

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 901**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2018 PCT/EP2018/060690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018 WO18219559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2018 E 18721728 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024 EP 3630823**

54 Título: **Tratamiento tópico de la enfermedad inflamatoria intestinal usando anticuerpos y fragmentos de los mismos**

30 Prioridad:

31.05.2017 EP 17173847

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

14.10.2024

73 Titular/es:

TILLOTTS PHARMA AG (50.0%)

Baslerstrasse 15

4310 Rheinfelden, CH y

UNIVERSITY COLLEGE LONDON (50.0%)

72 Inventor/es:

YADAV, VIPUL;

BASIT, ABDUL WASEH;

OLIVEIRA VARUM, FELIPE JOSÉ;

BRAVO GONZALEZ, ROBERTO CARLOS y

FURRER, ESTHER MARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 981 901 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento tópico de la enfermedad inflamatoria intestinal usando anticuerpos y fragmentos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso terapéutico de composiciones que contienen moléculas de anticuerpos y fragmentos funcionales de las mismas, por ejemplo, moléculas de anticuerpos y fragmentos funcionales capaces de unirse al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), en el tratamiento tópico de enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

Antecedentes

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es la expresión colectiva para una serie de trastornos crónicos del tracto gastrointestinal, incluyendo la enfermedad de Crohn (EC) y la ulcerosa (CU). La EC y la CU, aunque constituyen afecciones distintas, comparten varios síntomas, incluyendo episodios recurrentes de inflamación de la pared gastrointestinal. Estos ciclos de inflamación se caracterizan por niveles elevados de formas solubles y unidas a membrana de la citocina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en el tejido afectado. El TNF α es liberado por las células del sistema inmunitario e interactúa con ellas y se considera un factor clave en la cascada de señalización que da como resultado la inflamación. El uso de anticuerpos específicos de TNF α para la neutralización de moléculas de TNF α es un tratamiento establecido para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa como se analiza, por ejemplo, en Talley *et al.* (*The American Journal of GASTROENTEROLOGY*, 106, Suplemento 1, 2011), Feldman *et al.* (*Transplantation Proceedings*, 30, 4126-4127, 1998) y Adorini *et al.* (*Trends in Immunology Today*, 18, 209-211, 1997).

En la técnica anterior se han descrito varios anticuerpos monoclonales contra el TNF α . Meager *et al.* (*Hybridoma*, 6, 305-311, 1987) describen anticuerpos monoclonales murinos contra el TNF α recombinante. Fendly *et al.* (*Hybridoma*, 6, 359-370, 1987) describen el uso de anticuerpos monoclonales murinos contra el TNF α recombinante para definir epítopos neutralizantes en el TNF. Además, en la solicitud de patente internacional WO 92/11383, se desvelan anticuerpos recombinantes, incluyendo anticuerpos injertados con CDR, específicos para TNF α . La patente de los EE.UU. N.º 5.919.452 desvela anticuerpos quiméricos anti-TNF α y su uso en el tratamiento de patologías asociadas a la presencia de TNF α . Se desvelan otros anticuerpos anti-TNF α en Stephens *et al.* (*Immunology*, 85, 668-674, 1995), el documento GB-A-2 246 570, el documento GB-A-2 297 145, el documento US 8673310, el documento US 2014/0193400, el documento EP 2 390 267 B1, el documento US 8293235, el documento US 8697074, el documento WO 2009/155723 A2 y el documento WO 2006/131013 A2.

Los bioterápicos anti-TNF α actualmente aprobados incluyen (i) infliximab, un anticuerpo monoclonal anti-TNF humano IgG quimérico (Remicade®); (ii) etanercept, una proteína de fusión dimérica TNFR2, con un Fc de IgG1 (Enbrel®); (iii) adalimumab, un anticuerpo monoclonal (mAb) totalmente humano (Humira®), (iv) certolizumab, un fragmento Fab PEGilado (Cimzia®) y (v) Golimumab, un anticuerpo monoclonal IgG1K humano (Simponi®). Por otra parte, se están desarrollando diversos biosimilares y ya se ha aprobado en Europa un mimético de infliximab conocido como Remsima.

En la actualidad, la terapia de referencia para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales como la EC o la CU usando anticuerpos específicos de TNF α implica la administración sistémica regular de un anticuerpo contra TNF α mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea. La administración intravenosa puede dar lugar a complicaciones que incluyen reacción aguda a la perfusión, hipersensibilidad y choque anafiláctico. Por otra parte, esta aplicación sistémica de un inmunosupresor conlleva una multitud de riesgos asociados a la inhibición sistémica de la función de defensa inmunitaria del TNF α en el paciente, incluyendo, por ejemplo, complicaciones infecciosas. Por último, se sabe que la aplicación sistémica conduce a la acumulación de anticuerpos específicos contra el anticuerpo anti-TNF α en el cuerpo del paciente, dando como resultado una pérdida de respuesta al tratamiento. En la actualidad, no existen terapias comerciales disponibles que impliquen la administración oral o rectal de una composición que contenga un anticuerpo específico de TNF α para la aplicación tópica.

Deborah S. Hartmann *et al.* (2016) *Journal of Crohn's disease and colitis*, Vol. 20, N.º 6, páginas 641-649 explora los efectos de un anticuerpo anti-TNF-alfa novedoso sobre biomarcadores tisulares en pacientes con colitis ulcerosa activa.

Bhol *et al.* (2013) *Inflamm Bowel Dis.* Vol. 19, N.º 11, páginas 2273-2281, describen la administración oral de anticuerpos anti-TNF a ratones antes o después de la inducción de colitis. El documento US 8.647.626 B2 desvela composiciones que comprenden anticuerpos específicos de TNF para la administración oral. El documento WO 2011/047328 describe terapias con anticuerpos con actividad local en el tracto digestivo.

Yadav *et al.* (2016) *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 502, N.º 1, páginas 181-187, investigan la estabilidad gastrointestinal de los anticuerpos IgG1.

Rodewald *et al.* (1976) *The journal of cell biology*, Vol. 71, N.º 2, páginas 666-669, investigan la unión dependiente del pH de anticuerpos en células intestinales de ratas neonatas. Existe la necesidad de un tratamiento alternativo de enfermedades inflamatorias intestinales tales como la EC o la CU con anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos, permitiendo un mejor direccionamiento a los tejidos inflamados en el tracto gastrointestinal. El tratamiento debería permitir particularmente la penetración eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo dentro de la pared gastrointestinal inflamada.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que proporcionar un anticuerpo contra TNF α o un fragmento funcional del mismo al lado luminal de la pared del intestino grueso a un pH inferior al normal da como resultado su permeación eficaz a través de la pared del intestino grueso. Se ha descubierto que un pH más bajo, de aproximadamente 6, da como resultado una captación aumentada de anticuerpos contra TNF α o fragmentos funcionales de los mismos a través de la capa epitelial y dentro de la capa mucosa de la pared del intestino grueso, así como una penetración más profunda en la capa submucosa de la pared del intestino grueso, que un pH superior de aproximadamente 7,4. Los presentes inventores también han descubierto que la concentración local del anticuerpo contra TNF α o fragmento funcional del mismo se correlaciona directamente con la cantidad del anticuerpo contra TNF α o fragmento funcional del mismo captado por la pared del intestino grueso. Cuando la capa mucosa protectora de la pared gastrointestinal está alterada, el anticuerpo contra TNF α o fragmento funcional del mismo es captado más rápidamente y penetra más profundamente dentro de la pared gastrointestinal, dando como resultado niveles superiores del anticuerpo contra TNF α o fragmento funcional del mismo. Por último, se ha descubierto que el anticuerpo contra TNF α o fragmento funcional del mismo captado por la pared del intestino grueso queda retenido allí eficazmente.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos específicos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y fragmentos funcionales de los mismos y al menos un aditivo seleccionado de acidificantes, para su uso en el tratamiento tópico de una enfermedad inflamatoria intestinal, en donde dicho tratamiento da como resultado una disminución del pH en la luz del intestino grueso de un paciente humano, en donde la luz del intestino grueso es el interior combinado y continuo del intestino grueso y el íleon terminal del intestino delgado, en donde dicho tratamiento da como resultado un pH en la luz del intestino grueso de 5,5 a 6,5, en donde el fragmento funcional específico contra TNF α es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un scFv, un dsFv, un VHH, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una proteína de fusión Fc o un minicuerpo, en donde dicha composición reduce el pH de un microambiente local del anticuerpo o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso y la disminución del pH en la luz del intestino grueso facilita la captación y/o penetración del agente activo dentro de la pared gastrointestinal.

En una realización, dicho tratamiento da como resultado un pH en la luz del intestino grueso de 5,7 a 6,3, preferentemente de 5,9 a 6,1, más preferentemente de aproximadamente 6,0.

En otra realización, la composición para su uso de acuerdo con el primer aspecto comprende al menos un aditivo seleccionado de agentes tampón.

En una realización, el al menos un aditivo es un acidificante seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido sórbico y ácido tartárico.

En una realización, dicho paciente humano que padece una enfermedad inflamatoria intestinal, está en remisión o padece una forma leve o moderada de la enfermedad inflamatoria intestinal.

En otra realización, dicho tratamiento proporciona además una concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso de un paciente humano en el intervalo de 0,02 a 1 mg/ml, preferentemente de 0,2 a 0,8 mg/ml.

En una realización adicional, dicho tratamiento comprende la administración oral de la composición.

En otra realización, la composición es una forma farmacéutica sólida en forma de un microgránulo, gránulo, micropartícula, nanopartícula, minicomprimido, cápsula o comprimido recubierto con un material de recubrimiento que evita la liberación del agente activo antes de entrar en la región ileocolónica del intestino.

En otra realización, el material de recubrimiento se selecciona del grupo que consiste en materiales que se disgregan de manera dependiente del pH, materiales que se disgregan de manera dependiente del tiempo, materiales que se disgregan debido a desencadenantes enzimáticos en el ambiente del intestino grueso y combinaciones de los mismos.

En una realización, dicho tratamiento comprende la administración rectal de la composición y/o en donde la composición es un enema, un gel, una espuma o un supositorio.

En una realización adicional, el pH en la luz del intestino grueso del paciente humano antes del tratamiento es superior a 6,5.

Breve descripción de los dibujos

5 Figura 1: Estabilidad de A) infliximab, B) adalimumab en inóculo fecal modelo de colon humano y C) gel de SDS-PAGE que confirma la conversión de adalimumab en fragmentos F(ab')₂, Fab y Fc, detectada mediante tinción con plata en el punto temporal de incubación de 1 h. La fragmentación de infliximab se confirmó de manera similar mediante SEC y SDS-PAGE (datos no mostrados). Cada valor representa la media ± D.T. (n = 3). Calle 1, patrón de peso molecular de proteínas; Calle 2, mAb intacto adalimumab detectado en el modelo de colon en 1 h; Calle 3, formación de F(ab')₂ de adalimumab detectada en el modelo de colon en 1 h; Calle 4, formación de Fc y Fab de adalimumab detectada en el modelo de colon en 1 h.

15 Figura 2: Datos de SE-HPLC de infliximab y adalimumab en el compartimento apical y basolateral de la cámara de Ussing en puntos temporales diferentes, respectivamente. A) Porcentaje de anticuerpos, restante en el lado apical de un segmento de tejido de colon ascendente de rata fijado en un sistema de cámara de Ussing, aplicado a una concentración de 2 mg/ml y cuantificado en puntos temporales diferentes, usando A) infliximab o B) adalimumab. La cuantificación de los anticuerpos restantes en el lado apical y basolateral se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC, por sus siglas en inglés). Cada valor representa la media ± desviación típica (D.T.) (n = 3).

25 Figura 3: Microscopía de barrido láser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés) de la penetración de infliximab en tejido de colon ascendente a una concentración apical de 2 mg/ml (n = 3). El infliximab se tiñó de color rojo con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana, los componentes de las células se tiñeron de color verde y los núcleos se tiñeron de color azul con DAPI. A) Penetración de infliximab en el tejido de colon (resolución 10x). B) Tejido de colon sin exposición a infliximab como control negativo (resolución 10x). C) Penetración de infliximab en la región mucosa a una resolución de 40x. D) Región mucosa del tejido de colon sin exposición a infliximab (resolución 40x).

30 Figura 4: CLSM de la penetración de adalimumab en tejido de colon ascendente a una concentración apical de 2 mg/ml (n = 3). El adalimumab se tiñó de color rojo con anticuerpo secundario anti-IgG humana, los componentes de las células se tiñeron de color verde y los núcleos se tiñeron de color azul con DAPI. A) Adalimumab en el tejido de colon (resolución 10x). B) Tejido de colon sin exposición a adalimumab como control negativo (resolución 10x). C) Penetración de adalimumab en la región mucosa a una resolución de 40x. D) Región mucosa del tejido de colon sin exposición a adalimumab (resolución 40x).

35 Figura 5: A) Datos de SE-HPLC de infliximab y adalimumab en el compartimento apical y basolateral en puntos temporales diferentes, respectivamente. Porcentaje de anticuerpos, restante en el lado apical de un segmento de tejido de colon ascendente de rata fijado en un sistema de cámara de Ussing, aplicado a una concentración de 0,8 mg/ml y cuantificado en puntos temporales diferentes, usando A) infliximab o B) adalimumab. Cada valor representa la media ± D.T. (n = 3).

45 Figura 6: CLSM de secciones de tejido de colon de rata ascendente, al final del experimento de incubación en cámara de Ussing con anticuerpos 0,8 mg/ml, después de la criosección y la tinción. El infliximab y el adalimumab se tiñeron de color rojo con anticuerpo secundario anti-IgG humana, los componentes celulares se tiñeron de color verde y los núcleos se tiñeron de color azul con DAPI. A) Penetración de infliximab dentro del tejido de colon. B) Tejido de colon sin incubación con infliximab. C) Penetración de adalimumab en el tejido de colon. D) Tejido de colon sin incubación con adalimumab.

50 Figura 7: A) Datos de SE-HPLC de infliximab y adalimumab en el compartimento apical y basolateral en puntos temporales diferentes, respectivamente. Porcentaje de anticuerpos restante en el lado apical de un segmento de tejido de colon ascendente de rata fijado en un sistema de cámara de Ussing, aplicado a una concentración de 0,2 mg/ml y cuantificado en puntos temporales diferentes, usando A) infliximab o B) adalimumab.

55 Figura 8: CLSM de secciones de tejido de colon de rata ascendente, al final del experimento de incubación en cámara de Ussing con anticuerpos 0,2 mg/ml, después de la criosección y la tinción. El infliximab y el adalimumab se tiñeron de color rojo con anticuerpo secundario anti-IgG humana, los componentes celulares se tiñeron de color verde y los núcleos se tiñeron de color azul con DAPI. A) y B) Penetración de infliximab dentro del tejido de colon. C) y D) Penetración de adalimumab dentro del tejido de colon. Ambos estudios de incubación se realizaron por triplicado.

60 Figura 9: Representación esquemática del proceso de digestión de infliximab y adalimumab.

65 Figura 10: A)-C) Penetración del fragmento Fab de infliximab en el segmento de tejido de colon ascendente de rata a una concentración apical de 0,8 mg/ml. D) Tejido de control sin exposición al fragmento Fab de infliximab, pero teñido con anticuerpo secundario que no muestra señal de fondo. El estudio se realizó por triplicado.

Figura 11: A)-C) Penetración del fragmento Fab de adalimumab en el segmento de tejido de colon ascendente de rata a una concentración apical de 0,8 mg/ml en segmentos de tejido de colon ascendente de rata fijados en un sistema de cámara de Ussing. D) Tejido de control sin exposición al fragmento Fab de adalimumab, pero teñido con anticuerpo secundario que no muestra señal de fondo. El estudio se realizó por triplicado.

Figura 12: A) y B) Penetración de fragmentos Fab de infliximab y adalimumab a una concentración apical de 0,2 mg/ml en segmentos de tejido de colon ascendente de rata fijados en un sistema de cámara de Ussing. C) Tejido de control sin exposición al fragmento Fab de infliximab/adalimumab, pero teñido con anticuerpo secundario que no muestra señal de fondo. El estudio se realizó por triplicado.

Figura 13: A) y B) Penetración de infliximab en tejido de colon ascendente y descendente de rata, respectivamente, con capa mucosa alterada en un sistema de cámara de Ussing. C) y D) Penetración de adalimumab en tejido de colon ascendente y descendente, respectivamente, con capa mucosa alterada.

Figura 14: CLSM de secciones de tejido de colon de rata ascendente incubadas con anticuerpos infliximab 0,2 mg/ml a pH 6 o 7,4. Sólo se muestra la señal de anticuerpos. A) y B) Penetración de infliximab en tejido de colon ascendente de rata a pH 6 apical. C) y D) Penetración de infliximab en tejido de colon ascendente de rata a pH 7,4 apical (n = 3).

Figura 15: CLSM de secciones de tejido de colon ascendente de rata incubadas con 0,2 mg/ml de anticuerpos de adalimumab a pH 6 o 7,4. Sólo se muestra la señal de anticuerpos. A) y B) Penetración de adalimumab en tejido de colon ascendente de rata a pH 6 apical. C) y D) Penetración de adalimumab en tejido de colon ascendente de rata a pH 7,4 apical.

Figura 16: % de dosis de A) infliximab y B) adalimumab restante en el compartimento apical al final de 2 h de incubación en la cámara de Ussing con muestra de tejido colónico humano.

Figura 17: A) y B) Localización de infliximab en la mucosa de colon humano y en la región de la lámina propia. C) Control de mucosa de colon humano expuesto a anticuerpo secundario sin exposición a infliximab.

Descripción detallada

La presente invención se describe a continuación con respecto a anticuerpos específicos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y fragmentos funcionales del mismo.

La presente invención se refiere a una composición que comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos específicos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y fragmentos funcionales específicos contra TNF α y al menos un aditivo seleccionado de acidificantes, para su uso en el tratamiento tópico de una enfermedad inflamatoria intestinal, en donde dicho tratamiento da como resultado una disminución del pH en la luz del intestino grueso de un paciente humano.

En el contexto de la presente solicitud, el término "anticuerpo" se usa como sinónimo de "inmunoglobulina" (Ig), que se define como una proteína que pertenece a la clase IgG, IgM, IgE, IgA o IgD (o cualquier subclase de las mismas) e incluye todos los anticuerpos y fragmentos de los mismos conocidos convencionalmente. En el contexto de la presente invención, un "fragmento funcional" de un anticuerpo/inmunoglobulina se define como un fragmento de unión a antígeno u otro derivado de un anticuerpo parental que esencialmente mantiene las propiedades de un anticuerpo parental de este tipo.

Un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo/inmunoglobulina se define como un fragmento (por ejemplo, una región variable de una IgG) que retiene la región de unión a antígeno. Una "región de unión a antígeno" de un anticuerpo se encuentra normalmente en una o más región o regiones hipervariables de un anticuerpo, es decir, las regiones CDR-1, CDR-2 y/o CDR-3; Los "fragmentos de unión a antígeno" de la invención incluyen el dominio de un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fab. Los "fragmentos funcionales" de la invención incluyen fragmento Fab, fragmento F(ab')₂, fragmento Fab', scFv, dsFv, VHH, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína de fusión Fc y minicuerpo. El dominio F(ab')₂ o Fab puede modificarse por ingeniería genética para minimizar o eliminar totalmente las interacciones de disulfuro intermoleculares que existen entre los dominios CH1 y CL. Los anticuerpos o fragmentos funcionales de la presente invención pueden ser parte de construcciones bi o multifuncionales.

Los fragmentos funcionales preferidos específicos contra TNF α de la presente invención son fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', scFv y diacuerpos.

Los fragmentos Fab pueden obtenerse como productos de digestión purificados después de la digestión de un anticuerpo específico de TNF α con una cisteína proteinasa como la papaína (EC 3.4.22.2). Los fragmentos F(ab')₂ pueden obtenerse como productos de digestión purificados después de la digestión de un anticuerpo específico de TNF α con pepsina (EC 3.4.23.1) o IdeS (enzima de degradación de inmunoglobulinas de *Streptococcus pyogenes*;

EC 3.4.22). Los fragmentos Fab' pueden obtenerse a partir de fragmentos F(ab')₂ en condiciones reductoras suaves, por lo que cada molécula F(ab')₂ da lugar a dos fragmentos Fab'.

5 Un scFv es un fragmento Fv monocatenario en el que los dominios ligero variable ("V_L") y pesado variable ("V_H") están unidos por un puente peptídico.

10 Un "diacuerpo" es un dímero que consiste en dos fragmentos, cada uno de los cuales tiene regiones variables unidas entre sí a través de un enlazador o similar (en lo sucesivo en el presente documento denominadas fragmentos formadores de diacuerpos), y normalmente contienen dos V_L y dos V_H. Los fragmentos formadores de diacuerpos incluyen aquellos que consisten en V_L y V_H, V_L y V_L, V_H y V_H, etc., preferentemente V_H y V_L. En fragmentos formadores de diacuerpos, el enlazador que une regiones variables no está limitado específicamente, pero preferentemente es lo suficientemente corto para evitar enlaces no covalentes entre regiones variables en el mismo fragmento. La longitud de un enlazador de este tipo puede determinarse según sea apropiado por los expertos en la materia, pero normalmente se usan 2-14 aminoácidos, preferentemente 3-9 aminoácidos, especialmente 4-6 aminoácidos. En este caso, el V_L y el V_H codificados en el mismo fragmento se unen a través de un enlazador lo suficientemente corto para evitar enlaces no covalentes entre el V_L y el V_H en la misma cadena y para evitar la formación de fragmentos de región variable monocatenarios de manera que puedan formarse dímeros con otro fragmento. Los dímeros pueden formarse mediante enlaces covalentes o no covalentes o ambos entre fragmentos formadores de diacuerpos.

20 Por otra parte, los fragmentos formadores de diacuerpos pueden unirse a través de un enlazador o similar para formar diacuerpos monocatenarios (sc(Fv)₂). Mediante la unión de fragmentos formadores de diacuerpos usando un enlazador largo de aproximadamente 15-20 aminoácidos, pueden formarse enlaces no covalentes entre fragmentos formadores de diacuerpos existentes en la misma cadena para formar dímeros. Basándose en el mismo principio que para preparar diacuerpos, también pueden prepararse anticuerpos polimerizados tales como trímeros o tetrámeros mediante la unión de tres o más fragmentos formadores de diacuerpos.

30 De acuerdo con el primer aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento funcional de la invención se une específicamente a TNFα. Las expresiones "anticuerpo anti-TNFα", "anticuerpo contra TNFα" y "anticuerpo específico contra TNFα", como se usan en el presente documento, son intercambiables. En su forma más general (y cuando no se menciona ninguna referencia definida), "unión específica" se refiere a la capacidad del anticuerpo o fragmento funcional para discriminar entre TNFα humano y una biomolécula no relacionada, como se determina, por ejemplo, de acuerdo con métodos de ensayo de especificidad conocidos en la técnica. Dichos métodos comprenden, pero sin limitación, transferencias Western y pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Por ejemplo, puede realizarse un ensayo ELISA convencional. Normalmente, la determinación de la especificidad de unión se realiza usando no sólo una única biomolécula de referencia, sino un conjunto de entre tres y cinco biomoléculas no relacionadas, tales como leche en polvo, BSA, transferrina o similares. En una realización, la unión específica se refiere a la capacidad del anticuerpo o fragmento para discriminar entre TNFα humano y TNFβ humano. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo contra TNFα o fragmento funcional del mismo es un anticuerpo contra TNFα. En una realización preferida alternativa de la presente invención, el anticuerpo contra TNFα o fragmento funcional del mismo es un fragmento funcional de un anticuerpo contra TNFα.

45 La expresión "tratamiento tópico" en el contexto de la presente solicitud, se usa para describir la aplicación local de la composición, a diferencia de la aplicación sistémica de una composición que contiene anticuerpo contra TNFα, por ejemplo, mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea, utilizada en productos comerciales. Sin embargo, el tratamiento tópico en la luz intestinal no está limitado por la forma de administración de la composición. El término "administración" en este contexto se refiere a la manera y forma en la que la composición entra en primer contacto con el cuerpo de un paciente. Esto significa que la composición en una forma adecuada puede administrarse por vía oral, por vía rectal o de cualquier otra manera que dé como resultado la acumulación de la composición en el sitio de aplicación local.

50 En la presente invención, la expresión "luz del intestino grueso" se usa para el interior combinado y continuo del intestino grueso y el íleon terminal del intestino delgado. El intestino grueso es la penúltima sección del tracto gastrointestinal y puede subdividirse en ciego, colon y recto. El colon puede subdividirse en colon ascendente, transversal y descendente. El íleon terminal del intestino delgado es la penúltima sección del intestino delgado y está directamente adyacente al ciego. En una realización, la expresión "luz del intestino grueso" se refiere al interior continuo del intestino grueso. La expresión "tracto gastrointestinal", como se usa en el presente documento, describe el sistema de órganos del cuerpo humano, que incluye todas las estructuras entre la boca y el ano, formando un pasaje continuo, y es responsable de digerir el material ingerido, absorber nutrientes y expulsar heces.

60 El tratamiento tópico con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del intestino grueso de un paciente humano. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que la captación y penetración de anticuerpos anti-TNFα dentro de la pared del intestino grueso es particularmente eficaz si el pH en el colon es débilmente ácido. En particular, se ha descubierto que la captación y penetración dentro de la pared del intestino grueso es más eficaz a un pH débilmente ácido, por ejemplo, un pH de 6, que a un pH neutro o débilmente básico, por ejemplo, un pH de 7,4. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la disminución del pH en la luz del intestino grueso facilita la captación y/o penetración del agente activo dentro de la pared

gastrointestinal.

En la presente invención, la expresión "pared del intestino grueso" se usa para definir el tejido multicapa que rodea la luz del intestino grueso y forma una barrera entre la luz del intestino grueso y el resto del cuerpo. En el contexto de la presente invención, en su definición más amplia, la pared del intestino grueso también incluye la pared gastrointestinal del íleon terminal. Esta barrera permite la absorción activa y pasiva de un conjunto definido de nutrientes y otras moléculas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos. La pared del intestino grueso está formada por varias capas. Éstas incluyen, comenzando con la capa orientada hacia la luz del intestino grueso, una capa mucosa o mucosa seguida de una capa submucosa o submucosa. La mucosa puede subdividirse adicionalmente, comenzando desde el lado orientado hacia el lumen, dentro de un epitelio, una lámina propia y una mucosa muscular. En el lado luminal, la capa mucosa está protegida por una "capa mucosa", que es un gel proteico viscoso con glicoproteínas de la familia de las mucinas como componentes principales. La pared del intestino grueso es parte de la pared gastrointestinal.

La pared gastrointestinal corresponde al tejido que rodea el tracto gastrointestinal y forma una barrera entre el tracto gastrointestinal y el resto del cuerpo.

El término "captación", como se usa en el presente documento en su definición más amplia, se refiere a la absorción de moléculas, como anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, dentro de la pared gastrointestinal. En una definición más específica, la captación puede referirse a la fracción de la dosis total de anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos en la luz del intestino grueso, o en un subvolumen de la luz del intestino grueso, que se transfiere dentro de la pared del intestino grueso, o puede referirse a la cantidad de anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos que se transfiere dentro de una cantidad definida de tejido de la pared del intestino grueso. El término "penetración", como se usa en el presente documento, puede referirse a la profundidad a la que los anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos pasan dentro de la pared del intestino grueso. De acuerdo con esta definición, la capa submucosa se ubica más profundamente dentro de la pared del intestino grueso que la capa mucosa.

En la técnica anterior, se han informado valores de pH en el colon humano en el rango de 6,5 a 7,5. Se ha informado que el pH de la superficie *in vivo* de la mucosa de colon humano varía entre 7,1 y 7,5 y es consistentemente más alto en todos los segmentos anatómicos que el pH luminal (McDougall *et al.*, *Dig. Dis. Sci.* 1993; 38:542-5). A la luz de esto, de acuerdo con los hallazgos anteriores de los presentes inventores, disminuir el pH en la luz del intestino grueso en el sitio donde los anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos se liberan de la composición, es importante garantizar una captación y una penetración óptimas de los anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos dentro de la pared del intestino grueso. Por lo tanto, la composición de la presente invención se proporciona en una forma que da como resultado una disminución del pH en la luz del intestino grueso de un paciente humano durante el tratamiento con el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo. Se entiende que esta disminución del pH se refiere a una disminución de al menos parte de la luz del intestino grueso, por ejemplo, en una sección o subvolumen de la luz del intestino grueso, o en el microambiente local del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo liberado de la composición. Por otra parte, en una realización, se entiende que esta disminución del pH en la luz del intestino grueso, se refiere preferentemente a una disminución en o cerca de la pared gastrointestinal en el lado luminal (a diferencia del lado seroso de la pared gastrointestinal) en lugar de una disminución general en la propia luz. En una realización alternativa de la presente invención, el tratamiento con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del colon de un paciente humano. En otra realización alternativa, el tratamiento con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del colon ascendente de un paciente humano. En otra realización alternativa más, el tratamiento con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del colon transversal de un paciente humano. En una realización alternativa adicional, el tratamiento con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del colon descendente de un paciente humano. En una realización alternativa adicional, el tratamiento con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del colon proximal de un paciente humano. En una realización alternativa adicional, el tratamiento con la composición de la presente invención da como resultado una disminución del pH en la luz del colon distal de un paciente humano.

En la técnica se conocen medios para medir el pH en la luz del intestino grueso. El pH en la luz del intestino grueso puede medirse, por ejemplo, usando una cápsula de radiotelemedición, por ejemplo, una cápsula de motilidad inalámbrica (WMC, por sus siglas en inglés), un electrodo sensible al pH pasado por vía oral o el sistema IntelliCap® (Medimetrics).

De acuerdo con la presente invención, la composición es capaz de reducir el pH de un microambiente local del anticuerpo o fragmento funcional en la luz del intestino grueso. Los microambientes son espacios, en donde se controlan y mantienen condiciones específicas con el fin de obtener efectos terapéuticos específicos, es decir, mediante el suministro de una composición de medicamento personalizada en un área diana de un cuerpo vivo para un efecto terapéutico. En una realización, el término "microambiente", como se usa en el presente documento, se refiere al sitio o subvolumen en la luz del intestino grueso, que se caracteriza por un pH disminuido para promover la liberación controlada del anticuerpo anti-TNF α o fragmento del mismo de la composición. En otra realización, el microambiente local del anticuerpo o fragmento funcional del mismo, se refiere al sitio o subvolumen en la luz intestinal,

en el que los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos se liberan de la composición.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el tratamiento tópico con la composición da como resultado un pH en la luz del intestino grueso inferior a 6,5, más preferentemente inferior a 6,3, incluso más preferentemente aproximadamente 6. De acuerdo con el primer aspecto, el tratamiento tópico da como resultado un pH en la luz del intestino grueso, preferentemente, la luz del colon, de 5,5 a 6,5, preferentemente de 5,6 a 6,4, más preferentemente de 5,7 a 6,3, incluso más preferentemente de 5,8 a 6,2, mucho más preferentemente de 5,9 a 6,1, por ejemplo, aproximadamente 6,0. La expresión "da como resultado un pH en la luz del intestino grueso inferior a" seguido de un valor específico, por ejemplo, 7, 6,5, etc., no ha de entenderse que significa que el tratamiento da como resultado un pH luminal inferior a dicho valor en toda la luz del intestino grueso, sino que significa que da como resultado un pH luminal en parte de la luz del intestino grueso, por ejemplo, en una sección o subvolumen de la luz del intestino grueso o en el microambiente local de los anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos liberados de la composición.

En la técnica se conocen medios adecuados para reducir el pH, por ejemplo, en la luz del intestino grueso. Los medios adecuados para reducir el pH luminal para que esté dentro de un intervalo deseado incluyen, por ejemplo, agentes tampón y/o acidificantes. El término "acidificante", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia o agente que directa o indirectamente provoca acidificación. Un acidificante, por ejemplo, es una sustancia orgánica o inorgánica que es, se convierte o produce, ácidos. En una realización preferida de la presente invención, la composición comprende como aditivo al menos un agente tampón y/o acidificante. En la técnica se conocen acidificantes adecuados para la ingestión humana. Son ejemplos de acidificantes adecuados para la composición de la presente invención ácido acético, ácido adipico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido succínico y ácido tartárico. Los ejemplos de agentes tampón adecuados incluyen, pero sin limitación, tampón de Tris-citrato (Tris + ácido cítrico + citrato de sodio), tampón de citrato (ácido cítrico + citrato de sodio), tampón de citrato y fosfato (fosfato de sodio dibásico + ácido cítrico), tampón de fosfato (fosfato de sodio monobásico + fosfato de sodio dibásico).

De acuerdo con la presente invención, la composición puede estar en cualquier forma que, tras la administración, permita el tratamiento tópico en la luz del intestino grueso de un paciente humano. La composición puede ser una forma farmacéutica sólida en forma de microgránulos, gránulos, micropartículas, nanopartículas, minicomprimidos, cápsulas o comprimidos y similares. Se sabe en la técnica cómo fabricar formas farmacéuticas sólidas, por ejemplo, se puede hacer referencia a "*Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*", título de Churchill Livingstone, 4.ª edición revisada, 2013 (ISBN: 978-0-7020-4290-4). El anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo y el al menos un aditivo pueden ser parte del mismo compartimento o capa de la forma farmacéutica sólida, o pueden ser parte de compartimentos o capas separados. En una realización de la presente invención, el aditivo es parte de un compartimento o capa y está en una matriz con el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo. Un "compartimento" de una forma farmacéutica sólida, como se usa en el presente documento, es una sección de la forma farmacéutica sólida completa que forma una subunidad distinta de la forma farmacéutica sólida, separable de los compartimentos vecinos de la forma farmacéutica sólida por sus propiedades fisicoquímicas. Los compartimentos pueden estar en forma de gránulos, partículas, micropartículas, nanopartículas, microgránulos, minicápsulas o minicomprimidos y similares, que se combinan en la forma farmacéutica sólida. Una "capa" de una forma farmacéutica sólida, como se usa en el presente documento es, por ejemplo, una película o recubrimiento de espesor definido, que se aplica a un núcleo inerte o a otra capa ya aplicada a un núcleo inerte, y que es separable del núcleo de la forma farmacéutica sólida u otras capas por sus propiedades fisicoquímicas. En la técnica se sabe cómo aplicar una capa a un núcleo inerte o encima de otra capa. Dependiendo de los constituyentes del núcleo inerte y de la una o más capas de la forma farmacéutica sólida, tras la exposición a un medio acuoso, las diferentes capas pueden disolverse secuencialmente, con la capa más externa en primer lugar, seguida de la capa justo por debajo, etc.; parcialmente de forma secuencial comenzando en primer lugar con la más externa, pero comenzando a disolverse la capa inferior antes de que la capa más externa se disuelva totalmente; o esencialmente simultáneamente, opcionalmente con el apoyo de la rápida disgregación del núcleo inerte, por ejemplo, debido a la presencia de disgregantes.

Si el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo y el al menos un aditivo seleccionado de acidificantes son parte de diferentes compartimentos de la forma farmacéutica sólida, pueden liberarse simultánea o secuencialmente, preferentemente simultáneamente, en analogía con la liberación de diferentes capas como se ha descrito anteriormente. Si el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo y el al menos un aditivo son parte de diferentes compartimentos y se liberan de forma secuencial o parcialmente secuencial, preferentemente, se libera en primer lugar el al menos un aditivo.

Si el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo y el al menos un aditivo son parte de diferentes capas de la forma farmacéutica sólida, las capas pueden estar separadas por una o más capas intermedias. Si el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo y el al menos un aditivo son parte de diferentes capas y se liberan de forma secuencial o parcialmente secuencial, preferentemente, se libera en primer lugar el al menos un aditivo.

El núcleo, las capas y/o los compartimentos de la forma farmacéutica sólida pueden comprender aditivos adicionales, como aglutinantes hidrófilos, cargas, disgregantes, plastificantes, agentes antiadherentes y lubricantes. Los expertos en la materia conocen aglutinantes hidrófilos, cargas, disgregantes, plastificantes, agentes antiadherentes y

lubricantes adecuados. Los ejemplos de aglutinantes hidrófilos incluyen copovidona, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona e hidroxipropilcelulosa. Los ejemplos de cargas incluyen lactosa, maltodextrina, manitol, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado y ésteres de sacarosa. Los ejemplos de disgregantes incluyen crospovidona, croscarmelosa de sodio, glicolato de almidón de sodio, celulosa microcristalina y almidón pregelatinizado. Los ejemplos de agentes antiadherentes incluyen dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, monoestearato de glicerilo. Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, monoestearato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado, laurilsulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, ácido esteárico, estearato de cinc, talco y ésteres de sacarosa.

En una realización de la presente invención, la composición en forma de una forma farmacéutica sólida comprende de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 50 % en peso, basándose en la forma farmacéutica total (preferentemente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 30 % en peso basándose en la forma farmacéutica total), de un anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo o una combinación de anticuerpos anti-TNF α y/o fragmentos funcionales de los mismos; de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 60 % en peso, basándose en la forma farmacéutica total (preferentemente de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 50 % en peso basándose en la forma farmacéutica total), de al menos un aditivo seleccionado de agentes tampón, acidificantes y combinaciones de los mismos; y de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 95 % en peso de la forma farmacéutica total de otros aditivos.

En una realización en la que al menos un aditivo seleccionado de acidificantes en la forma farmacéutica sólida es parte de un compartimento o capa separada del compartimento o capa que comprende el anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo, el compartimento o capa que comprende al menos un aditivo puede comprender el 1-80 %, preferentemente el 2-65 %, más preferentemente el 5-50 %, incluso más preferentemente el 10-40 % de aditivo, con respecto al peso total del compartimento o capa, y puede comprender además polímeros hidrófilos, cargas, disgregantes, agentes antiadherentes y lubricantes.

De acuerdo con la presente invención, la concentración en la luz del intestino grueso del anticuerpo contra TNF α o fragmento funcional del mismo tras la administración de la composición inventiva no está limitada particularmente. En una realización de la presente invención, la concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso tras la administración de la composición inventiva está en el intervalo de 0,02 mg/ml a 2 mg/ml, preferentemente de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml, más preferentemente de 0,2 mg/ml a 0,8 mg/ml.

Los presentes inventores han descubierto que mediante el aumento de la concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en el lado luminal de la pared del intestino grueso, por ejemplo, de 0,02 mg/ml progresivamente a 2 mg/ml, también aumenta la captación de anticuerpos dentro de la pared gastrointestinal en un período de tiempo determinado. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la composición para su uso en el tratamiento tóxico en la luz del intestino grueso de un paciente humano, proporciona una concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso, que se correlaciona directamente con el nivel tisular del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo captado dentro de la pared del intestino grueso. El nivel/extensión de la inflamación gastrointestinal debido a la enfermedad inflamatoria intestinal puede variar entre pacientes así como para un paciente determinado en puntos temporales diferentes. En la técnica se sabe cómo determinar el nivel/extensión de la inflamación gastrointestinal debida a la enfermedad inflamatoria intestinal. El nivel/extensión de la inflamación gastrointestinal debida a la enfermedad inflamatoria intestinal puede determinarse, por ejemplo, midiendo el nivel de un biomarcador fecal o serológico de inflamación gastrointestinal en muestras de heces o sangre, respectivamente, de un paciente, preferentemente un biomarcador fecal. Los biomarcadores fecales de inflamación gastrointestinal incluyen calprotectina, lactoferrina, S100A12 o TNF α y se pueden determinar mediante el uso de técnicas inmunoquímicas.

De acuerdo con el hallazgo anterior, la dosis de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo proporcionada a un paciente puede adaptarse a las necesidades individuales de cada paciente.

Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, la composición proporciona además una concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo, en la luz del intestino grueso que se adapta al nivel de inflamación en el intestino grueso del paciente humano, de manera que a un paciente con un nivel alto de inflamación gastrointestinal en el intestino grueso se le proporciona una mayor concentración de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso, dando como resultado un mayor nivel de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo captado por la pared del intestino grueso diana, que un paciente con un nivel de inflamación más bajo.

Por otra parte, los presentes inventores descubrieron que ya una concentración relativamente baja de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en el lado luminal de la pared del intestino grueso, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 mg/ml, es captada rápida y eficazmente dentro de la pared del intestino grueso y penetra eficazmente en la capa submucosa a las 2 h de la primera exposición. Por lo tanto, en una realización adicional de la presente invención, la composición proporciona una concentración de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso de aproximadamente 0,2 mg/ml, para pacientes humanos con niveles bajos a moderados de inflamación gastrointestinal. Los pacientes pueden tener niveles bajos a moderados de inflamación

gastrointestinal, debido a una forma menos grave de enfermedad inflamatoria intestinal (es decir, una forma leve o moderada de enfermedad inflamatoria intestinal), o debido al hecho de que están en remisión.

5 Las concentraciones dentro de los intervalos anteriores en la luz del intestino grueso pueden conseguirse mediante una acumulación selectiva de anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos. La forma y los medios de acumulación dirigida en la luz del intestino grueso no están particularmente limitados y pueden conseguirse mediante métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen aprovechar los procesos innatos del tracto gastrointestinal que dan como resultado, por ejemplo, diferencias de pH y microflora y tiempos de residencia específicos de los materiales ingeridos en diferentes secciones del tracto gastrointestinal. Se conocen en la técnica métodos para 10 muestrear concentraciones de proteínas específicas, incluyendo anticuerpos específicos en la luz del intestino grueso. Las muestras pueden recogerse, por ejemplo, de las heces expulsadas o usando un tubo flexible insertado a través del ano dentro del intestino grueso. La concentración de anticuerpos contra TNF α puede determinarse entonces usando ELISA o transferencias Western u otras técnicas inmunoquímicas, de manera similar a lo que se ha descrito para la medición de la concentración de TNF α fecal en Nicholls *et al.* (*J Clin Pathol.* agosto de 1993; 46(8): 757-760), 15 con un anticuerpo específico contra el anticuerpo anti-TNF o fragmento funcional del mismo utilizado en la composición.

Se ha descubierto que, si la capa mucosa de la pared del intestino grueso está dañada, la captación de anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos dentro de la pared del intestino grueso aumenta notablemente. Por 20 otra parte, si la capa mucosa de la pared del intestino grueso está dañada, los anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos son captados más rápidamente; de manera que, por ejemplo, ya 30 minutos después de la exposición inicial a anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos, en la mucosa colónica pueden encontrarse significativamente más anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos, si la capa mucosa está alterada. Por último, en caso de alteración de la capa mucosa, esto da como resultado una penetración rápida de 25 una fracción considerable, de los anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos captados, profundamente en la capa submucosa.

La alteración de la capa mucosa intestinal se considera un rasgo característico de la EII y se cree que provoca una inflamación intestinal crónica del área afectada de la pared gastrointestinal. Las áreas afectadas de la pared 30 gastrointestinal, por ejemplo, la pared del intestino grueso, de dicha inflamación intestinal crónica son los sitios de inflamación. Particularmente en la patogenia de la CU, la alteración de la capa mucosa se considera un factor importante. La expresión "alteración de la capa mucosa", como se usa en el presente documento, se refiere a la pérdida parcial o completa de la capa mucosa de la capa epitelial más externa de la mucosa.

35 Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el tratamiento tópico da como resultado una captación aumentada del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo dentro de la pared del intestino grueso en los sitios de inflamación. En otra realización de la presente invención, el tratamiento tópico da como resultado una absorción más rápida del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo dentro de la pared gastrointestinal en los sitios de inflamación. En otra realización más de la presente invención, el tratamiento tópico da como resultado 40 una penetración más rápida del anticuerpo específico contra TNF α o fragmento funcional del mismo dentro de la capa submucosa más profunda de la pared gastrointestinal en los sitios de inflamación. En una realización preferida, es el anticuerpo anti-TNF α , para el que la captación aumenta o es más rápida, o para el que la penetración es más profunda en el sitio de inflamación.

45 Los presentes inventores descubrieron que, tras la incubación de anticuerpos anti-TNF α o fragmentos funcionales de los mismos con el tejido colónico, aunque son captados eficientemente en el lado luminal, ningún anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo había abandonado la pared del intestino grueso en el lado opuesto después de 2 h de incubación, lo que indica que los anticuerpos contra TNF α o fragmentos funcionales de los mismos quedan retenidos eficazmente en el tejido colónico. Por lo tanto, en otra realización más de la presente invención, el tratamiento 50 tópico con la composición inventiva da como resultado una retención del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la pared gastrointestinal, con sólo una liberación sistémica menor al resto del cuerpo.

En una realización de la presente invención, la composición para su uso en el tratamiento tópico de las enfermedades inflamatorias intestinales proporciona una concentración de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en 55 la luz del intestino grueso de 0,02 mg/ml a 0,4 mg/ml. Concentraciones preferidas adicionales en la luz del intestino grueso de acuerdo con esta realización son de 0,05 mg/ml a 0,35 mg/ml, más preferentemente de 0,1 mg/ml a 0,3 mg/ml, mucho más preferentemente de 0,15 mg/ml a 0,25 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,2 mg/ml. En otra realización de la presente invención, la composición para su uso en el tratamiento tópico de las enfermedades inflamatorias intestinales proporciona una concentración de anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en 60 la luz del intestino grueso de 0,4 a 1 mg/ml. Concentraciones preferidas adicionales en la luz del intestino grueso de acuerdo con esta realización son de 0,5 mg/ml a 0,95 mg/ml, más preferentemente de 0,6 mg/ml a 0,9 mg/ml, mucho más preferentemente de 0,75 mg/ml a 0,85 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,8 mg/ml.

En una realización alternativa, el uso de la composición inventiva da como resultado una disminución del pH, de 65 acuerdo con los valores de pH como se definen en una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el íleon terminal del intestino delgado de un paciente humano. En otra realización alternativa, el uso de la composición inventiva

proporciona una concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con las concentraciones como se definen en una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el íleon terminal del intestino delgado de un paciente humano. Una disminución de este tipo del pH luminal y dichas concentraciones en el íleon terminal son particularmente beneficiosas para pacientes que padecen la enfermedad de Crohn. Por lo tanto, para estas realizaciones alternativas, el paciente humano es preferentemente un paciente que padece la enfermedad de Crohn.

De acuerdo con la presente invención, puede usarse un fragmento funcional de un anticuerpo específico de TNF α en la composición para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. Como se muestra para el fragmento Fab del ejemplo 6, el uso de dicho fragmento funcional permite la absorción aumentada dentro de la pared del intestino grueso y puede conducir a la acumulación del fragmento funcional en la mucosa y en la submucosa. El fragmento funcional específico contra TNF α de la presente invención es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un scFv, un dsFv, un VHH, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una proteína de fusión Fc o un minicuerpo.

En una realización de la presente invención, la composición para su uso en el tratamiento tópico de las enfermedades inflamatorias intestinales se administra por vía oral. La administración oral en el contexto de la presente invención significa la introducción de la composición en el tracto gastrointestinal a través de la boca. En una realización preferida de la presente invención, la composición es una forma farmacéutica sólida, preferentemente en forma de microgránulo, gránulo, micropartícula, nanopartícula, minicomprimido, cápsula o comprimido recubierto con un material de recubrimiento que impide la liberación de la composición antes de la región ileocolónica del intestino. La región ileocolónica es la región del tracto gastrointestinal donde el intestino delgado se fusiona con el intestino grueso, es decir, el íleon terminal.

Se conocen en la técnica materiales de recubrimiento para la liberación dirigida de una composición en la luz del intestino grueso. Se pueden subdividir en materiales de recubrimiento que se disgregan por encima de un pH específico, materiales de recubrimiento que se disgregan después de un tiempo de residencia específico en el tracto gastrointestinal y materiales de recubrimiento que se disgregan debido a desencadenantes enzimáticos específicos de la microflora del intestino grueso. Se han revisado materiales de recubrimiento de estas tres categorías diferentes para dirigirse al intestino grueso, por ejemplo, en Bansal. *et al.* (*Polim. Med.* 2014, 44, 2109-118). Estos usos de dichos materiales de recubrimiento también se han descrito, por ejemplo, en el documento WO2007/122374A2, el documento WO0176562A1, el documento WO03068196A1 y el documento GB2367002A.

Los materiales de recubrimiento preferidos de la presente invención son ftalato de acetato de polivinilo, trimelitato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa HP-50, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa HP-55, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa HP-55S, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, copolímero de ácido acrílico, Eudragit L100-55, Eudragit L30D-55, Eudragit L-100, Eudragit L12.5, Eudragit S-100, Eudragit S12.5, Eudragit FS30D, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, PEG 6000, Ac-di-sol, talco, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), hidroximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, sulfato de condroitina, pectina, goma guar, quitosano, lactosa, maltosa, celobiosa, inulina, ciclodextrina, lactulosa, rafinosa, estaquirosa, alginato, dextrano, goma xantana, goma guar, almidón, tragacanto, goma garrofín, celulosa, arabinogalactano, amilosa y combinaciones de los mismos.

En una realización diferente de la presente invención, la composición para su uso en el tratamiento tópico de las enfermedades inflamatorias intestinales se administra por vía rectal. La administración rectal en el contexto de la presente invención significa la introducción de la composición dentro del tracto gastrointestinal a través del ano. En una realización preferida de la presente invención, la composición se usa en forma de un enema, un gel, una espuma o un supositorio.

Una dosis unitaria de la composición puede comprender una cantidad de agente activo en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 80 mg, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg.

La composición de la presente invención se administra preferentemente al paciente de una a tres veces al día. En una realización, la composición se administra dos veces al día. En otra realización, la composición se administra tres veces al día. Mucho más preferentemente, la composición se administra una vez al día.

La composición descrita en el presente documento puede usarse en un método para prevenir una fase aguda de la enfermedad inflamatoria intestinal. La composición descrita en el presente documento puede usarse en un método para prevenir los brotes en un paciente que tiene enfermedad inflamatoria intestinal en remisión.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Ejemplos

Materiales y métodos aplicados en los ejemplos

Modelo de colon humano

5 Se usó un modelo de colon basado en un inóculo fecal mixto para imitar el ambiente luminal del intestino grueso humano. El modelo se instaló dentro de una estación de trabajo anaeróbica (estación de trabajo Electrotek 500TG, Electrotek, West Yorkshire, Reino Unido) se mantuvo a 37 °C y una humedad relativa del aire del 70 %. A tres voluntarios humanos sanos se les entregaron recipientes de plástico previamente pesados en los que se recogieron muestras fecales. Los voluntarios no tomaban medicación y no habían tomado antibióticos durante al menos los seis meses anteriores. La materia fecal se transfirió en la estación de trabajo anaeróbica y se diluyó con medio basal recién preparado (como se describe en Hughes *et al.*, 2008, *FEMS Microbiol Ecol* 64(3): 482-493) para obtener una suspensión al 15 % p/p mediante homogeneización usando un homogeneizador Ultra Turrax® (IKA T18 Basic) a una velocidad de 18.000 rpm. El medio bacteriano homogeneizado se tamizó a través de un tejido de malla abierta (SefarNitex®, tamaño de poro 350 µm) para eliminar cualquier material fibroso no homogeneizado. El pH y la capacidad tamponante de la suspensión fecal humana fueron 6,8 y 28,3 mM/l/unidad de pH respectivamente, que concuerdan estrechamente con los valores del colon ascendente humano descritos en la técnica anterior. El modelo se ha usado ampliamente para evaluar la estabilidad de moléculas pequeñas y péptidos en el colon. Por otra parte, Tannergren *et al.* (2008 *Eur J Pharm Sci* 57: 200-206), quienes lograron una buena correlación entre la degradación del fármaco en el colon y la fracción absorbida en el colon, han demostrado la relevancia *in vivo* de este tipo de modelo de colon.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

25 El análisis de la muestra se realizó usando un sistema de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) (Agilent Technologies, 1260 Infinity) equipado con una bomba (modelo G1311C), un muestreador automático (modelo G1329B) y un detector UV de matriz de diodos (modelo G1314B). Se usó una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SE, por sus siglas en inglés) Biosep de 600 x 7,8 mm de 5 µm SEC-s3000 de 400 Å (Phenomenex, de Torrance, CA) para la separación de muestras usando solución salina de tampón de fosfato (pH 7,3) preparada en agua estéril de calidad HPLC como fase móvil para la elución, a un caudal de 1 ml/min. El análisis se realizó a temperatura ambiente y la longitud de onda de detección de UV se ajustó a 280 nm. Cada muestra se analizó durante 40 minutos para permitir la elución completa de las proteínas de la muestra y reducir el exceso. El tiempo de retención del anticuerpo IgG1, los fragmentos F(ab')₂ y Fab/Fc fue de 17, 18,2 y 20,3 minutos, respectivamente.

SDS-PAGE y tinción con plata

Después de la separación en el sistema de SE-HPLC, las muestras se retiraron en sus respectivos tiempos de retención y se analizaron para su identificación a través de determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE usando un tanque de electroforesis XCell SureLock® Mini-Cell (ThermoFisher Scientific) y un gel prefabricado Novex®Bis-Tris al 4-12 % (ThermoFisher Scientific). Se añadieron 6 µl de tampón de muestra LDS a 20 µl de solución de muestra y se añadieron 20 µl de esta mezcla a los pocillos del gel junto con 3 µl de patrón de proteína. Se añadió una solución tampón de ejecución recién preparada diluida 10 veces y el gel se ejecutó a 200 V durante 50 minutos. Al final de la operación, el gel se retiró con cuidado y se añadió a 20 ml de colorante de color azul de Coomassie durante al menos 1 hora con agitación suave. Debido a la baja concentración del anticuerpo intacto y de los fragmentos formados, la tinción con azul de Coomassie no fue suficiente para visualizar claramente las bandas de proteínas. Por lo tanto, se realizó una tinción con plata en el mismo gel después de cada análisis debido a la alta sensibilidad del método. El gel se lavó dos veces con agua durante 5 minutos. El gel se fijó en etanol al 30 %: ácido acético al 10 %: agua al 60 %, dos veces durante 15 minutos con agitación suave. El gel se lavó con etanol al 10 %, dos veces durante 5 minutos seguido de agua usando el mismo ciclo. Después de esto, el gel se sensibilizó durante 1 minuto con solución sensibilizadora y después se lavó con agua dos veces durante 1 minuto cada una. Después, la tinción del gel se realizó durante 30 minutos en la solución de tinción seguido de lavado dos veces durante 20 segundos cada uno con agua. Después, el gel se incubó en una solución reveladora (25 ml/gel) durante 2-3 minutos hasta que las bandas empezaron a aparecer claramente. La acción se detuvo añadiendo una solución de ácido acético al 5 % durante 10 minutos.

Muestras de tejido

60 Todos los experimentos que usaron muestras de tejido de rata fueron aprobados por el comité de revisión ética de la Facultad de Farmacia de la University College London (UCL) y se realizaron de acuerdo con las normas de la oficina central del Reino Unido a tenor de la Ley de Animales (Procedimientos Científicos), 1986. Se usaron ratas Wistar macho de 6 a 8 semanas de edad (Harlan UK Ltd, Oxfordshire, Reino Unido) que pesaban de 200 a 250 g. Los animales se alojaron a temperaturas controladas con ciclos de luz y oscuridad, fueron alimentados con gránulos de pienso para ratones convencionales, tuvieron acceso a agua corriente embotellada y se aclimataron antes de ser estudiados. Las ratas se sacrificaron colocando al animal en una cámara de CO₂ durante 5 minutos.

Uso en la cámara de Ussing

El segmento de tejido se recogió del colon ascendente de una rata wistar macho y se transfirió a una solución enfriada con hielo de solución Ringer de bicarbonato de Krebs (KBr) de pH 7,4. El tejido se abrió transversalmente y se lavó con solución de KBr para eliminar el contenido luminal y se montó en cámaras de Ussing (Harvard Apparatus, Cambridge, Reino Unido). El sistema consiste en una cámara apical que representa el lado luminal (de la mucosa) del tejido y una cámara basolateral que representa el lado sanguíneo (de la serosa). El área de tejido expuesto a cada lado de la cámara fue de 0,29 cm² y la región de montaje del tejido fue de 4 x 8 mm. El volumen de KBr en cada cámara fue de 3 ml y el pH se mantuvo en 7,4. El sistema de trabajo consiste en un conjunto con capacidad para un máximo de seis cámaras verticales, un colector de gas para purga de carbono (O₂ al 95 %, CO₂ al 5 %) y un bloque calentador para mantener la temperatura de las cámaras a 37 °C durante los experimentos con el uso de un baño de agua circulante.

El tejido se incubó con KBr durante 20 minutos antes de la adición del fármaco. Las concentraciones de infliximab (anticuerpo monoclonal [mAb] anti-TNF α IgG1:κ-quimérico de ratón-humano disponible en el mercado) y adalimumab (anticuerpo monoclonal anti-TNF α IgG1 humano disponible en el mercado) probadas durante los experimentos de permeación fueron de 2 mg/ml, 0,8 mg/ml y 0,2 mg/ml. Las concentraciones de fragmentos Fab de infliximab y adalimumab probadas durante los experimentos de permeación fueron de 0,2 mg/ml y 0,8 mg/ml. Los anticuerpos y los fragmentos Fab se añadieron en la cámara apical del sistema de cámara de Ussing frente al lado luminal (de la mucosa) del tejido y se incubaron durante 2 horas, a menos que se especifique otra cosa para diferentes estudios de puntos temporales. El tejido sin fármaco se incubó en paralelo durante el mismo tiempo que actuó como control. Las cámaras se purgaron con O₂ al 95 %, CO₂ al 5 % y se mantuvieron a 37 °C mediante camisas de agua durante la incubación. Se retiraron muestras (150 μ l) de ambos compartimentos en puntos temporales cada hora y se añadieron a un cóctel inhibidor de proteasa (450 μ l) para cuantificar la cantidad de IgG o fragmento Fab que había penetrado en el tejido desde la cámara apical. La resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) se controló continuamente durante el experimento para confirmar la viabilidad e integridad del tejido. Los tejidos con un valor TEER inferior a 200 no se usaron para los experimentos de permeación.

Criosección, tinción secundaria de anticuerpos y microscopía de barrido láser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés)

La sección de tejido expuesta a los anticuerpos o fragmentos Fab se cortó suavemente al final del experimento y se transfirió inmediatamente a un criostato (Leica CM3050, Leica Microsystems, Milton Keynes, Reino Unido) a -20 °C. El tejido se dejó congelar durante 15-20 minutos. Después de congelar el tejido, se cortaron secciones delgadas de tejido (10 μ m) y se montaron en portaobjetos de microscopio adherentes (SuperFrost® Plus, VWR International, Leuven, Bélgica). Se cortaron hasta 6 secciones del tejido expuesto al fármaco y 2 secciones del tejido de control sin fármaco. Los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de iniciar el procedimiento de tinción. Las secciones de tejido se fijaron en paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, Reino Unido) durante 10 minutos, seguido de una incubación con tensioactivo Triton X-100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich, Reino Unido) durante 5 minutos para abrir las uniones estrechas. Después, las secciones se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (Sigma-Aldrich, Reino Unido) durante 30 minutos para evitar la unión no específica. Se incluyeron etapas de lavado en cada fase usando solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después, las secciones se tiñeron con anticuerpo secundario, 10 μ g/ml, (Rojo) (anti-IgG humana de cabra, Alexa Fluor® 633, Molecular Probes, Reino Unido) durante 1 hora. A esto le siguió la tinción con tinción de membrana plasmática de color verde CellMask (Verde) (Molecular Probes, Reino Unido) (solución 0,5 X en PBS) a 37 °C durante 1 minuto para teñir los componentes celulares, incluyendo la membrana celular y el citoplasma. Después, las secciones se tiñeron con medio de montaje vectashield® Hard Set con DAPI (Azul) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE. UU.) para teñir los núcleos celulares. Los portaobjetos se almacenaron a 2-8 °C en la oscuridad hasta el análisis mediante CLSM (LSM 710, Zeiss, Cambridge, Reino Unido). Las imágenes se procesaron y analizaron mediante el software de formación de imágenes Zen 2012 (Carl Zeiss Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Alteración de la capa mucosa colónica

Se expusieron muestras de tejido de rata Wistar macho recién extirpadas del colon ascendente y descendente a una solución mucolítica de N-acetil-L-cisteína (NAC) al 10 % p/v (Sigma-Aldrich, Reino Unido) durante 10 minutos a temperatura ambiente en una placa de Petri. La solución de NAC se preparó en PBS y se disolvió calentando a 40 °C. Después de la exposición a NAC, el tejido de colon imita un estado de barrera mucosa lesionado/comprometido y actúa como un modelo local de disfunción de la barrera mucosa. La concentración de NAC utilizada y el tiempo de incubación con las muestras de tejido se basaron en estudios anteriores realizados por Qin y sus colegas que demostraron que una concentración del 10 % y 10 minutos de tiempo de exposición eran suficientes para dañar la capa mucosa y reducir la hidrofobia de la mucosa (Qin *et al.*, 2008, *Shock* 29(3): 372-376). El modelo actual no es invasivo y previene cualquier daño morfológico potencial al epitelio que pueda ser provocado por el raspado físico o el método de succión para eliminar la capa mucosa, permitiendo la investigación de la capa mucosa como barrera.

Digestión de anticuerpos

Se digirió infliximab o adalimumab proteolíticamente usando papaína inmovilizada (Thermo Fisher Scientific, N.º de catálogo 20341). En la Figura 9 se muestra una representación esquemática del proceso de Markforged. El tampón de digestión consistió en fosfato de sodio monobásico (Sigma Aldrich, n.º de catálogo S8282-500G), ácido

etilendiaminotetraacético, dihidrato (EDTA, Fisher Scientific, n.º de cat. BP120-500) y monohidrato de clorhidrato de L-cisteína (Fluka, n.º de cat. 30129). El pH del tampón se ajustó usando una solución de hidróxido de sodio (1,0 M, Merck, n.º de cat. HC267016) o ácido clorhídrico (1,0 M, Fisher Scientific, n.º de cat. J/4320/15). La purificación de los anticuerpos digeridos se realizó usando una columna de centrifugación de proteína A NAbTM (Pierce, n.º de cat. 81956). Los fragmentos Fab y Fc de anticuerpos se eluyeron usando proteína A. Tampón de unión a IgG (tampón Tris 1,0 M con EDTA, pH 8,0; Thermo Scientific, n.º de cat. 21007) y tampón de elución de IgG (tampón Tris 1,0 M, pH 8,5; Thermo Scientific, n.º de cat. 21004). Tampón neutralizante (tampón Tris 1,0 M, pH 8,5, Thermo Scientific).

Recogida de tejido humano

Se recogió una muestra de biopsia de un paciente con cáncer de colon sometido a resección quirúrgica. El sujeto había firmado un formulario de consentimiento por escrito para permitir el uso de la muestra de tejido con fines de investigación. La biopsia se tomó de la región alrededor del tumor en el segmento del colon ascendente que no era patológica y se consideró una muestra de mucosa intestinal histológicamente normal. La cirugía se realizó en el Royal London Hospital, Universidad Queen Mary de Londres, y la muestra de tejido se usó inmediatamente para el estudio de incubación en cámara de Ussing realizado en el Instituto Wingate de Neurogastroenterología.

Resultados

Ejemplo 1

Se probaron infliximab y adalimumab (mAb) en presencia de bacterias del colon humano que imitaban el intestino grueso humano. La estabilidad de infliximab y adalimumab en condiciones del colon humano se muestra en la Figura 1. Después de 1 hora, se detectó el 75 % de la dosis de infliximab. Después de 2 horas, casi el 40 % de la dosis de infliximab estaba intacta ($t_{1/2} = 96,08 \pm 7,60$ min). En el caso del adalimumab, el 50 % de la dosis se fragmentó después de 1 hora mientras que el 20 % de la dosis permaneció sin cambios después de 2 horas ($t_{1/2} = 54,35 \pm 0,18$ min). Una proporción de ambos mAb se había fragmentado en fragmentos F(ab')₂, Fab y Fc. Estos resultados muestran que en el modelo de colon humano se puede esperar que infliximab y adalimumab tengan una estabilidad alta en el colon humano, donde la degradación de la estructura intacta se debe principalmente a la formación de fragmentos F(ab')₂ y Fab y sólo en menor medida a la degradación en péptidos más pequeños terapéuticamente inactivos.

Ejemplo 2

Penetración de infliximab y adalimumab en tejido de colon ascendente de rata a 2 mg/ml

La capacidad de la IgG1 quimérica infliximab y de la IgG1 humana adalimumab para penetrar el tejido colónico a una concentración de incubación de 2 mg/ml se investigó usando un segmento de tejido colónico ascendente de rata fijado en un sistema de cámara de Ussing. Después de la incubación, criosección y tinción con el anticuerpo secundario, las secciones de tejido se analizaron mediante microscopía confocal. Se seleccionó la concentración de 2 mg/ml para estudiar el efecto de una concentración alta de mAb sobre la capacidad de penetrar en el tejido de colon. Usando SE-HPLC, la cantidad de dosis de infliximab y adalimumab que penetró en el tejido se estimó cuantitativamente midiendo la cantidad de mAb que abandonó el lado apical del sistema de cámara de Ussing, penetrando en el tejido, en puntos temporales diferentes durante la incubación (Figura 2).

Se redujo aproximadamente el 10 % (0,2 mg/ml) y el 6 % (0,12 mg/ml) de la concentración de incubación de infliximab y adalimumab, respectivamente, en el compartimento apical al final de las 2 h de incubación. No se detectó fármaco en el lado basolateral al final de las 2 h de incubación. Esto muestra que los anticuerpos quedaron potencialmente retenidos en el tejido de colon durante al menos 2 h sin permeación hacia el lado basolateral. El análisis de las imágenes de CLSM de las secciones de tejido al final del experimento de incubación en la cámara de Ussing reveló la ubicación de los mAb en el tejido de colon ascendente (Figura 3A, C). Se demostró que una proporción significativa de la dosis de infliximab quedó atrapada en la capa mucosa que recubre las células epiteliales. Sin embargo, las imágenes confocales también mostraron que una proporción de la dosis fue capaz de penetrar a través de la capa mucosa más profundamente en las células epiteliales de la mucosa y una proporción de la dosis también pudo alcanzar la región submucosa del tejido colónico. El tejido de control que se fijó en el sistema de cámara de Ussing sin exposición a mAb se tiñó con el mismo procedimiento que el tejido expuesto al fármaco y mostró algo de señal de fondo, aunque muy poca, debido a la unión no específica del anticuerpo secundario con los componentes del tejido (Figura 3B, D). Se observó una tendencia similar con adalimumab con una señal alta observada en las regiones mucosa y submucosa (Figura 4A, C) en comparación con el control (Figura 4B, D).

Ejemplo 3

Penetración de infliximab y adalimumab en tejido de colon ascendente de rata a 0,8 mg/ml

La capacidad de los mAb infliximab y adalimumab para penetrar el tejido colónico a una concentración de 0,8 mg/ml se investigó usando la misma configuración experimental que en el ejemplo 2. Se redujo aproximadamente el 14 %

(0,11 mg/ml) y el 5 % (0,04 mg/ml) de la concentración de incubación de infliximab y adalimumab en el compartimento apical, respectivamente, al final de 2 horas (Figura 5). Para correlacionar los datos de SE-HPLC con niveles tisulares cualitativos de infliximab y adalimumab, las secciones de tejido se analizaron mediante CLSM de las secciones de tejido (Figura 6). El infliximab logró penetrar en la mucosa y también se detectó una fracción de la dosis en la región submucosa del tejido de colon. También se detectó señal de adalimumab en la capa mucosa, indicando la penetración del fármaco dentro del tejido de colon. Sin embargo, en comparación con la concentración apical más alta (2 mg/ml), la concentración actual mostró una señal de fármaco más baja en los segmentos de tejido de colon. A pesar de una mayor reducción de la dosis de infliximab en el compartimento apical en comparación con adalimumab, no se observaron diferencias cualitativas en los niveles y la ubicación del fármaco mediante microscopía de barrido láser confocal. Se observó una señal de fondo mínima con las muestras de tejido de control negativo cuando se tiñeron con el anticuerpo secundario (Figura 6B y D).

Ejemplo 4

15 Penetración de infliximab y adalimumab en tejido de colon ascendente de rata a 0,2 mg/ml

La capacidad de infliximab y adalimumab para penetrar dentro del tejido colónico a una concentración de incubación de 0,2 mg/ml se investigó usando un segmento de tejido de colon ascendente de rata fijado en el sistema de cámara de Ussing usando la misma configuración experimental que en los ejemplos 2 y 3. Se redujo aproximadamente el 14 % (0,03 mg/ml) y el 6 % (0,01 mg/ml) de la dosis de infliximab y adalimumab en el compartimento apical, respectivamente, al final de 2 h (Figura 7). Para determinar la correlación de la reducción de la concentración apical con la señal cualitativa del fármaco en el tejido, se realizó un análisis de microscopía de barrido láser confocal. Las imágenes de CSLM de las secciones de tejido se muestran en la Figura 8. Curiosamente, se detectaron tanto infliximab como adalimumab en las regiones mucosas y submucosas del tejido de colon sin diferencias en la señal del fármaco o la ubicación regional entre los dos anticuerpos. El tejido de control sin exposición al fármaco mostró una señal de fondo mínima con el anticuerpo secundario (datos no mostrados). Los datos actuales mostraron que, a pesar de que los mAb son de naturaleza altamente hidrófila, son capaces de permear las capas mucosas hidrófobas externa e interna para penetrar más profundamente en las regiones mucosas y submucosas del tejido de colon a las tres concentraciones probadas.

Ejemplo 5

Penetración de infliximab y adalimumab en tejido de colon ascendente de rata a 0,02 mg/ml

La concentración más baja de mAb evaluada en el conjunto actual de estudios de concentración apical fue de 0,02 mg/ml. Sin embargo, a esta concentración, se descubrió que la SE-HPLC no era un método preciso para predecir indirectamente la penetración de anticuerpos dentro del tejido midiendo la reducción de la concentración de anticuerpos en el compartimento apical. Las imágenes de CLSM de la penetración de infliximab y adalimumab en el tejido de colon mostraron para ambos mAb una señal significativamente menor en los estudios de penetración a la concentración más baja en comparación con las concentraciones apicales más altas (datos no mostrados). Se demostró que infliximab penetra a niveles bajos en las regiones mucosa y submucosa del tejido de colon. Sin embargo, el adalimumab mostró poca o ninguna señal detectable en ambas regiones del tejido de colon. El tejido de control sin exposición a los mAb no mostró ninguna señal.

Ejemplo 6

Penetración tisular del fragmento Fab de infliximab

Se digirió infliximab mediante digestión mediada por papaína para obtener fragmentos Fab purificados del mAb (Figura 9). Se probó la pureza de los fragmentos Fab mediante SDS-PAGE y SE-HPLC y la afinidad de unión al anticuerpo secundario mediante transferencia puntual para determinar su ubicación en el tejido mediante microscopía confocal. Se probó la penetración de los fragmentos Fab de infliximab y adalimumab en el segmento de tejido de colon ascendente de rata a concentraciones apicales de 0,8 mg/ml y 0,2 mg/ml, respectivamente. Los tejidos de colon conservaron su integridad de las uniones estrechas durante la incubación con fragmentos Fab de infliximab y adalimumab a ambas concentraciones apicales. A una concentración apical de 0,8 mg/ml, ambos anticuerpos Fab mostraron la capacidad de penetrar a través de la capa mucosa en el tejido de colon con una señal alta observada tanto en las regiones mucosas como submucosas (Figuras 10 y 11). Se observó una señal de fondo mínima en las muestras de tejido de control sin exposición a los Fab. A una concentración apical de 0,2 mg/ml, se detectó una señal más baja para los fragmentos Fab de infliximab y adalimumab en el tejido de colon, aunque también a esta concentración ambos anticuerpos penetraron tanto en la región mucosa como en la submucosa (Figura 12). La alta penetración tisular de los fragmentos Fab tiene una posible relevancia terapéutica puesto que Fab es la región de unión a antígeno que puede unirse al epítipo del TNF α , evitando la interacción del TNF α con su receptor, lo que podría provocar una respuesta antiinflamatoria. A ambas concentraciones apicales, no se observó ninguna permeación de fragmentos Fab a través del tejido hacia el compartimento basolateral que se confirmó mediante SEC (datos no mostrados).

Ejemplo 7

Barrera mucosa alterada en comparación con barrera mucosa intacta en colon ascendente frente a descendente. La Figura 13 muestra la penetración de los mAb infliximab y adalimumab en muestras de tejido de colon ascendente y descendente con una capa mucosa alterada después del tratamiento con solución de NAC. Ambos mAb se probaron en regiones de colon ascendente y descendente del mismo animal para una comparación directa de las diferencias regionales (n = 3). La concentración apical de mAb se seleccionó para que fuera de 0,2 mg/ml puesto que a esta concentración. Curiosamente, la señal del fármaco fue significativamente mayor en las regiones del colon ascendente y descendente con una capa mucosa alterada en comparación con el tejido de colon con una capa mucosa intacta. Esta tendencia fue similar en las tres ratas con la capa mucosa alterada en comparación con las tres ratas con la capa mucosa intacta, confirmando que los mAb son capaces de penetrar tanto en las regiones proximales como en las distales del intestino grueso, y que en ambas regiones la capa mucosa alterada da como resultado una captación aumentada de los mAb. Se observaron resultados similares cuando ambos anticuerpos se probaron en tejido de colon de la misma rata. Por otra parte, no se observó permeación de mAb a través del tejido de colon hacia el compartimento basolateral al realizar SEC, mostrando retención de fármaco en el tejido con capa mucosa alterada. El experimento se repitió con fragmentos Fab de infliximab y adalimumab. Para ello, se incubó tejido de colon ascendente a una concentración apical de los Fab de 0,2 mg/ml en presencia y ausencia de una capa mucosa intacta. También en este caso se observó una tendencia similar, con mayor captación en el tejido de colon con capa mucosa alterada en comparación con la capa mucosa intacta, aunque el efecto fue menos pronunciado (datos no mostrados).

Ejemplo 8

Tiempo necesario para la penetración de mAb en el tejido de colon

En ejemplos anteriores, se evaluó la penetración de los mAb infliximab y adalimumab en el tejido de colon al final de 2 h de incubación en el sistema de cámara de Ussing. En el presente ejemplo, el nivel de penetración en el tejido de colon ascendente después de 30 minutos, 1 h y 2 h de tiempo de incubación a una concentración apical de mAb de 0,2 mg/ml. Con el fin de tomar muestras para el análisis por microscopía confocal, se realizaron tres incubaciones en cámara de Ussing en paralelo que se detuvieron a los 30 minutos, 1 h y 2 h, respectivamente. Se tomó una muestra de tejido de colon para las tres incubaciones del mismo animal para comparar directamente la penetración del anticuerpo después de los 3 puntos temporales diferentes. El estudio se realizó en un total de 3 ratas. En todos los estudios se demostró que infliximab penetra consistentemente en la región mucosa del tejido de colon a los 30 minutos de la incubación. En estudios de incubación de 1 h, el infliximab mostró una penetración más profunda en el tejido de colon con señal de fármaco detectada en la mucosa y submucosa. Esta penetración se potenció a medida que el tiempo de incubación aumentó a 2 h. No se observó permeación de infliximab al compartimento basolateral, como se mide mediante SEC. Se usó el mismo diseño de estudio para investigar el tiempo que tarda el anticuerpo en penetrar el tejido de colon ascendente con una barrera mucosa alterada después del tratamiento con NAC. Se observó una señal alta del fármaco en el tejido de colon ascendente después de 30 minutos de incubación en toda la región mucosa y submucosa (datos no mostrados). Esto fue significativamente mayor que la penetración de infliximab observada en el tejido de colon con la capa mucosa intacta después del mismo punto temporal.

Ejemplo 9

Efecto del pH 6 luminal ácido sobre el transporte de infliximab y adalimumab en el tejido colónico. En el presente ejemplo, se exploró el efecto del pH luminal ácido sobre el transporte de infliximab y adalimumab a una concentración de 0,2 mg/ml a un pH 6 y 7,4 apical, respectivamente, en tejido de colon ascendente de rata montado en el sistema de cámara de Ussing. Después de la incubación, criosección y tinción con el anticuerpo secundario, las secciones de tejido se analizaron mediante microscopía confocal. Las Figuras 14 y 15 muestran el transporte de infliximab y adalimumab a pH 6 apical en comparación con pH 7,4. Tanto para infliximab (Figura 14) como para adalimumab (Figura 15), la señal del fármaco fue significativamente mayor en la mucosa del tejido de colon a pH 6 apical en comparación con un pH 7,4. El análisis por SEC de muestras del compartimento basolateral reveló que ningún fármaco penetró a través del tejido de colon dentro del compartimento basolateral. Por lo tanto, un pH luminal que es ácido (pH ~ 6) parece potenciar la penetración y ubicación de infliximab y adalimumab en muestras de tejido de colon ascendente, en comparación con un pH neutro ~7,4.

Ejemplo 10

En el presente ejemplo se investigó la captación y penetración de infliximab y adalimumab en muestras de tejido humano. Los estudios de captación y penetración de infliximab y adalimumab se realizaron montando muestras de tejido humano en un sistema de cámara de Ussing y la ubicación se analizó cualitativamente usando el método de detección de anticuerpos secundarios anti-IgG humana y un análisis adicional mediante microscopía de barrido láser confocal como se usó anteriormente en modelos de roedores. La penetración de infliximab y adalimumab se probó a una concentración apical de 0,2 mg/ml y pH 7,4 durante 2 h. Los datos de SE-HPLC revelaron que los niveles de anticuerpo

restantes en el compartimento apical al final de 2 h de incubación en la cámara de Ussing. Tanto para infliximab como

para adalimumab, quedaba el 35 % de la dosis al final de las 2 h (Figura 16). No se detectó ningún fármaco mediante SE-HPLC en el compartimento basal al final de la incubación. La CLSM después del experimento de la cámara de Ussing reveló que la señal de infliximab se detectó tanto en la mucosa colónica como en la región de la lámina propia (Figura 17), mientras que adalimumab mostró una señal más débil en la región de la mucosa (datos no mostrados).
 5 La muestra de tejido de control sin exposición a los mAb no mostró una alta interferencia con el anticuerpo secundario anti-humano.

Ejemplo 11

10 Ejemplo de formulación: Enema (Adalimumab en comprimido, para reconstituir en vehículo) en dos concentraciones diferentes (100 mg y 80 mg de adalimumab, respectivamente).

Tabla 1.

Componentes	Cantidad		Cantidad		Función
Comprimido					
Adalimumab (liofilizado)	100	mg	80	mg	Principio activo
Celulosa microcristalina	372,5	mg	392,5	mg	Aglutinante
Polividona	25	mg	25	mg	Disgregante
Estearato de magnesio	2,5	mg	2,5	mg	Lubricante
Líquido para reconstitución					
Citrato de sodio	600	mg	600	mg	Modificador del pH
Ácido cítrico	1130	mg	1130	mg	Modificador del pH
Tris	2190	mg	2190	mg	Modificador del pH
Parahidroxibenzoato de metilo	80	mg	80	mg	Conservante
Parahidroxibenzoato de propilo	20	mg	20	mg	Conservante
Cloruro de sodio	900	mg	900	mg	Para isotonicidad
Agua purificada	100	ml	100	ml	Diluyente

15 Este enema consiste en dos componentes: un comprimido dispersable y un vehículo. El enema de Adalimumab se reconstituye antes de su uso. El volumen del enema reconstituido es de aproximadamente 115 ml.

Las cantidades anteriores se refieren a una unidad. Un tamaño de lote adecuado para la fabricación es, por ejemplo, 1.000 unidades.

20

Instrucciones de fabricación:

Comprimido:

25 Etapa 1: Preparación de la premezcla

Se mezclan adalimumab y celulosa microcristalina en un mezclador planetario durante aproximadamente 10 minutos. Se añade estearato de magnesio a través de un tamiz de 0,5 mm y se continúa mezclando durante 2 minutos.

30 Etapa 2: Mezcla final

Se añade la premezcla a través de un tamiz de 1,0 mm a un mezclador y se mezcla durante 20 minutos a alta velocidad. Se añade polividona reticulada a través de un tamiz de 0,75 mm. Se continúa mezclando durante otros 10 minutos a la misma velocidad. La mezcla se transfiere a un recipiente hermético.

35

Etapa 3: Compresión

La formación de comprimidos se realiza en una prensa rotativa a una humedad relativa <30 %. Los comprimidos se muestrean para el control durante el proceso del peso, la disgregación, la friabilidad, la resistencia al aplastamiento y la altura de los comprimidos.

40

Líquido para reconstitución

Se carga agua purificada en un recipiente. Se añaden parahidroxibenzoato de metilo y parahidroxibenzoato de propilo y se disuelven mientras se agita continuamente. Se añade cloruro de sodio y se disuelve durante la agitación continua hasta que la solución se vuelve homogénea. La solución a granel se filtra y se carga en frascos.

45

Ejemplo 12

5 Ejemplo de formulación: Enema (tampón de fosfato) listo para usar en dos concentraciones diferentes (100 mg y 80 mg de Adalimumab, respectivamente).

Tabla 2.

Componentes	Cantidad		Cantidad		Función
Adalimumab	100	mg	80	mg	Principio activo
Goma xantana	650	mg	650	mg	Estabilizante/Agente de suspensión
Ácido cítrico	300	mg	300	mg	Modificador del pH
Fosfato de sodio, dibásico	980	mg	980	mg	Modificador del pH
Benzoato de sodio	100	mg	100	mg	Conservante
Agua purificada	97,95	ml	100	ml	Diluyente

10 Las cantidades anteriores se refieren a una unidad. Un tamaño de lote adecuado para la fabricación es, por ejemplo, 1.000 unidades.

Fabricación de la mezcla a granel (aplicable también a otros sistemas de tampón):

15 Carga y adición de los ingredientes:

El agua purificada se carga en un recipiente de acero inoxidable adecuado equipado con un agitador/homogeneizador. Se añaden benzoato de sodio y las sales tampón y la mezcla se agita y se homogeneiza. Se añade adalimumab a la solución agitada y homogeneizada. Se añade goma xantana, se agita y se homogeneiza. La mezcla se agita, se homogeneiza y se gasea con nitrógeno.

20 Carga:

25 La suspensión se carga desde el recipiente (a través de una tolva de llenado) a frascos por medio de presión de nitrógeno, se carga hasta el peso objetivo y se cierra con una tapa. La carga y el cierre se realizan con gasificación con nitrógeno.

Ejemplo 13

30 Ejemplo de formulación: Gel listo para usar (tampón Tris) en dos concentraciones diferentes (100 mg y 80 mg de Adalimumab, respectivamente).

Tabla 3.

Componentes	Cantidad		Cantidad		Función
Adalimumab	100	mg	80	mg	Principio activo
Goma xantana	2000	mg	2000	mg	Estabilizante/Agente de suspensión
Citrato de sodio	600	mg	600	mg	Modificador del pH
Ácido cítrico	1130	mg	1130	mg	Modificador del pH
Tris	2190	mg	2190	mg	Modificador del pH
Benzoato de sodio	100	mg	100	mg	Conservante
Agua purificada	97,95	ml	100	ml	Diluyente

35 Las cantidades anteriores se refieren a una unidad. Un tamaño de lote adecuado para la fabricación es, por ejemplo, 1.000 unidades.

Fabricación de la mezcla a granel (aplicable también a otros sistemas de tampón):

40 Carga y adición de los ingredientes:

El agua purificada se carga en un recipiente de acero inoxidable adecuado equipado con un agitador/homogeneizador. Se añaden benzoato de sodio y las sales tampón y la mezcla se agita y se homogeneiza. Se añade adalimumab a la solución agitada y homogeneizada. La mezcla se agita, se homogeneiza y se gasea con nitrógeno. Se añade goma xantana, después se agita y homogeneiza hasta gelificar. La mezcla se gasea nuevamente con nitrógeno.

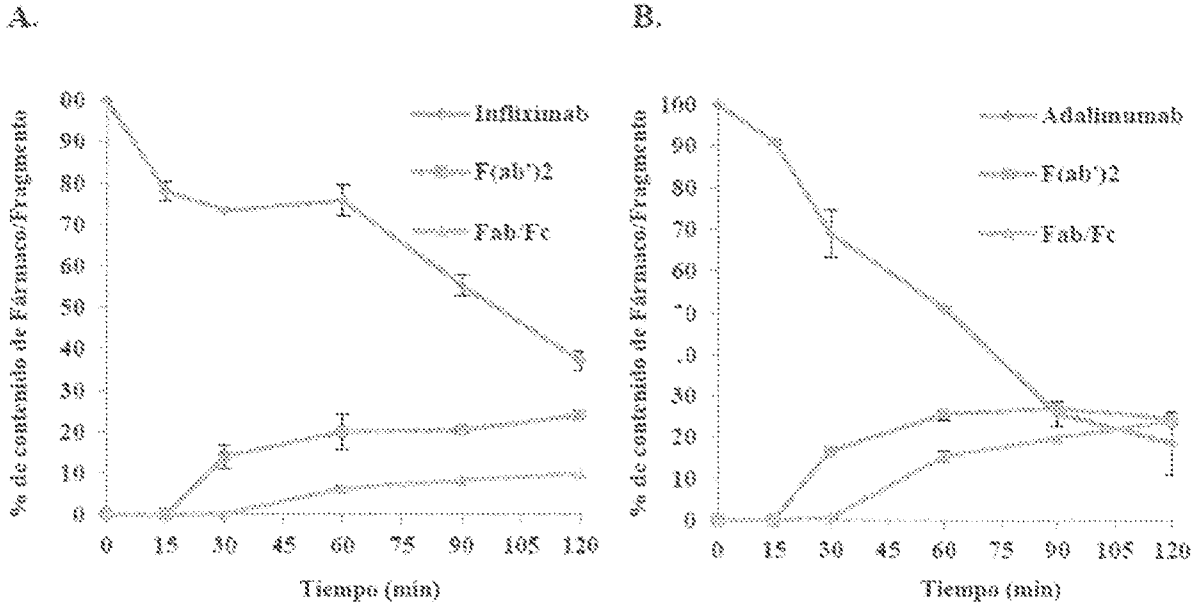
45 Carga:

50 La suspensión se carga desde el recipiente (a través de una tolva de llenado) a frascos por medio de presión de nitrógeno, se carga hasta el peso objetivo y se cierra con una tapa. La carga y el cierre se realizan con gasificación con nitrógeno.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos específicos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y fragmentos funcionales de los mismos y al menos un aditivo seleccionado de acidificantes, para su uso en el tratamiento tópico de una enfermedad inflamatoria intestinal, en donde dicho tratamiento da como resultado una disminución del pH en la luz del intestino grueso de un paciente humano, en donde la luz del intestino grueso es el interior combinado y continuo del intestino grueso y el íleon terminal del intestino delgado, en donde dicho tratamiento da como resultado un pH en la luz del intestino grueso de 5,5 a 6,5, en donde el fragmento funcional específico contra TNF α es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un scFv, un dsFv, un VHH, un díacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una proteína de fusión Fc o un minicuerpo, en donde dicha composición reduce el pH de un microambiente local del anticuerpo o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso y la disminución del pH en la luz del intestino grueso facilita la captación y/o penetración del agente activo dentro de la pared gastrointestinal.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento da como resultado un pH en la luz del intestino grueso de 5,7 a 6,3, preferentemente de 5,9 a 6,1, más preferentemente de aproximadamente 6,0.
3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende al menos un aditivo seleccionado de agentes tampón.
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el al menos un aditivo es un acidificante seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido sórbico y ácido tartárico.
5. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho paciente humano que padece una enfermedad inflamatoria intestinal, está en remisión o padece una forma leve o moderada de la enfermedad inflamatoria intestinal.
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho tratamiento proporciona además una concentración del anticuerpo anti-TNF α o fragmento funcional del mismo en la luz del intestino grueso de un paciente humano en el intervalo de 0,02 a 1 mg/ml, preferentemente de 0,2 a 0,8 mg/ml.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tratamiento comprende la administración oral de la composición.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición es una forma farmacéutica sólida en forma de un microgránulo, gránulo, micropartícula, nanopartícula, minicomprimido, cápsula o comprimido recubierto con un material de recubrimiento que evita la liberación del agente activo antes de entrar en la región ileocolónica del intestino.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el material de recubrimiento se selecciona del grupo que consiste en materiales que se disgregan de manera dependiente del pH, materiales que se disgregan de manera dependiente del tiempo, materiales que se disgregan debido a desencadenantes enzimáticos en el ambiente del intestino grueso y combinaciones de los mismos.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho tratamiento comprende la administración rectal de la composición y/o en donde la composición es un enema, un gel, una espuma o un supositorio.
11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH en la luz del intestino grueso del paciente humano antes del tratamiento es superior a 6,5.

Figura 1



C.

P. M. (kDa)

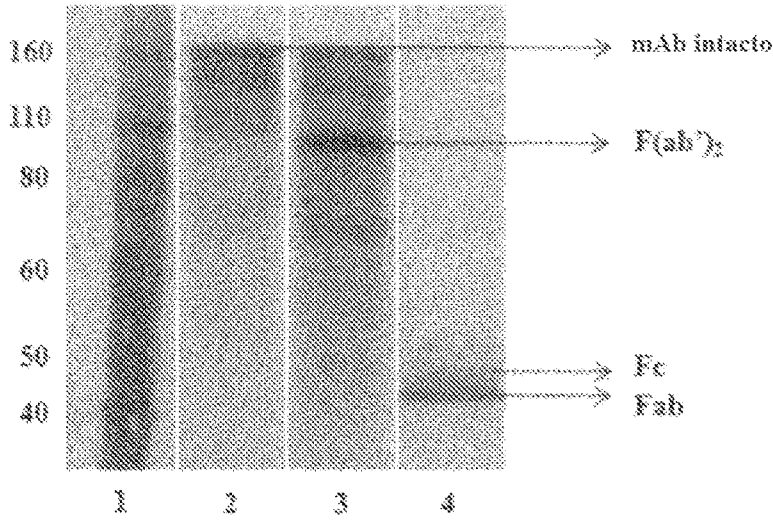


Figura 2

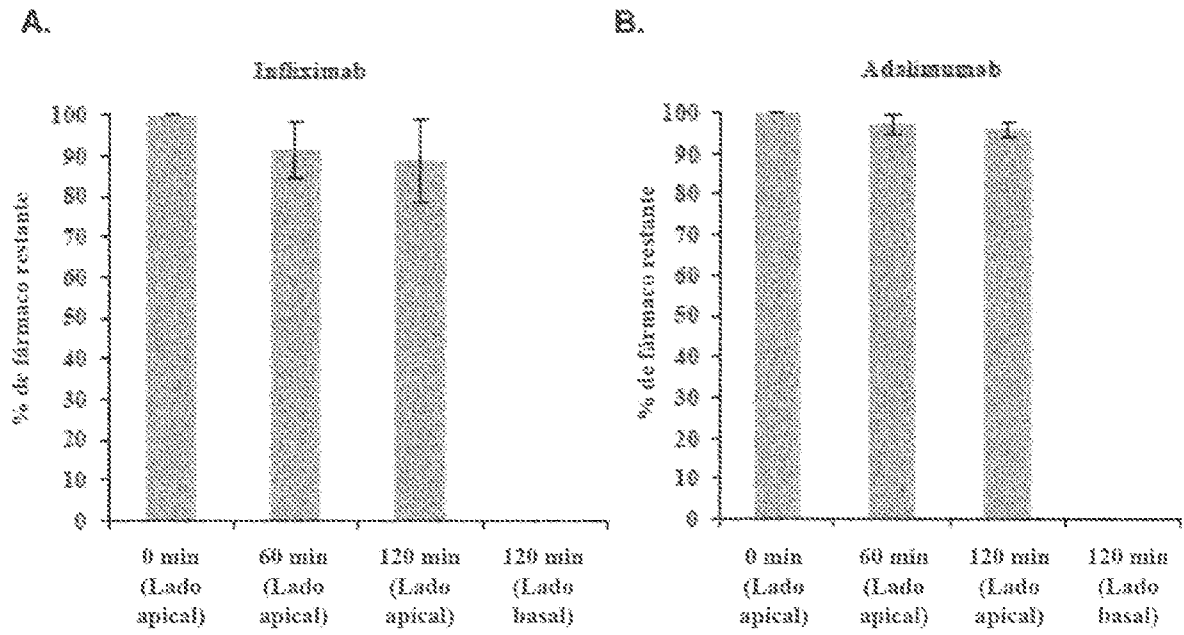
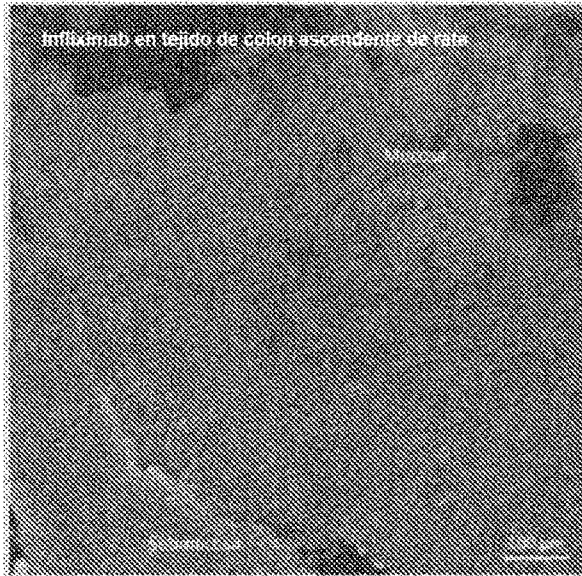
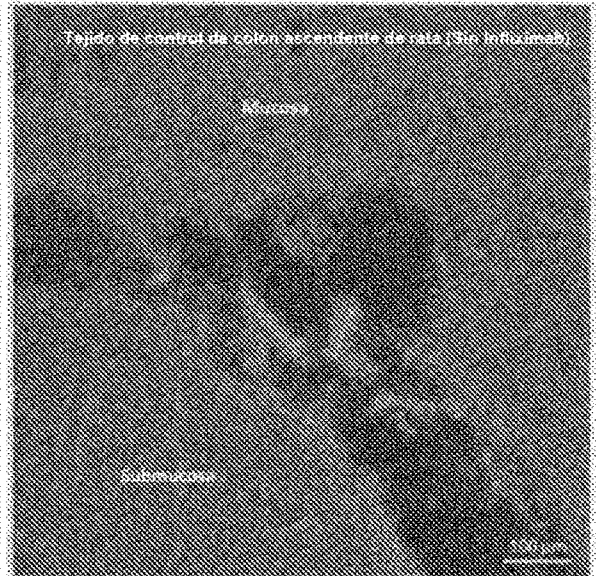


Figura 3

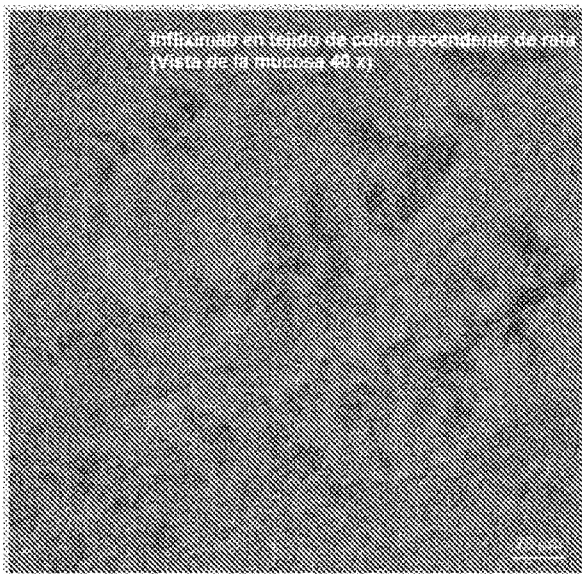
A.



B.



C.



D.

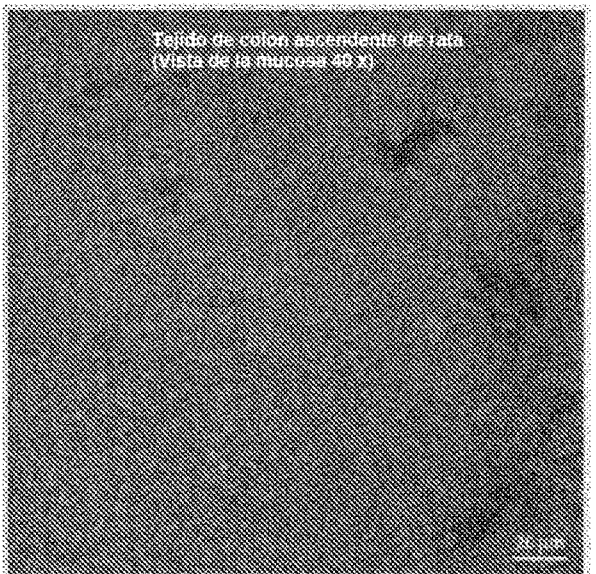


Figura 4

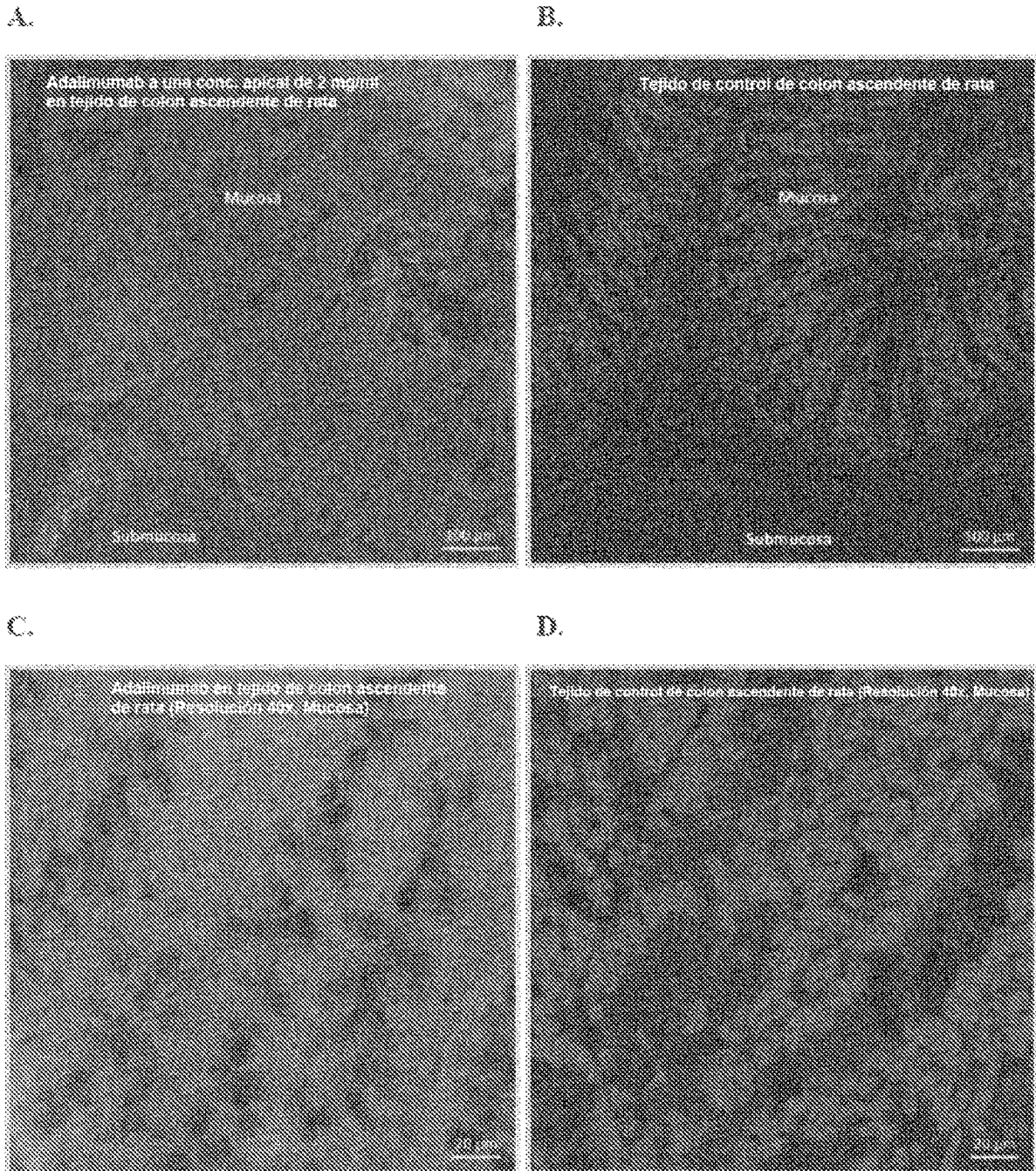


Figura 5

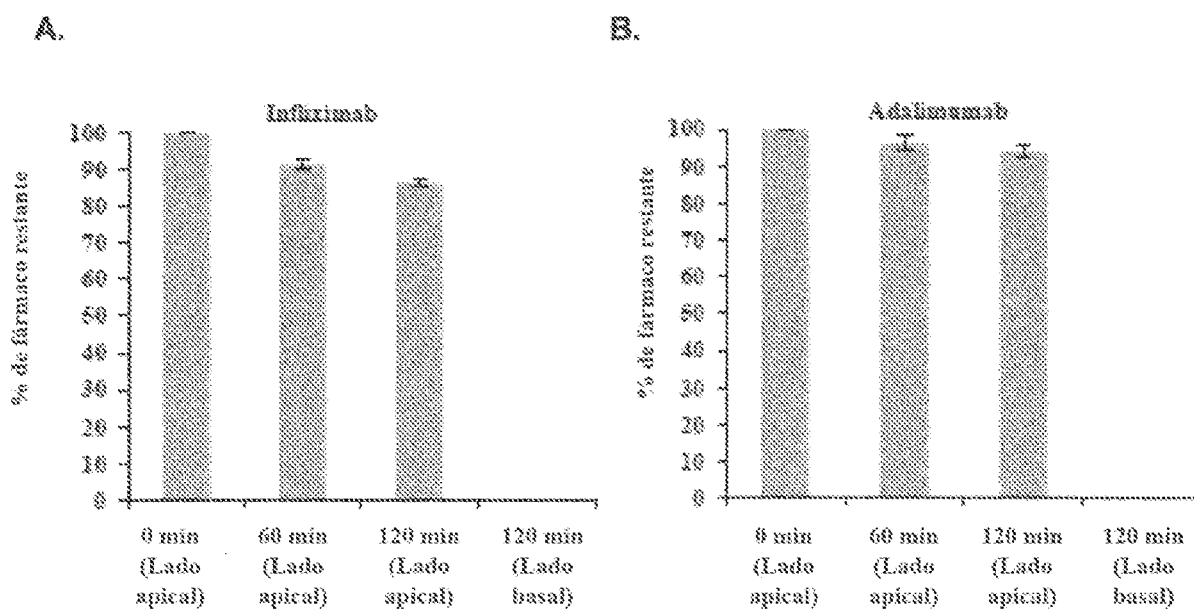
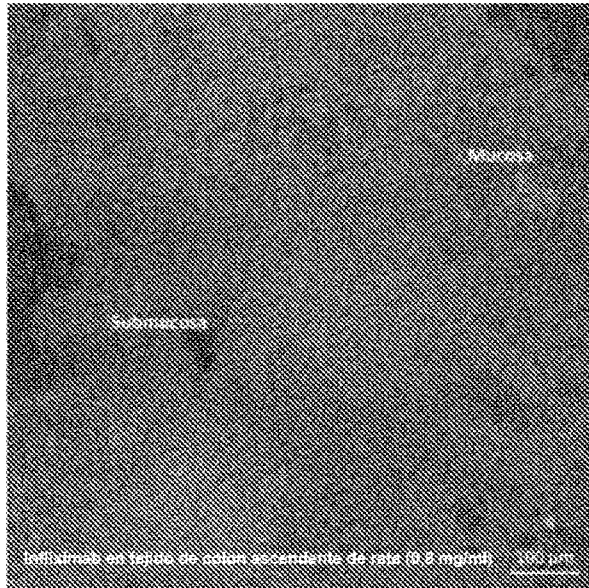
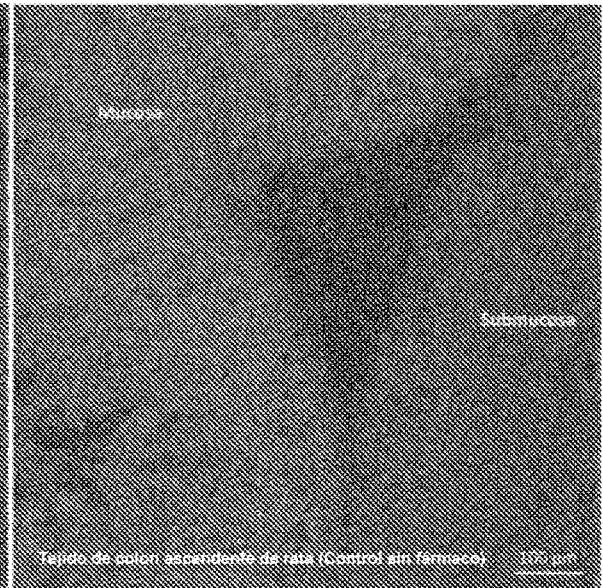


Figura 6

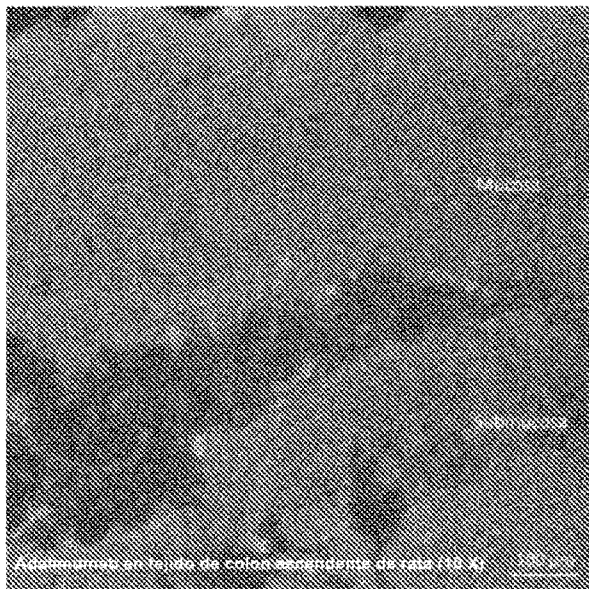
A



B



C



D

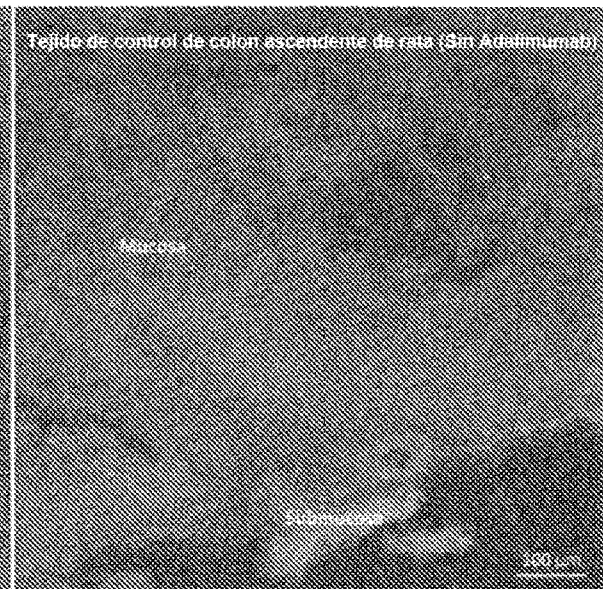


Figura 7

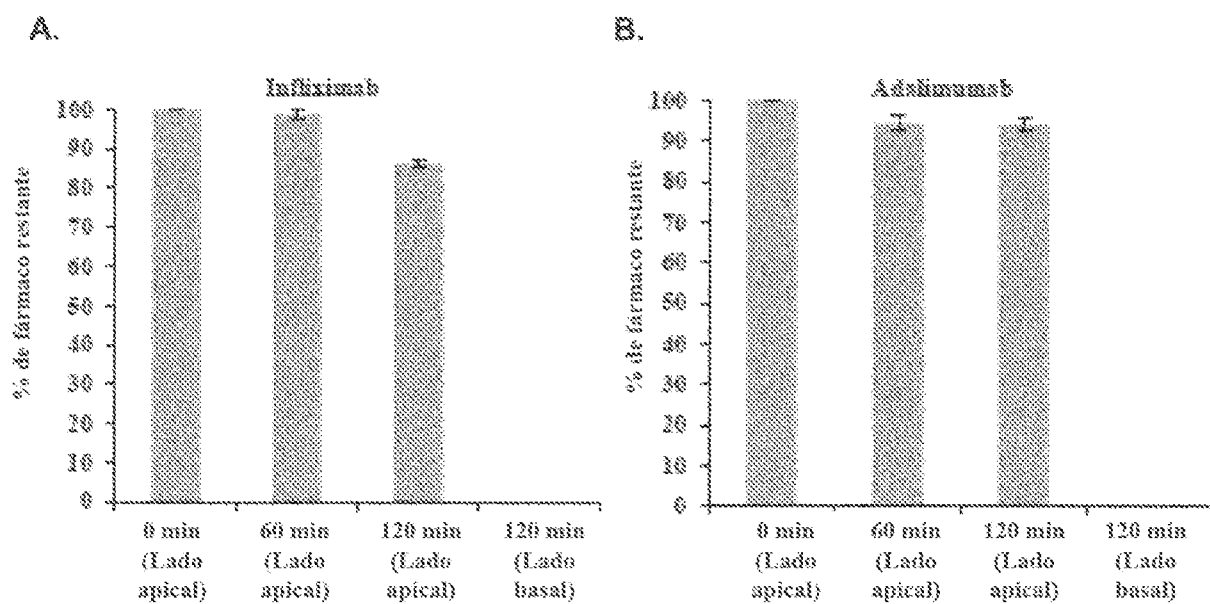
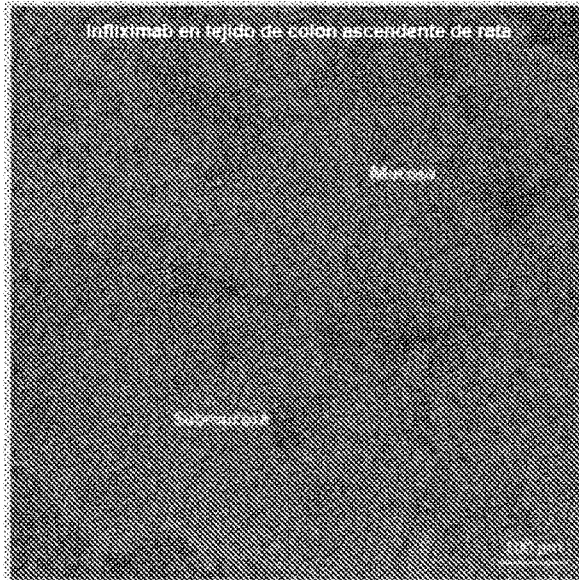
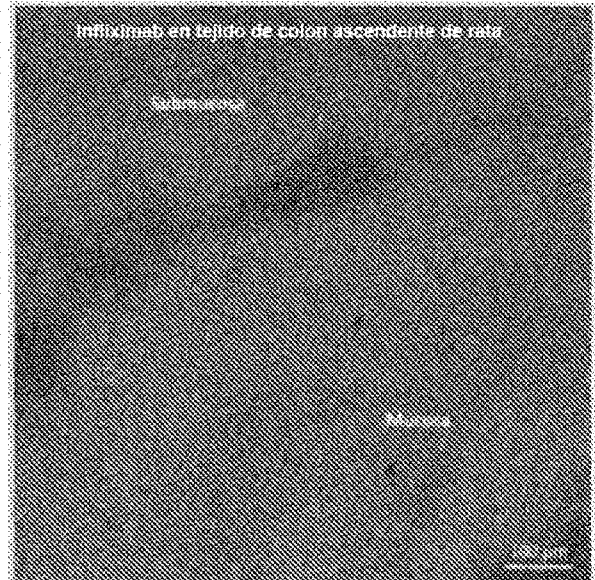


Figura 8

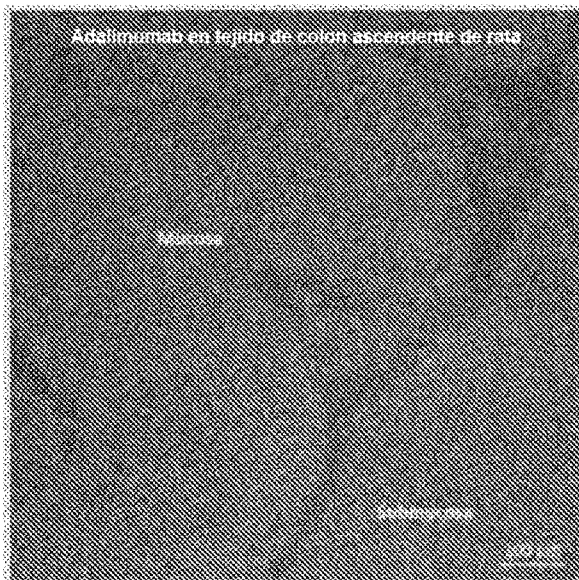
A.



B.



C.



D.

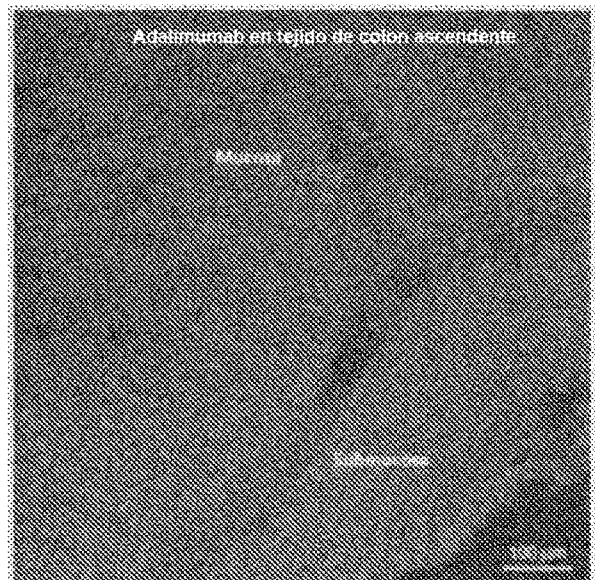


Figura 9

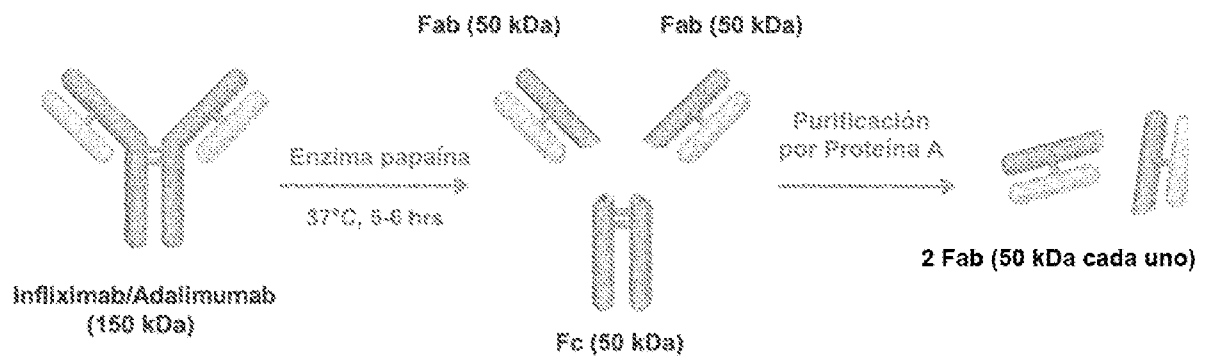
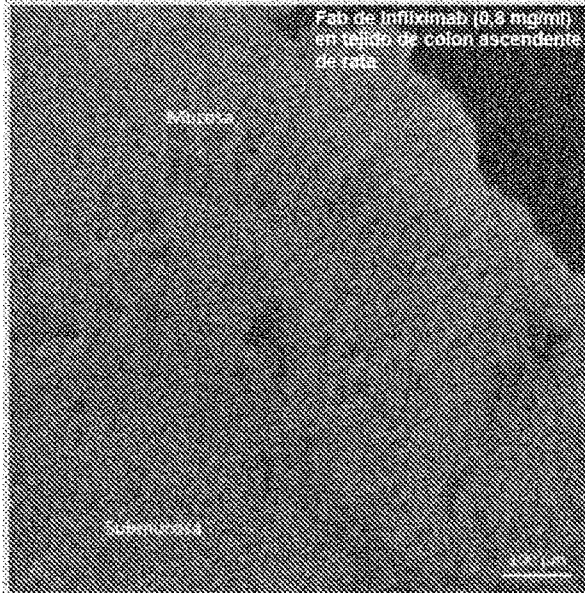


Figura 10

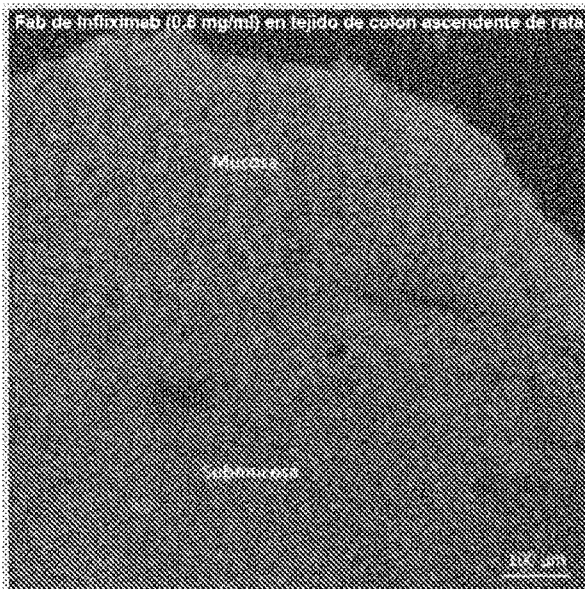
A.



B.



C.



D.

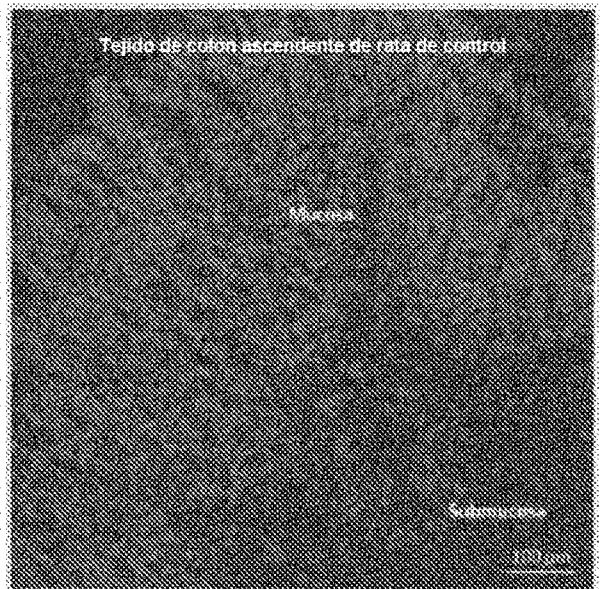
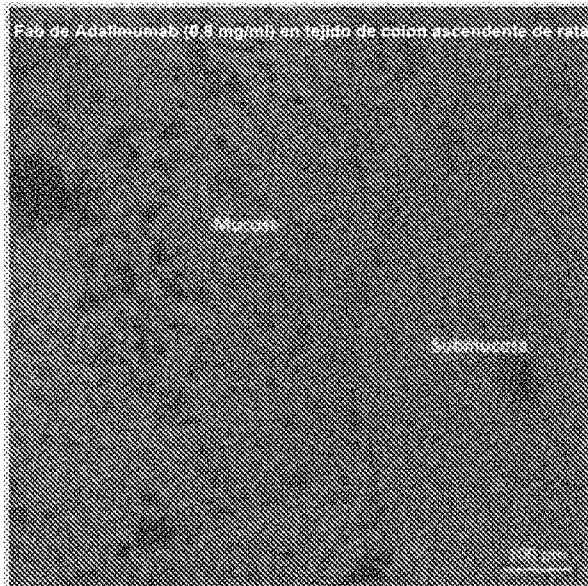
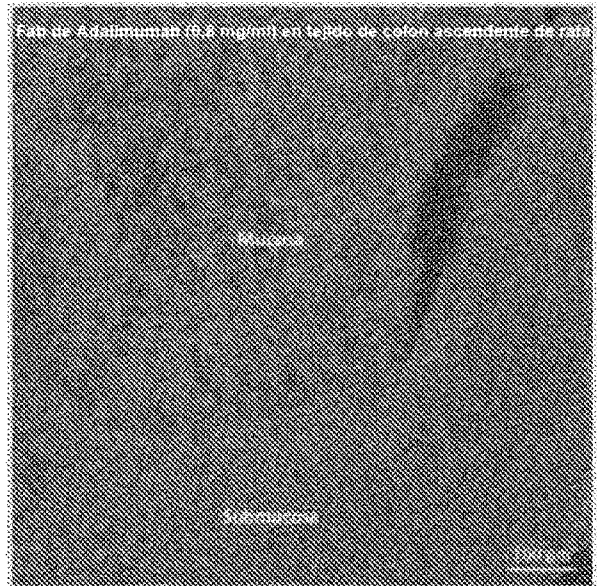


Figura 11

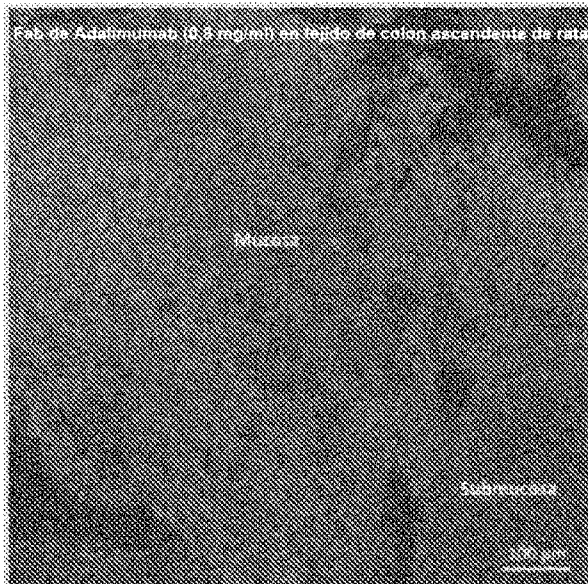
A.



B.



C.



D.

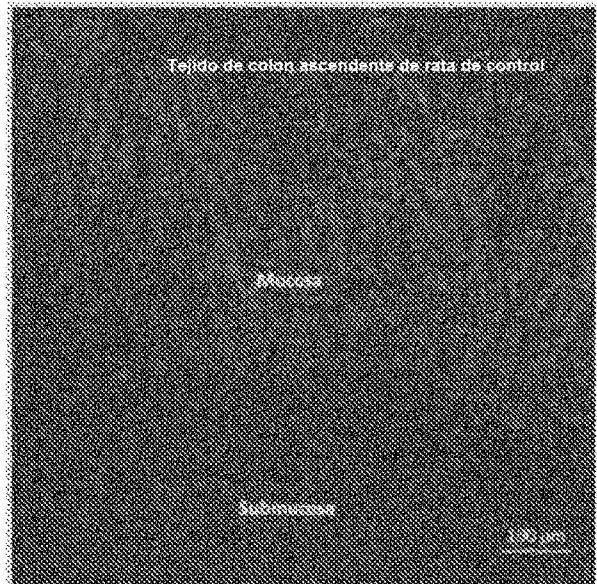


Figura 12

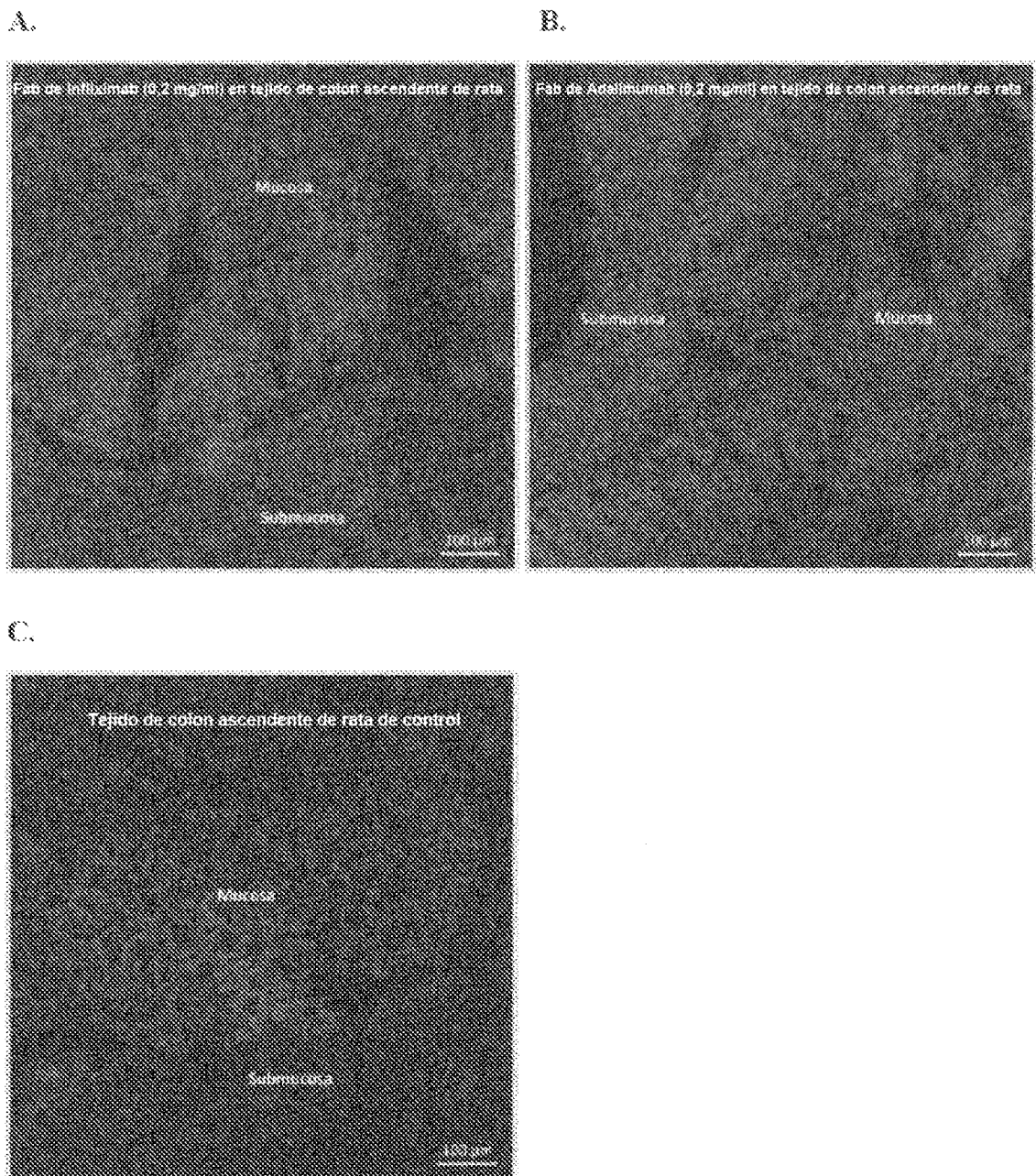


Figura 13

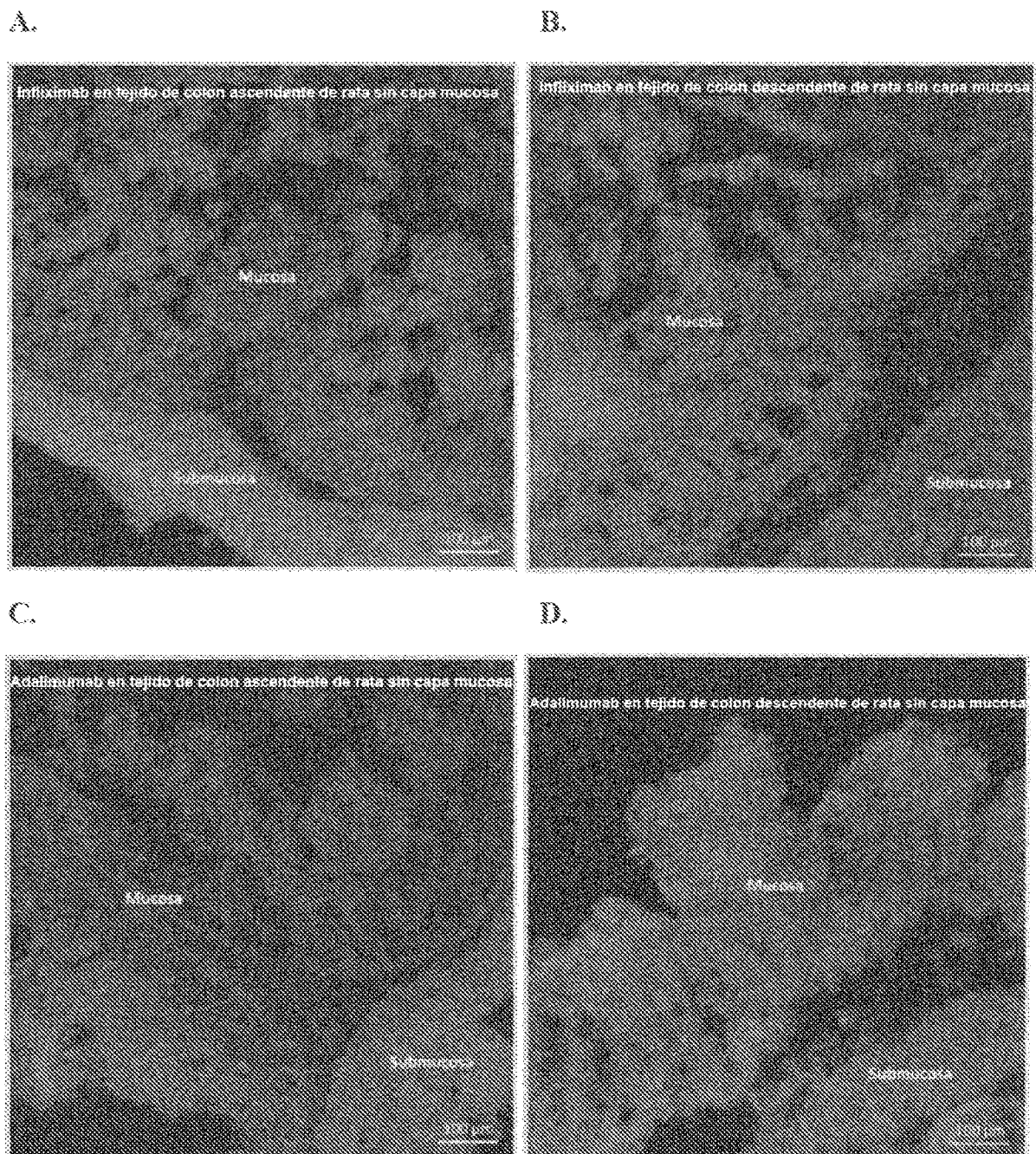
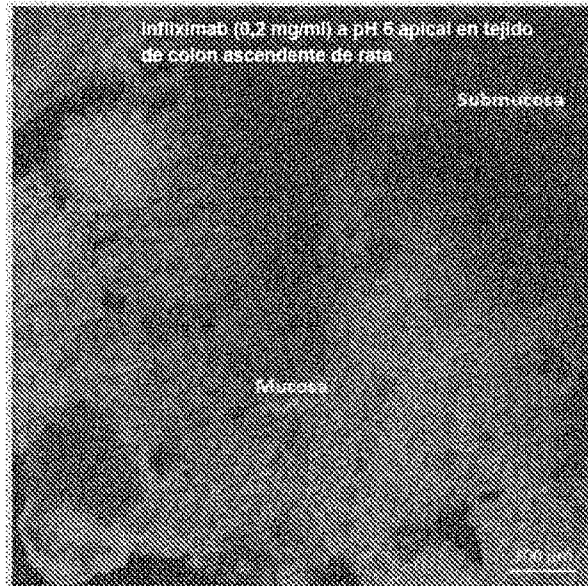
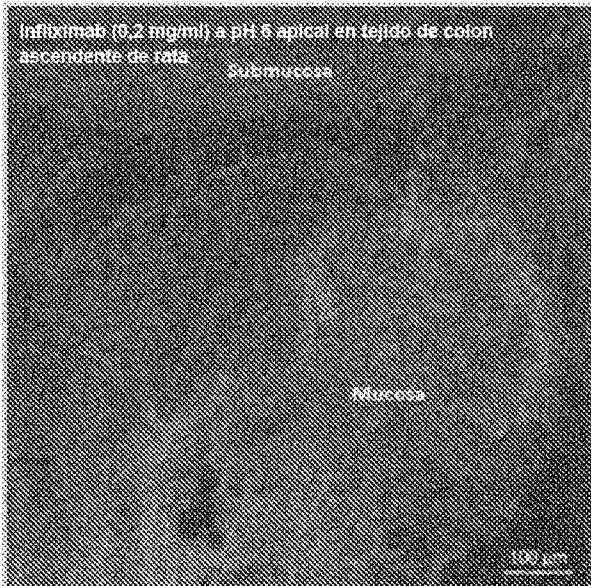


Figura 14

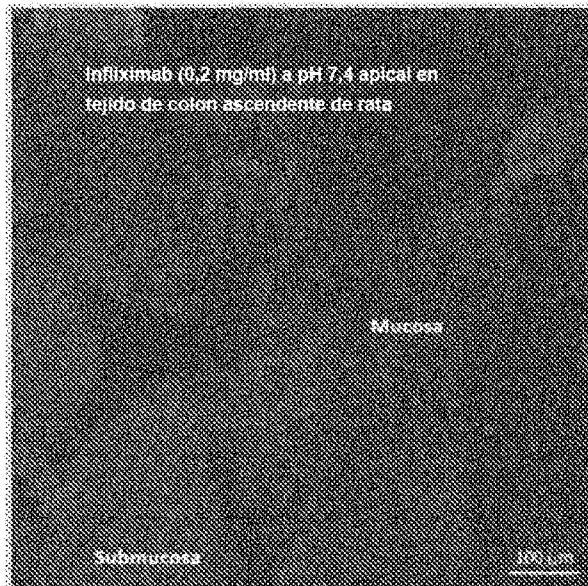
A.



B.



C.



D.

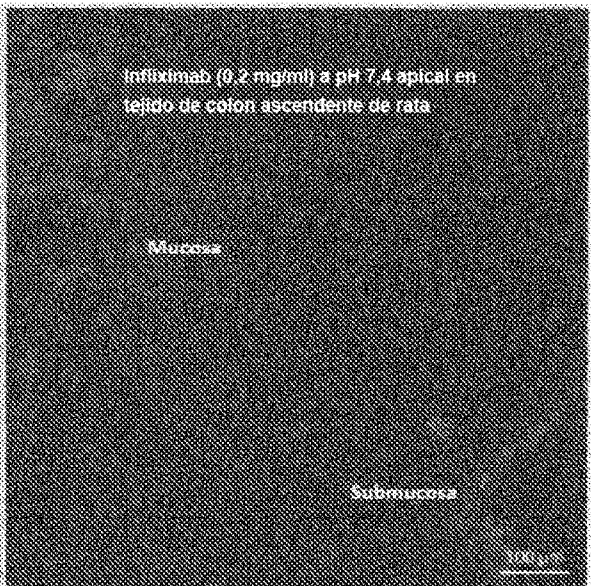


Figura 15

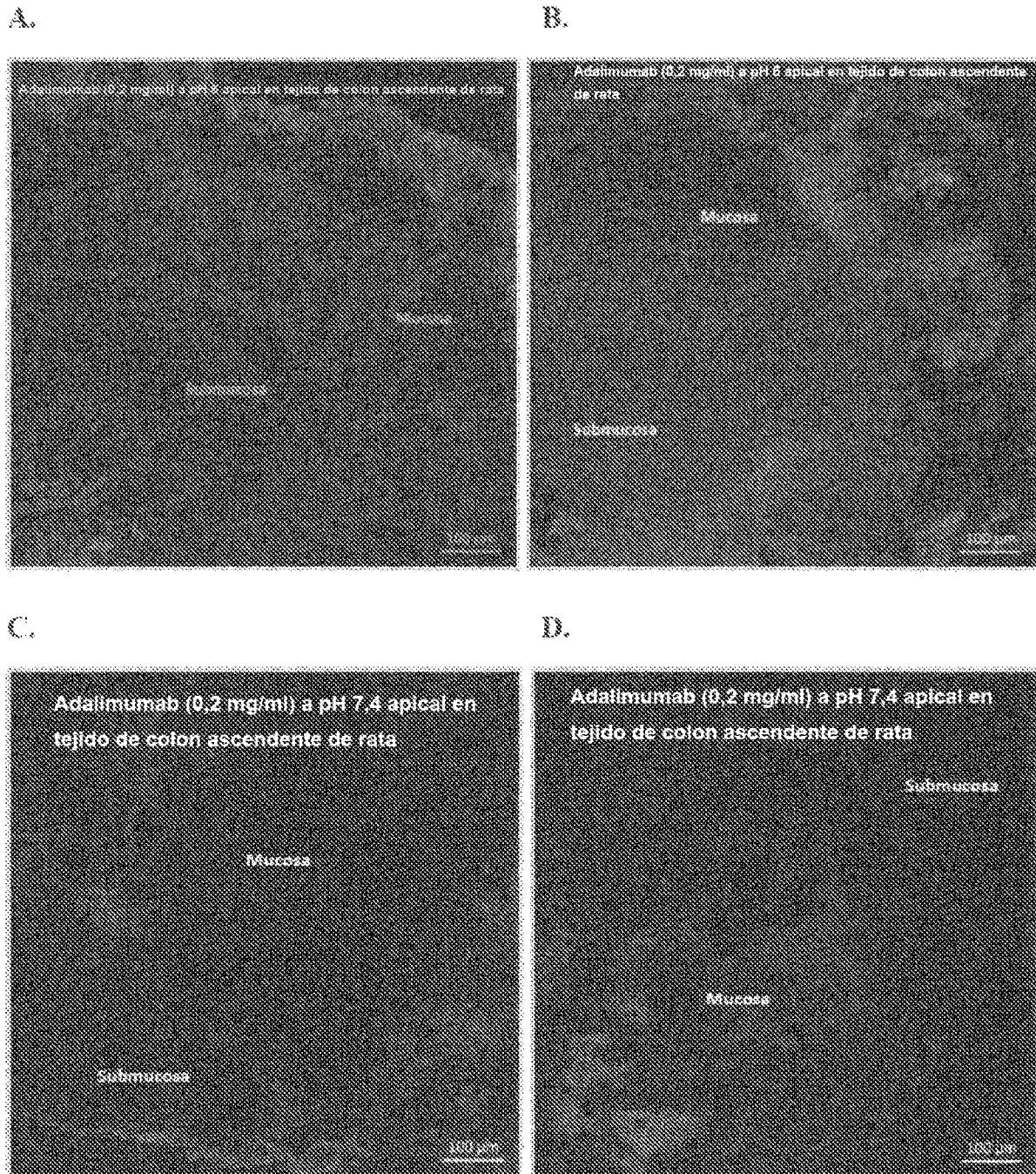
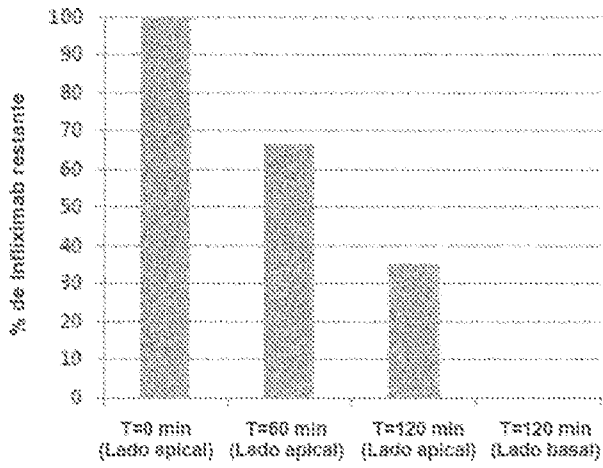


Figura 16

A.



B.

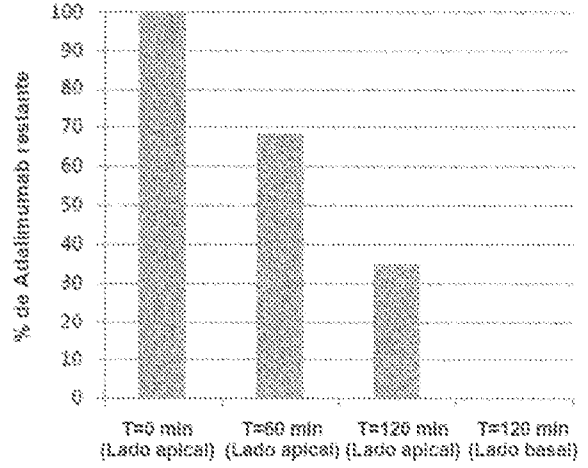


Figura 17

