantes de elementos posteriores dentro de la respuesta de fase aguda (tabla). Los datos se expresan como mediana con intervalo intercuartil, mostrándose el número de pacientes entre paréntesis.

TABLA

Haptoglobina y Fibrinógeno en Plasma		
	Placebo	10 mg/kg de cA2
Haptoglobina (g/l)		
Día 0	3,4, 3,0-4,3 [20]	3,3, 2,7-3,7 [15]
Día 28	3,4, 3,0-4,3 [20]	2,5, 1,5-3,2 [15] $p<0,001$
Fibrinógeno (g/l)		
Día 0	3,8, 3,4-5,0 [20]	4,1, 3,2-4,7 [14]
Día 28	4,0, 3,3-5,4 [20]	2,8, 2,2-3,1 [14] $p<0,002$
Intervalos normales: haptoglobina 0,7-3,8 g/l		
fibrinógeno 1,8-3,5 g/l		

Los niveles de haptoglobina y fibrinógeno antes del tratamiento fueron similares en el grupo de placebo y en el grupo de tratamiento con alta dosis de cA2. Los pacientes tratados con placebo no mostraron ningún cambio significativo en ninguna medida, mientras que el grupo de alta dosis de cA2 mostró una reducción significativa en las dos medidas en la semana 4 ($p<0,001$, $p<0,002$, haptoglobina y fibrinógeno respectivamente). (Los valores de p evalúan el significado del cambio desde los valores previos al tratamiento en el grupo de cA2 en comparación con el cambio en el grupo de placebo, por ensayo U de Mann Whitney).

Efecto de cA2 sobre la IL-6 Circulante

Para definir los efectos biológicos de cA2, además de los niveles plasmáticos de fibrinógeno y haptoglobina, también se midió la IL-6 circulante. La IL-6 fue detectable en todos excepto 4 de los 72 sueros previos al tratamiento ensayados. La mediana con intervalo intercuartil de los niveles de IL-6 circulante antes del tratamiento para los tres

grupos de tratamiento fueron de 125, 56-209 pg/ml, N=24; 130, 57-225 pg/ml, N=24; 114, 78-188 pg/ml, N=24 (placebo, baja y alta dosis de cA2 respectivamente, $p>0,05$, intervalo normal <10 pg/ml).

- Los cambios en la IL-6 circulante después del tratamiento se muestran en las figuras 1A y 1B (* indica $p<0,05$, ** indica $p<0,01$, *** indica $p<0,001$ en comparación con el placebo, por ANOVA). Cada punto representa la mediana de los cambios desde los valores del día 0 en hasta 24 pacientes, omitiéndose los intervalos intercuartiles por motivos de claridad. Los pacientes se trataron por la mañana del día 0 con una sola infusión de 2 horas de placebo (círculos), 1 mg/kg de cA2 (triángulos) o 10 mg/kg de cA2 (cuadrados).
- Los niveles de IL-6 mostraron reducciones significativas en el grupo de placebo en los puntos de tiempo de 13:00 y 20:00 horas en el día 0 ($p<0,001$, $p=0,002$, respectivamente), con una recuperación parcial en el día 1 (figura 1A). Los pacientes tratados con cA2 mostraron reducciones incluso más marcadas en la IL-6 circulante a las 13:00 horas en el día 0, y continuó reduciéndose posteriormente, alcanzando el significado en comparación con el placebo en el día 1 ($p<0,01$, $p<0,001$, baja y alta dosis de cA2 respectivamente). En la figura 1B, se presentan los cambios en la IL-6 en suero a largo plazo. Las reducciones altamente significativas de la IL-6 en suero observadas en el día 1 se mantuvieron durante todo el estudio en los pacientes que recibieron una alta dosis de cA2, pero hubo una pérdida parcial del efecto en pacientes tratados con una baja dosis de cA2 en la semana 4 (figura 1B).

- Los cambios en la mediana de los valores de IL-6 se reflejaron en las repuestas individuales de los pacientes para la IL-6. De los 24 pacientes con baja dosis de cA2 ensayados, 22 tuvieron valores elevados de IL-6 antes del tratamiento y 14 de los 22 (64%) mostraron una normalización de los valores a partir del día 1. De forma similar, 23 de 24 pacientes con alta dosis de cA2 tuvieron niveles de IL-6 circulante elevados antes del tratamiento, de los que 16 (70%) se normalizaron a partir del día 1.

- La detección de niveles elevados de IL-6 circulante en los pacientes es coherente con informes previos que demostraron la presencia de IL-6 en la mayoría de los sueros de RA, aunque a menores concentraciones que las encontradas en muestras de fluidos sinovial correspondientes (Houssiau *et al.*, *Arthritis Rheum.* 31:784-788 (1988); Swaak *et al.*, *Scand. J. Rheumatol.* 17:469-474 (1988); Arvidson *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 53:521-524 (1994)). Las reducciones en la IL-6 circulante en los pacientes tratados con placebo durante el transcurso de los días 0 y 1 también son coherentes con la variación diurna reconocida de esta citoquina en pacientes con RA (Arvidson *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 53:521-524 (1994)). Las reducciones en la IL-6 circulante en los pacientes tratados con cA2 fueron incluso más marcadas que en el grupo de placebo, alcanzando significado desde el día 1. Estos hallazgos confirman un informe preliminar previo de reducciones en la IL-6 circulante en pacientes tratados en el ensayo de etiqueta descubierta de cA2 (Elliott *et al.*, *Arthritis Rheum.* 36:1681-1690 (1993)) y coinciden con los resultados de un ensayo de etiqueta descubierta de cA2 en la enfermedad de Crohn refractaria activa (Van Dullemen *et al.*, *Gastroenterology* 109:129-135 (1995)). Aunque todos excepto dos de los pacientes con enfermedad de Crohn estudiados tenían niveles de IL-6 circulante iniciales dentro del intervalo normal, se observó una reducción significativa después del tratamiento con cA2. Los resultados descritos en este documento proporcionan indicios *in vivo* de que el TNF α es, en parte, regulador de la producción de IL-6 en el tejido sinovial en caso de RA. Los hallazgos *in vitro* también demostraron que el TNF es, en parte, regulador de la producción de IL-6 en tejido sinovial en caso de RA.

Efecto de cA2 sobre CRP y SAA

- Para definir adicionalmente los efectos biológicos de cA2, se midieron los niveles circulantes de CRP y SAA. Los cambios en los valores de CRP circulantes en este estudio se han indicado previamente (Elliott *et al.*, *Lancet* 334:1105-1110 (1994)). En resumen, los pacientes tratados con placebo no mostraron ningún cambio significativo en los valores de CRP, mientras que los tratados con una baja dosis o una alta dosis de cA2 mostraron reducciones grandes y muy significativas, evidentes ya en el día 1 después del tratamiento y que alcanzaron su medida máxima en el día 7. Las medianas con intervalo intercuartil de los valores de CRP antes del tratamiento fueron: 56, 33-70 mg/l; 58, 34-84 mg/l; 65, 28-94 mg/l (placebo, baja dosis y alta dosis de cA2, respectivamente, $p>0,05$, intervalo normal <10 mg/l) y, en el día 7, los valores equivalentes fueron: 56, 31-72 mg/l; 21, 16-25 mg/l; 18, 13-35 mg/l ($p<0,001$ tanto para el grupo de baja dosis como el de alta dosis, en comparación con el placebo).

- En la figura 2 se muestran los cambios en el SAA circulante después del tratamiento con cA2 (* indica $p<0,05$, ** indica $p<0,01$, *** indica $p<0,001$ en comparación con el placebo, por ANOVA). Cada punto representa la mediana del cambio desde los valores del día 0 en hasta 24 pacientes, omitiéndose los intervalos intercuartiles por motivos de claridad. Los pacientes se trataron por la mañana del día 0 con una sola infusión de 2 horas de placebo (círculos), 1 mg/kg de cA2 (triángulos) o 10 mg/kg de cA2 (cuadrados).

- Los niveles de SAA circulantes previos al tratamiento mostraron una tendencia a valores superiores en el grupo de 1 mg/kg de cA2 en comparación con otros grupos de tratamiento (335, 62-750 mg/l, N=24; 591, 188-1130 mg/l, N=25; 378, 180-935 mg/l, N=24; placebo, baja y alta dosis de cA2, respectivamente; intervalo normal <10 mg/l), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. No observaron cambios significativos en los niveles de SAA después del tratamiento en el grupo de placebo (figura 2), mientras que los pacientes tratados con una baja o alta dosis de cA2 mostraron reducciones grandes y muy significativas. Estos cambios fueron menos rápidos que los observados para IL-6, retrasándose las mejorías máximas hasta el día 3 (figura 2). Se detectó una tendencia hacia una pérdida de respuesta en SAA para los pacientes tratados con una baja dosis de cA2 hacia el final del estudio (figura 2).

Asociación entre la IL-6 Circulante y las Proteínas de Fase Aguda

Como la IL-6 es el regulador principal de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda *in vitro* (Gauldie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7251-7255 (1987); Baumann *et al.*, *Immunol. Today* 15:74-80 (1994)), se ensayó la asociación entre IL-6 y dos reactivos de fase aguda, CRP y SAA, en los pacientes. En la figura 3 se muestra una comparación de la cinética del cambio en cada uno de estos mediadores después del tratamiento con una alta dosis de cA2. Cada punto representa la mediana de los valores de 24 pacientes, expresada como un porcentaje de los valores previos al tratamiento. Cuadrados = IL-6 circulante, triángulos = CRP y X = SAA antes (día 0) y después del tratamiento con una sola infusión de 2 horas de alta dosis de cA2 (10 mg/kg). *** Indica $p < 0,001$, comparando IL-6, CRP y SAA por el ensayo de Kruskal-Wallis.

En el día 1, la mediana de los valores de IL-6 circulante se había reducido en comparación con los valores previos al tratamiento en un 95%, mientras que las reducciones en CRP (20%) y SAA (5%) fueron muchos más modestas ($p < 0,001$). Aunque la mediana de los valores para las dos proteínas de fase aguda se había reducido adicionalmente en el día 3, estrechando de esta manera el hueco con IL-6, la reducción en IL-6 en este momento aún era significativamente mayor que para las proteínas de fase aguda ($p < 0,001$). Esta relación temporal es coherente con la regulación de la producción de CRP y SAA por la IL-6, pero la interpretación de los resultados se complica por diferencias marcadas en las vidas medias circulantes de estas moléculas (Castell *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 177:357-361 (1988); Vigushin *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:1351:1357 (1993)). La demostración de correlaciones significativas entre las dos reducciones previas al tratamiento en el día 3 en la IL-6 en suero y los valores correspondientes para las proteínas de fase aguda proporciona indicios adicionales de una relación entre estos mediadores.

En la figura 4A se muestra un gráfico de dispersión que compara los niveles de IL-6 y CRP previos al tratamiento en los 73 pacientes, que indica una asociación moderada entre estas variables ($p = 0,55$, $p < 0,002$). Se encontró una asociación similar cuando se comparó la reducción en la IL-6 circulante en el día 3 con la reducción en CRP durante el mismo período de tiempo (figura 4B; $p = 0,59$, $p < 0,002$). (Cada punto en las figuras 4A-4B representa un paciente individual). Previamente se ha indicado una asociación entre los niveles de IL-6 circulante y CRP en pacientes con artritis inflamatoria (Arvidson *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 53:521-524 (1994)). Es posible que otras citoquinas circulantes con actividad estimuladora de hepatocitos, tales como el factor inhibidor de la leucemia, también puedan contribuir a la síntesis de proteínas de fase aguda en RA.

Se observaron asociaciones menos impresionantes, pero estadísticamente significativas entre la IL-6 circulante y el SAA (comparación antes del tratamiento: $p = 0,44$, $p < 0,002$; reducción por comparación en el día 3: $p = 0,48$, $p < 0,002$). Las asociaciones más fuertes observadas fueron entre CRP y SAA (comparación antes del tratamiento: $p = 0,73$, $p < 0,002$; reducción en el día 3: $p = 0,76$, $p < 0,002$). Los resultados demuestran claramente que el bloqueo del TNF α a corto plazo conduce a una normalización de los niveles de SAA en muchos pacientes.

Aunque los elementos de respuesta rápida, CRP y SAA, normalmente se miden como marcadores de actividad de la enfermedad en lugar de como agentes patofisiológicos por sí mismos, las proteínas de fase aguda pueden contribuir directamente a los resultados de la enfermedad en la RA. Una elevación prolongada y de alto nivel en el SAA circulante está asociada con el desarrollo de amiloidosis secundaria, una causa de insuficiencia renal y de muerte prematura en una pequeña proporción de pacientes con RA.

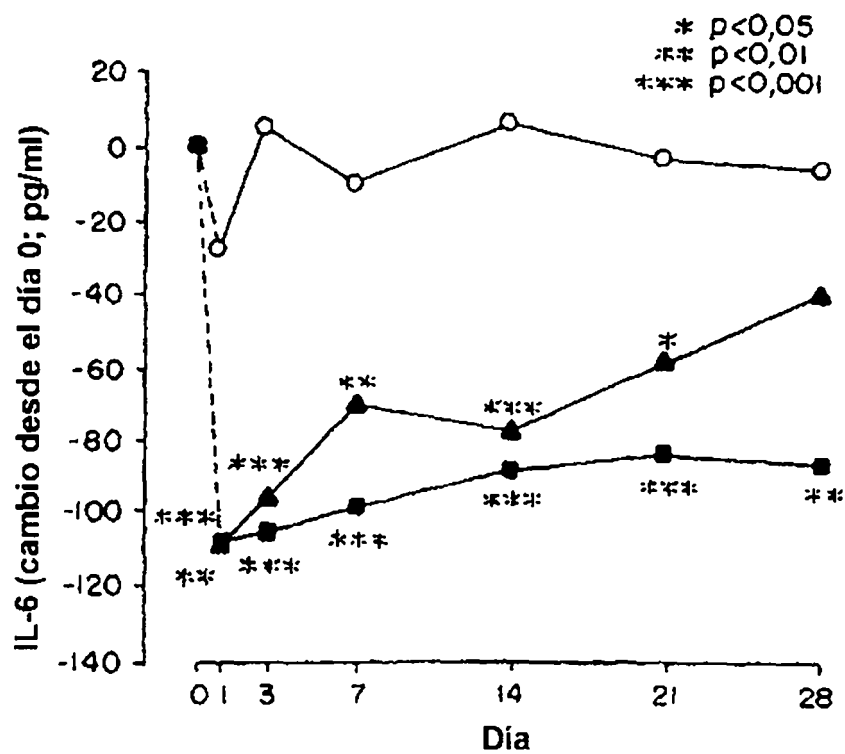
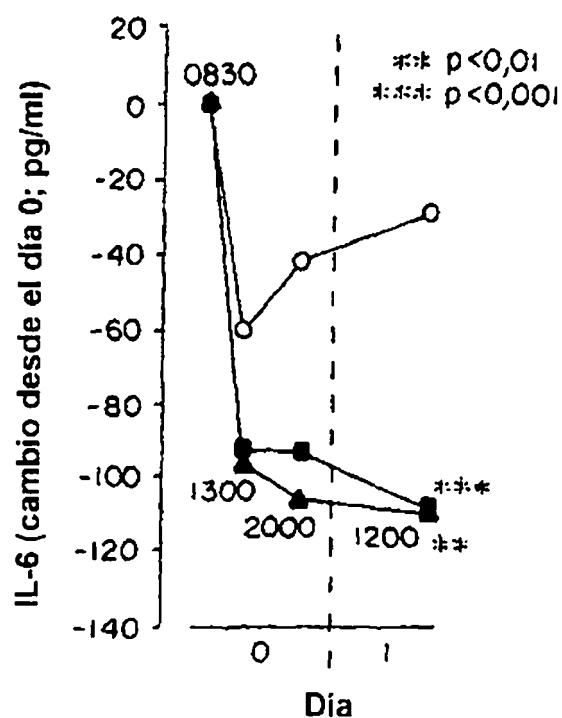
Se describe un método para tratar o prevenir un trastorno cardiovascular y/o cerebrovascular en un individuo. También se describe un método para tratar y/o prevenir un trastorno trombótico en un individuo. También se describe un método para reducir el fibrinógeno en plasma en un individuo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista del factor de necrosis tumoral para la fabricación de un medicamento para tratar una de las siguientes enfermedades: trombosis o enfermedades o patologías tratables por una reducción del fibrinógeno en plasma, donde el antagonista es el anticuerpo quimérico denominado cA2.

2. El uso de la reivindicación 1, donde el uso es de una cantidad terapéuticamente eficaz de cA2 para la fabricación de un medicamento para disminuir el nivel de fibrinógeno en plasma en un individuo diagnosticado de sufrir un trastorno trombótico.

3. El uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo cA2 se administra en una dosificación de 10 mg/kg.



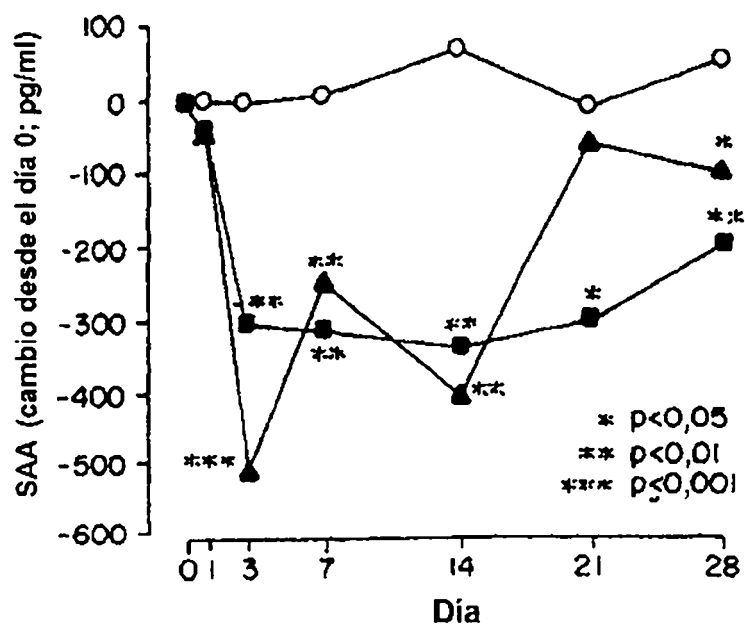


FIG. 2

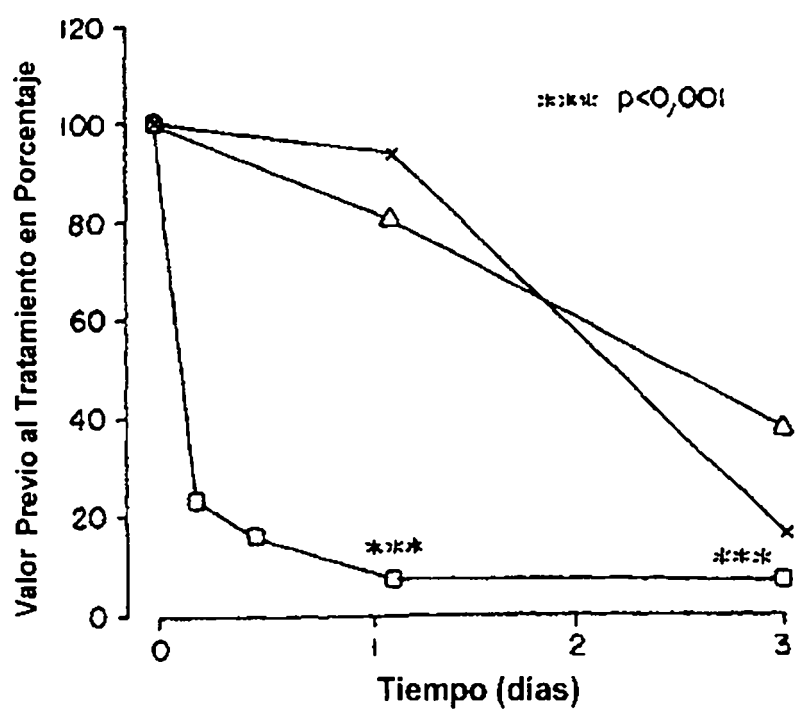


FIG. 3

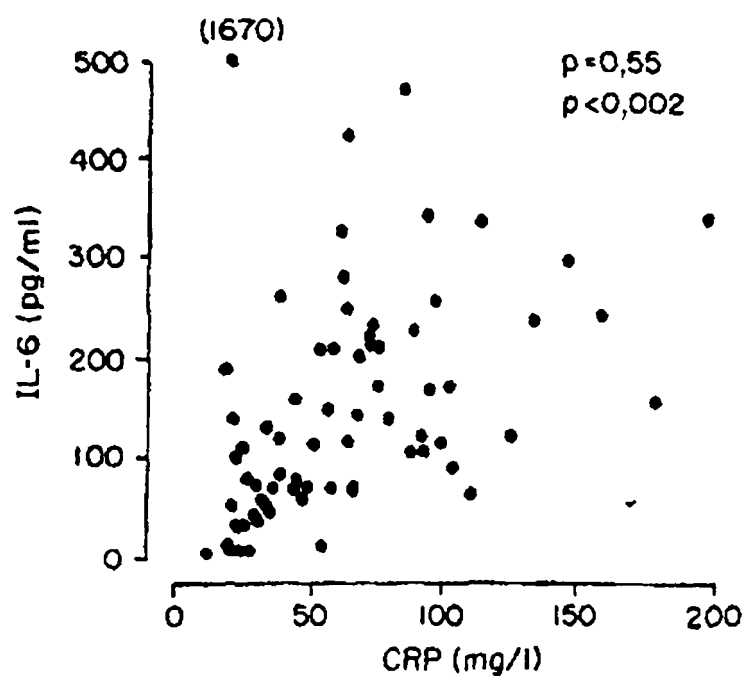


FIG. 4A

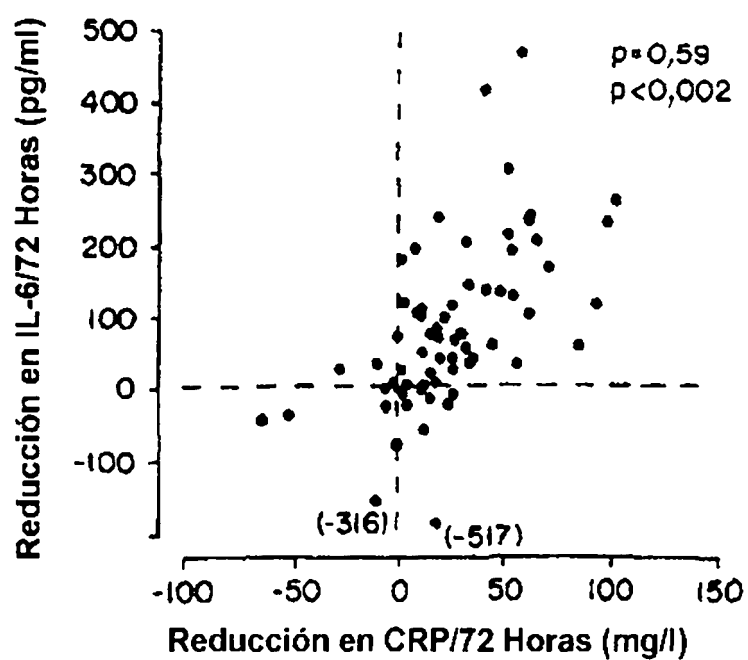


FIG. 4B

ES 2 213 816 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: The Kennedy Institute of Rheumatology

(B) CALLE: 1 Aspenlea Road

(C) CIUDAD: Hammersmith, Londres

(D) ESTADO/PROVINCIA:

(E) PAÍS: Inglaterra

(F) CÓDIGO POSTAL: W6 8LH

(G) TELÉFONO:

(I) TELEFAX:

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Métodos de Tratamiento de Enfermedades Vasculares con Antagonistas de TNF

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO:

(B) CALLE:

(C) CIUDAD:

(D) ESTADO:

(E) PAÍS:

(F) CÓDIGO POSTAL:

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

(B) ORDENADOR: PC IBM compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatenIn Release No. 1.0, Versión No. 1.30

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/602.272

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 16 de febrero de 1996

(viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:

(A) NOMBRE:

(B) NÚMERO DE REGISTRO:

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: KIR96-01 PCT

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO:

(B) TELEFAX:

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

ES 2 213 816 T5

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 1:

Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro
Ser Thr His Val

1 5 10

15

Leu Leu Thr His Thr Ile

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:

Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys
Ser Pro Cys Gln

1 5 10

15

Arg Glu Thr Pro Glu Gly

20