

(11) Número de Publicação: **PT 1941904 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/395 (2011.01) **A61K 31/505** (2011.01)

A61P 19/02 (2011.01) **A61P 37/06** (2011.01)

A61K 38/17 (2011.01) **C07K 16/24** (2011.01)

C07K 14/705 (2011.01)

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

(22) Data de pedido: **1997.08.01**

(30) Prioridade(s): **1996.08.01 US 690775**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.05.16**
149/2012

(73) Titular(es):

**THE MATHILDA AND TERRENCE KENNEDY
INSTITUTE OF RHEUMATOLOGY TRUST
65 ASPENLEA ROAD HAMMERSMITH, LONDON
W6 8LH GB**

(72) Inventor(es):

**MARC FELDMAN GB
RAVINDER NATH MAINI GB**

(74) Mandatário:

**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI TNF E METOTREXATO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNES**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS MÉTODOS PARA TRATAR E/OU PREVENIR UMA DOENÇA MEDIADA POR TNF NUM INDIVÍDUO. TAMBÉM DESCRITA É UMA COMPOSIÇÃO QUE CONTÉM METOTREXATO E UM ANTICORPO COM FATOR NECROSE ANTITUMORAL. AS DOENÇAS MEDIADAS PELO TNF INCLUEM A ARTRITE REUMATÓIDE, A DOENÇA DE CROHN E AS DOENÇAS IMUNES AGUDAS E CRÓNICAS ASSOCIADAS AOS TRANSPLANTES.

RESUMO

"ANTICORPOS ANTI TNF E METOTREXATO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNES"

São divulgados métodos para tratar e/ou prevenir uma doença mediada por TNF num indivíduo. Também descrita é uma composição que contém metotrexato e um anticorpo com fator necrose antitumoral. As doenças mediadas pelo TNF incluem a artrite reumatóide, a doença de Crohn e as doenças imunes agudas e crónicas associadas aos transplantes.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI TNF E METOTREXATO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNES"

Antecedentes da Invenção

Os monócitos e os macrófagos segregam citocinas conhecidas como fator alfa de necrose tumoral (TNF α) e fator beta de necrose tumoral (TNF β) em resposta a endotoxinas ou a outros estímulos. O TNF α é um homotrímero solúvel com 17 kDa de subunidades de proteína (Smith *et al.*, J. Biol. Chem. 262:6951-6954 (1987)). Também existe uma forma de 26 kDa, ligada a uma membrana, precursora do TNF (Kriegler *et al.*, Cell 53:45-53 (1988)). Para artigos de revisão sobre os TNF, ver Beutler *et al.*, Nature 320: 584 (1986) Old, Science 230: 630 (1986); e Le *et al.*, Lab. Invest. 56: 234 (1987).

Células que não os monócitos ou os macrófagos podem também produzir o TNF α . As linhas de células tumorais não monocíticas humanas por exemplo, produzem o fator de necrose tumoral (TNF) (Rubin *et al.*, J. Exp. Med. 164: 1350 (1986); Spriggs *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 84: 6563 (1987)). Os linfócitos T do sangue periférico, CD4+ e CD8+, e algumas linhas de células T e B cultivadas também são exemplos (Cuturi *et al.*, J. Exp. Med. 165: 1581 (1987); Sung *et al.*, J. Exp. Med. 168: 1539 (1988); Turner *et al.*, Eur. J. Immunol. 17: 1807-1814 (1987)) também produzem TNF α .

O TNF provoca ações pró inflamatórias as quais resultam em danos dos tecidos, tal como a degradação de cartilagens e de ossos, a indução da adesão de moléculas, induzindo uma atividade de pró-coagulante nas células endotelial vasculares (Poher *et al.*, J. Immunol. 136: 1680 (1986)), aumentando a aderência de neutrófilos e linfócitos (Poher

et al., J. Immunol. 138: 3319 (1987)), e estimulando a libertação do fator que ativa as plaquetas, a partir dos macrófago, dos neutrófilos e das células endoteliais vasculares (Camussi *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1390 (1987)).

Provas recentes associam o TNF a infeções (Cerami *et al.*, Immunol. Today 9: 28 (1988)), a desordens imunitárias, a patologias neoplásicas (Oliff *et al.*, Cell 50: 555 (1987)), a patologias autoimunes e a patologias de enxerto versus hospedeiro (Piguet *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1280 (1987)). A associação do TNF ao cancro e a patologias infecciosas estão muitas vezes relacionadas com o estado catabólico do hospedeiro. Os pacientes de cancro sofrem com perda de peso, normalmente associada com a anorexia.

O extenso desgaste que é vulgarmente associado ao cancro e a outras doenças, é conhecido como "caquexia" (Kern *et al.*, J. Parent. Enter. Nutr. 12: 286-298 (1988)). A caquexia compreende uma perda de peso progressiva, a anorexia, e a erosão persistente da massa corporal como resposta a um crescimento maligno. O desequilíbrio fisiológico fundamental pode estar relacionado com uma quebra na quantidade de comida ingerida relativamente ao gasto de energia. O estado caquético é responsável pela maior parte da morbidez e da mortalidade associadas ao cancro. O TNF pode mediar a caquexia em casos de cancro, de patologia infecciosa e de outros estados catabólicos.

O TNF também desempenha um papel central na septicémia gram-negativa e no choque endotóxico (Michie *et al.*, Br. J. Surg. 76: 670-671 (1989); Debets *et al.*, Second Vienna Shock Forum, pág., 463-466 (1989); Simpson *et al.*, Crit. Care Clin. 5: 27-47 (1989)), incluindo febre, mau estar,

anorexia e caquexia. A endotoxina ativa fortemente a produção de monócitos e macrofagócitos, e a secreção de TNF e de outras citocinas (Kornbluth *et al.*, *J. Immunol.* 137: 2585-2591 (1986)). O TNF e outras citocinas derivadas dos monócitos atuam como mediadores das respostas metabólicas e neuro-hormonais à endotoxina (Michie *et al.*, *New Engl. J. Med.* 318: 1481-1486 (1988)). A administração de endotoxina a voluntários humanos dá origem a um estado de doença aguda com sintomas parecidos aos da gripe incluindo febre, taquicardia, aumento da taxa metabólica e à libertação da hormona de stress (Revhaug *et al.*, *Arch. Surg.* 123: 162-170 (1988)). O TNF circulante aumenta em pacientes que sofrem de septicémia Gram negativa (Waage *et al.* *Lancet* 1: 355-357 (1987); Hammerle *et al.*, *Second Vienna Shock Forum* pág. 715-718 (1989); Debets *et al.*, *Crit. Care Med.* 17: 489-497 (1989); Calandra *et al.*, *J. Infect. Dis.* 161: 982-987 (1990)).

Deste modo, o TNF α tem sido implicado em doenças inflamatórias, em doenças autoimunes, em infeções virais, bacterianas e parasíticas, a malignidade e/ou doenças neurodegenerativas, constituindo assim um alvo útil para terapias biológicas específicas em doenças tais como as artrite reumatóide ou a doença de Crohn. Foram já referidos os efeitos benéficos em experiências simples com um anticorpo monoclonal quimérico para o TNF α (cA2) com supressão da inflamação (Elliott *et al.*, *Arthritis Rheum.* 36: 1681-1690 (1993); Elliott *et al.*, *Lancet* 344: 1125-1127 (1994)). Ver também, Van Dullemen *et al.*, *Gastroenterology* 109: 129-135 (1995). Também foram descritos os resultados benéficos num ensaio aleatório, duplamente cego, com controlo de placebo, com cA2, com a supressão da inflamação (Elliott *et al.*, *Lancet* 344: 1105-1110 (1994)).

A WO 95/09652 divulga um método de tratamento de doenças autoimunes ou anti-inflamatórias num mamífero através do uso de uma combinação de um agente inibidor das células T CD4+ e um antagonista do fator de necrose tumoral. O agente anti-reumático metotrexato pode ser administrado juntamente com o agente inibidor das células T CD4+ e/ou com o antagonista do TNF. O antagonista do TNF pode ser, entre outros, um anticorpo anti-TNF ou um recetor de TNF solúvel. Não existe qualquer divulgação ou sugestão de uso de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral ou um recetor de TNF solúvel no tratamento de artrite reumatóide, artrite crónica juvenil ou artrite psoriática, em terapia concomitante com terapia com metotrexato.

Maini *et al.* (Kennedy Institute of Rheumatology 29th Scientific Report 1995) referem um estudo que examina a segurança e eficácia, na artrite reumatóide, de repetidas dosagens com o anticorpo cA2 monoclonal anti-TNF em combinação com, ou comparado com, o fármaco anti-reumatóide estabelecido, o metotrexato. Este relatório não divulga os resultados do estudo, nem quaisquer efeitos terapêuticos. Também não sugere que o anticorpo fator de anti-necrose tumoral seja usado em terapia concomitante com a terapia com metotrexato.

Bologna *et al.* La Presse Medicale, vol. 25, no. 19, junho 1996, abordaram as utilizações de regimes de combinação para a artrite reumatóide. É feita referência a estudos desenvolvidos utilizando diferentes combinações de DMARDs tais como azatriopina, hidroxicloroquina, metotrexato, ou salazopirina. Os autores concluem que tais combinações não foram reveladas com o intuito de proporcionar algum benefício considerável ao nível clínico, e acrescentam que

um grande número de combinações possíveis permanece ainda por estudar, como, por exemplo, na combinação de metotrexato com fármacos alvo tal como os anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-TNF α ou o recetor de TNF α solúvel. Não é sugerido o uso de anticorpos anti-TNF α em terapia concomitante à terapia com o metotrexato no tratamento da artrite reumatóide.

Fenner *et al.* *Arthritis & Rheumatism*, vol.38, nº9 (suplementar) 1995, pág. S266, Resumo 679, divulgam a monoterapia sequencial da artrite reumatóide em ensaios clínicos. Os pacientes recebem primeiramente o metotrexato que é retirado antes da administração de uma molécula de fusão recetora IgG do TNF. Em seguida é reintroduzido o metotrexato. Não é divulgada a administração de um recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou um anticorpo anti-TNF, em terapia concomitante com a terapia com metotrexato.

[0012] A WO92/16553 divulga anticorpos monoclonais para alfa TNF. É sugerido que tais anticorpos monoclonais podem se conjugados com tipos adicionais de frações terapêuticas. Não há divulgação ou sugestão da administração de um anticorpo anti-TNF ou um recetor de fator de necrose tumoral solúvel no tratamento de artrite reumatóide, artrite crónica juvenil ou artrite psoriática em terapia concomitante com a terapia de metotrexato.

A WO 96/33204 publicada a 24 de outubro de 1996 diz respeito a um método de tratamento de um indivíduo que sofre de uma doença mediada por TNF, que compreende administrar doses múltiplas de um anticorpo anti-TNF ao indivíduo. Os anticorpos anti-TNF podem ser conjugados a um agente citotóxico, incluindo a daunorubicina, a

doxorubicina, o metotrexato e a mitomicina C, para a terapia *in vivo*. As patologias relacionadas com o TNF incluem, entre outras, a artrite reumatóide. Não é divulgado o uso de um conjugado de anticorpo anti-TNF para o tratamento da artrite reumatóide, em particular, não é divulgada de um anticorpo conjugado a MTX no tratamento destas doenças específicas; e, conseqüentemente não é divulgado qualquer efeito terapêutico usando um desses conjugados hipotéticos. A WO 96/33204 não divulga o uso de um anticorpo fator de necrose anti-tumoral no tratamento da artrite reumatóide, da artrite crónica juvenil ou artrite psoriática em terapia concomitante com a terapia com metotrexato.

Moreland *et al.*, Journal of Rheumatology 1996, volume 23, suplemento 44, (páginas 78-83) reviram os resultados de ensaios clínicos que combinam o metotrexato (MTX) com um anticorpo monoclonal anti-CD4, no tratamento da artrite reumatóide (). Em particular, é feita referência aos ensaios de fase I e de fase II, nos quais é dado aos pacientes que já tinham recebido o MTX como tratamento base, um anticorpo monoclonal anti-CD4. As respostas clínicas em pacientes que estejam a receber tratamento com anti-CD4 e tratamento com MTX revelaram-se idênticas às observadas em pacientes a tomar placebo e MTX. Concluem assim os autores que um tal tratamento combinado não está associado com a eficácia. Moreland *et al* sugerem que aqueles estudos poderiam ser concebidos para o uso de combinações de DMARDs tradicionais, tais como o MTX, ou outros DMARDs, com agentes biológicos, como o anti-TNF α , ou com as proteínas de fusão recetoras de TNF solúvel, mas alertam para o facto de que tais combinações podem levantar a questão do aumento do risco associado a reações adversas

graves. Não é divulgado nem sugerido o uso de anticorpos monoclonais anti-TNF α ou de um recetor de fator de necrose tumoral solúvel em terapia adjuvante com a terapia com MTX no tratamento da AR.

Elliott (International Journal of Immunopharmacology), 1995, vol. 17 (2), páginas 141-145, é um artigo de revisão que sumariza os resultados de três ensaios clínicos utilizando o anticorpo anti-TNF cA2 como monoterapia no tratamento da artrite reumatóide. Nenhuma terapia prévia da DMARD foi estabelecida pelo menos quatro semanas antes do início do ensaio. Foi demonstrada a supressão a curto prazo da doença reumatóide. Os autores sugerem que o cA2 pode ser útil no controlo da doença enquanto é esperado o efeito da ação dos DMARDs. Não é divulgado nem sugerido o uso de anticorpos monoclonais anti-TNF α ou um recetor de fator de necrose tumoral em terapia concomitante com o MTX no tratamento da AR.

Sander et al., Arthritis & Rheumatism, Vol 38, n°9 (suppl.) 1995, página 266, Resumo 678, divulga terapia combinada de artrite reumatóide envolvendo tratamento intermitente com metotrexato e bloqueio de TNF. A terapia com a longo prazo metotrexato é interrompida por lavagem de 28 dias, e depois um agente de bloqueio de TNF é administrado durante 6 até 12 meses. Durante este período o paciente não recebe metotrexato. Finalmente, o agente de bloqueio de TNF é parado, e a terapia de metotrexato é reintroduzida. Não há qualquer divulgação do uso DE anticorpos anti-TNF ou um recetor de fator de necrose tumoral solúvel numa terapia concomitante com a terapia com MTX no tratamento de AR.

A W094/08619 relaciona-se com combinações de anticorpos CD4

e Antagonistas de TNF tais como anticorpo TNF anti-humano no tratamento de doenças autoimunes ou inflamatória, incluindo entre outras, artrite reumatóide. É sugerido que outros fármacos anti-inflamatórios tais como metotrexato ou ciclosporina A possam ser administrados em conjunto com o anticorpo anti-CD4 ou o anticorpo anti-TNF. Não foi divulgado o uso de um antagonista de TNF em conjunto com metotrexato para tratamento de artrite reumatóide, e conseqüentemente não foi divulgado qualquer efeito terapêutico usando uma tal combinação hipotética. A WO94/08619 não divulga ou sugere o uso de um anticorpo anti fator de necrose tumoral ou um recetor de fator de necrose tumoral solúvel no tratamento de artrite reumatóide, artrite crónica juvenil ou artrite psoriática na terapia concomitante com a terapia com metotrexato.

A Webster's Third New International Dictionary da English Language Unabridged, Gove Philip Babcock (Ed.) Könnemann, Cologne, 1961, define "adjunto" como "adicionado ou junto como um objeto que acompanha ou que é circunstante; adicionante ou acompanhante com uma capacidade subordinada" e terapia adjuvante como "envolvendo o uso médico de um adjunto".

O glossário Phoenix5 on-line (disponível em: http://www.phoenix5.org/glossary/adjunctive_therapy.html) define "terapia adjuvante" como "*Tratamento usado em conjunto com o tratamento primário. O seu objetivo é apoiar o tratamento primário.*"

Sumário da Invenção

A presente invenção é baseada na descoberta de que o tratamento de pacientes que sofrem de uma doença mediada

pelo TNF com um antagonista do fator de necrose tumoral, que é um anticorpo anti-fator de necrose tumoral, como uma terapia concomitante à terapia com metotrexato produz uma rápida e contínua redução dos sinais clínicos e dos sintomas da doença. A presente invenção tem também como base a inesperada e dramática descoberta de que um regime de dose múltipla de um antagonista do fator de necrose tumoral, que é um anticorpo anti-fator de necrose tumoral, quando administrado em conjunto com o metotrexato a um indivíduo que sofra de uma doença mediada pelo TNF, produz uma resposta clínica altamente benéfica ou sinérgica durante um período significativamente mais longo quando comparado ao obtido com um regime de dose única ou múltipla do antagonista administrado individualmente ou com o obtido com o metotrexato quando administrado individualmente. Como resultado da patente dos requerentes, é aqui disponibilizado um anticorpo anti-fator de necrose tumoral humano para uso no tratamento da artrite reumatóide, da artrite crónica juvenil ou da artrite psoriática em que o antagonista do fator de necrose tumoral deve ser administrado como terapia concomitante à terapia com metotrexato, e em que o antagonista da necrose tumoral é i) um anticorpo anti-fator de necrose tumoral, ou um seu fragmento, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral, ou ii) um recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou um seu fragmento, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral. Numa forma de realização particular, o metotrexato é administrado na forma de doses baixas separadas em intervalos de dias ou semanas.

Adicionalmente aos anticorpos anti-TNF, os antagonistas TNF incluem anticorpos anti-TNF e moléculas recetoras as quais

ligam especificamente a TNF.

Descrição breve das Figuras

As Figuras de 1A a 1C são um conjunto de três gráficos que apresentam os resultados em função do tempo, das contagens de articulações inchadas em pacientes com artrite reumatóide (A) que receberam tratamento com cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato. Os resultados para o grupo de placebo (apenas com o metotrexato) são apresentados com o grupo de 1 mg/kg. O número de pacientes com dados a cada uma das visitas de avaliação é apresentado no final de cada um dos gráficos. Círculo branco = - metotrexato; círculo preto = + metotrexato; quadrado = placebo.

As Figuras de 2A a 2C são um conjunto de três gráficos que apresentam os resultados em função do tempo das contagens de articulações amolecidas em pacientes com RA que estavam a receber tratamento com o cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato. Os resultados para o grupo de placebo (apenas com o metotrexato) são apresentados em conjunto com os do grupo de 1 mg/kg. O número de pacientes com dados a cada uma das visitas de avaliação é apresentado no final de cada um dos gráficos. Círculo branco = - metotrexato; círculo preto = + metotrexato; quadrado = placebo.

As Figuras de 3A a 3C são um conjunto de três gráficos que apresentam os resultados em função do tempo para a Avaliação Global do Médico do estado de Doença em pacientes com RA que estão a receber tratamento com cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato. Os resultados

para o grupo de placebo (apenas com metotrexato) são apresentados em conjunto com os do grupo de 1 mg/kg. O número de pacientes com dados a cada uma das visitas de avaliação é apresentado no final de cada um dos gráficos. Círculo branco = - metotrexato; círculo preto = + metotrexato; quadrado = placebo.

As Figuras de 4A a 4C são um conjunto de três gráficos que apresentam os resultados em função do tempo para a Avaliação do Paciente do estado de Doença em pacientes com RA que estão a receber tratamento com cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato. Os resultados para o grupo de placebo (apenas com o metotrexato) são apresentados em conjunto com os do grupo de 1 mg/kg. O número de pacientes com dados a cada uma das visitas de avaliação é apresentado no final de cada um dos gráficos. Círculo branco = - metotrexato; círculo preto = + metotrexato; quadrado = placebo.

As Figuras de 5A a 5C são um conjunto de três gráficos que apresentam os resultados em função do tempo para a concentração de proteína C-reativa (CRP) em pacientes com RA que estão a receber tratamento com cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato. Os resultados para o grupo de placebo (apenas com o metotrexato) são apresentados com os do grupo de 1 mg/kg. O número de pacientes com dados a cada uma das visitas de avaliação é apresentado no final de cada um dos gráficos. Círculo branco = - metotrexato; círculo preto = + metotrexato; quadrado = placebo.

As Figuras de 6A a 6C são um conjunto de três gráficos que apresentam os resultados em função do tempo para o

Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ) em pacientes com RA que estão a receber tratamento com cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato. Os resultados para o grupo de placebo (apenas com o metotrexato) são apresentados com os do grupo de 1 mg/kg. O número de pacientes com dados a cada uma das visitas de avaliação é apresentado no final de cada um dos gráficos. Círculo branco = - metotrexato; círculo preto = + metotrexato; quadrado = placebo.

As Figuras de 7A a 7F são um conjunto de seis gráficos que apresentam a concentração de cA2 no soro em cada um dos pacientes com RA que estavam a ser tratados com cA2 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg) com ou sem o metotrexato, traçada em função do tempo. Os dados apresentados são as concentrações de cA2 no soro, obtidas imediatamente antes da administração do cA2 nas semanas 2, 6, 10 e 14 e depois nas semanas 18 e 26. As escalas para a concentração de cA2 no soro são condensadas com a presença de doses mais altas de cA2.

As Figuras 8A e 8B são um conjunto de dois gráficos que apresentam a concentração média de cA2 no soro em função do tempo em pacientes com RA que estão a receber 3 mg/kg de cA2 (painel do topo) ou 10 mg/kg de cA2 (painel de baixo) com ou sem o metotrexato. Quadrado = + metotrexato; círculo ou triângulo = - metotrexato.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção diz respeito à descoberta de que podem ser administrados anticorpos anti-TNF a pacientes que sofram de uma doença mediada por TNF na forma de uma terapia concomitante à terapia com o metotrexato, com bom a

excelente alívio dos sinais e sintomas da doença. A presente invenção diz também respeito à descoberta de que os antagonistas de fator de necrose tumoral podem ser administrados a pacientes que sofram de uma doença mediada pelo TNF em doses múltiplas na forma de uma terapia concomitante à terapia com o metotrexato, com uma melhoria significativa na duração da resposta clínica.

Como resultado das invenções dos requerentes, é aqui disponibilizado um antagonista do fator de necrose tumoral para uso no tratamento da artrite reumatóide, artrite crônica juvenil ou artrite psoriática em que o antagonista do fator de necrose tumoral é: i) um anticorpo de fator de necrose tumoral, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral, ou ii) um recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral. O antagonista de TNF e o metotrexato podem cada um ser administrados em doses simples ou múltiplas. Os antagonistas TNF múltiplos podem ser co-administrados com metotrexato. Outros regimes terapêuticos e agentes podem ser usados em combinação com a co-administração terapêutica do antagonista de TNF e metotrexato ou outros fármacos que suprimem o sistema imunitário.

Como aqui usado, a "doença mediada por TNF" refere-se a um TNF relacionado com doenças as quais são artrite reumatóide, artrite crônica juvenil ou artrite psoriática.

Ver, por exemplo, Berkow *et al.*, Eds., Manual da Merck, 16^a edição, capítulo 11, págs. 1380-1529, Merck e Cia., Rahway, Nova Jersey, 1992.

Os termos "recorrência", "súbito aparecimento" ou "recaída" são definidos para englobar o reaparecimento de um ou mais sintomas do estado de doença. Por exemplo, no caso da artrite reumatóide, uma recorrência pode incluir o aparecimento de uma ou mais articulações inchadas, uma rigidez matinal ou articulações amolecidas.

Os benefícios da terapia de combinação com o metotrexato e com os antagonistas de TNF de acordo com a invenção reivindicada, incluem as elevadas velocidades da resposta clínica e as durações significativamente mais longas em comparação com as obtidas com cada uma das modalidades terapêuticas em separado. Adicionalmente, o metotrexato reduz significativamente as propriedades imunogênicas dos anticorpos anti-TNF, permitindo assim a administração de múltiplas dosagens de anticorpos anti-TNF com maior segurança. Os resultados aqui descritos sugerem que possa ser usado metotrexato para reduzir as propriedades imunogênicas de outros anticorpos ou proteínas.

São igualmente divulgadas nesta invenção composições que compreendem o metotrexato e um antagonista para com o TNF. As composições são úteis para tratar um indivíduo com uma patologia ou condição associada a níveis anormais de uma substância reativa para com um antagonista do TNF, mais especificamente para quantidades de TNF superiores a, ou de menos que, os níveis presentes num sujeito saudável normal e em que o referido excesso ou os níveis diminuídos ocorram, de um modo sistémico, num tipo de tecido localizado ou específico ou num local em particular do corpo. Esses tipos de tecido podem incluir, mas estão limitados a, sangue, linfa, sistema nervoso central (CNS), fígado, rim, baço, músculo cardíaco ou vasos sanguíneos, na

matéria branca ou na matéria cinzenta do cérebro ou da medula espinal, cartilagens, ligamentos, tendões, pulmões, pâncreas, ovários, testículos ou próstata. O aumento ou a diminuição das concentrações de TNF relativamente aos níveis normais também pode ser localizado em regiões específicas ou em células do corpo, tais como nas articulações, nas junções dos vasos sanguíneos dos nervos, nos ossos, em tendões ou ligamentos específicos ou em locais de infeção tais como infeções bacterianas ou virais.

Antagonistas do fator de necrose tumoral

O "antagonista do fator de necrose tumoral" diminui, bloqueia, inibe, suprime ou interfere com a atividade do TNF *in vivo* e é um anticorpo anti-TNF ou uma molécula recetora a qual se liga especificamente ao TNF. Um antagonista do TNF adequado pode também prevenir ou inibir recetor de sinalização de TNF.

Anticorpos Anti-TNF

Tal como aqui usado, um "antagonista do fator de necrose tumoral" diminui, bloqueia, inibe, suprime ou interfere com a atividade do TNF *in vivo*. Anticorpos anti-TNF úteis nos métodos e composições da presente invenção incluem anticorpos monoclonais, quiméricos, humanizados, reaparecidos e recombinantes e fragmentos destes os quais são caracterizados pela ligação de alta afinidade a TNF e baixa toxicidade (incluindo anticorpo anti-murino humano (HAMA) e/ou resposta a anticorpo anti-quimérico humano (HACA)). Mais especificamente, um anticorpo em que o componente individual, tal como a região variável, região constante e estrutura base, possui individualmente e/ou coletivamente baixa atividade imunogénica é útil para a presente invenção. Os anticorpos que podem ser usados na

invenção são caracterizados pela sua capacidade para tratar pacientes durante longos períodos com bom a excelente alívio dos sintomas e com baixa toxicidade. Baixa atividade imunogénica e/ou alta afinidade, assim como outras propriedades não definidas, podem contribuir para os resultados terapêuticos obtidos.

Um exemplo de um anticorpo monoclonal de elevada afinidade útil para os métodos e composições da presente invenção é o anticorpo monoclonal de murino (mAb) A2 e os anticorpos que irão competitivamente inibir *in vivo* a ligação ao TNF α humano do anti-TNF α de murino mAb A2 ou de um anticorpo que apresente, substancialmente, as mesmas características de ligação específicas, assim como os fragmentos e regiões dos referidos. O anticorpo monoclonal de murino A2 e os seus derivados quiméricos, tais como o cA2, são descritos na Patente US N.º 6,284,471 (pedida a 4 de fevereiro de 1994), na Patente US N.º 5,656,272 (pedida a 4 de fevereiro de 1994), na Patente US N.º 5,919,452 (pedida a 4 de fevereiro de 1994), na Patente US N.º 5,698,195 (pedida a 18 de outubro de 1994), e em Le, J. *et al.*, Publicação internacional N.º WO 92/16553 (publicada a 1 de outubro de 1992). Um segundo exemplo de um anticorpo monoclonal de elevada afinidade útil para os métodos e composições da presente invenção é o mAb 195 de murino e os anticorpos que irão competitivamente inibir *in vivo* a ligação ao TNF α humano do anti-TNF α 195 de murino ou um outro anticorpo que apresente, substancialmente, as mesmas características de ligação específicas, assim como fragmentos e regiões dos referidos. Outros anticorpos monoclonais de elevada afinidade úteis para os métodos e composições da presente invenção incluem o mAb 114 de murino e o mAb 199 de murino

e os anticorpos que irão competitivamente inibir *in vivo* a ligação ao TNF α humano do anti-TNF α mAb 114 ou mAb 199 de murino ou um anticorpo que apresenta, substancialmente, as mesmas características de ligação específicas do mAb 114 ou do mAb 199, assim como os fragmentos e as regiões dos referidos. Os anticorpos monoclonais de murino 114, 195 e 199 e o método para os produzir são descritos por Möller, A. *et al.* (*Cytokine* 2 (3): 162-169 (1990)). Podem ser encontrados métodos preferidos para determinar a especificidade do mAb e a afinidade por inibição competitiva em Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1988); Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, Nova Iorque (1992, 1993); Kozhor *et al.*, *Immunol. Today* 4: 72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nova Iorque (1987, 1992, 1993); e Muller, *Meth. Enzymol.* 92: 589-601 (1983).

Exemplos adicionais de anticorpos anti-TNF monoclonais os quais podem ser usados na presente invenção são descritos na técnica (ver, por exemplo, a Patente US N.º 5,656,272 (pedido em 11 de setembro, 1992); Rathjen *et al.*, Publicação Internacional N.º WO 91/02078 (publicada em 21 de fevereiro, 1991); Robin *et al.*, EPO Publicação de Patente 0218868 (publicada em 22 de abril, 1987); Yone *et al.*, Publicação de Patente EPO N.º 0288088 (26 de outubro, 1988); Liang, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager, *et al.*, *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly *et al.*, *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, *et al.*, *Hybridoma* 6:489-507 (1987); Hirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 95:57-62 (1987); Moller *et al.*, *Citokine* 2: 162-169

(1990).

Os anticorpos quiméricos são moléculas de imunoglobulina caracterizadas por dois ou mais segmentos ou partes derivadas de espécies animais diferentes. Geralmente, a região variável do anticorpo quimérico é derivada de um anticorpo de mamífero não humano, tal como por um mAb de murino, e a região constante da imunoglobulina é derivada de uma molécula de imunoglobulina humana. De preferência, é selecionada uma região variável com baixas propriedades imunogénicas e é combinada com uma região constante humana a qual também apresenta baixas propriedades imunogénicas, sendo que a combinação também, de preferência, apresenta baixas propriedades imunogénicas. "Baixas" propriedades imunogénicas são aqui definidas como as que elevam as respostas significativas de HACA ou HAMA em menos do que, aproximadamente, 75%, ou, de preferência, menos do que aproximadamente 50% dos pacientes tratados e/ou que eleva os baixos títulos no paciente tratado (menos do que aproximadamente 300, de preferência, menos do que aproximadamente 100, tal como medido com um ensaio imunológico enzimático de antigénio duplo) (Elliott *et al.*, *Lancet* 344: 1125-1127 (1994)).

Tal como aqui usado, o termo "anticorpo quimérico" inclui as imunoglobulinas monovalentes, divalentes ou polivalentes. Um anticorpo quimérico monovalente é um dímero (HL) formado por uma cadeia H quimérica associada através de pontes de dissulfureto a uma cadeia L quimérica. Um anticorpo quimérico divalente é um tetrâmero (H₂L₂) formado por dois dímeros de HL associados através de, pelo menos, uma ponte de dissulfureto. Um anticorpo quimérico polivalente pode também ser produzido utilizando, por

exemplo, uma região CH que se agregue (por exemplo, a partir de uma cadeia de IgM H, ou de uma cadeia μ).

Os anticorpos contêm cadeias de imunoglobulina individuais pesadas (H) e/ou leves (L). Uma cadeia H quimérica inclui uma região de ligação a antigénio derivada de uma cadeia H de um anticorpo não humano específico para o TNF, a qual está ligada a, pelo menos, uma parte de uma região C de uma cadeia H humana (CH), tal como a CH1 ou a CH2. Uma cadeia L quimérica inclui uma região de ligação a antigénio derivada de uma cadeia L de um anticorpo não humano específico para o TNF, ligada a, pelo menos, uma parte de uma região C de uma cadeia L humana (CL)

Anticorpos quiméricos e métodos para a sua produção foram já descritos na técnica (Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 81: 6851-6855 (1984); Boulianne *et al.*, Nature 312: 643-646 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi *et al.*, Pedido de Patente Europeu N.º 171496 (publicado a 19 de fevereiro de 1985); Morrison *et al.*, Pedido de Patente Europeu N.º 173494 (publicado a 5 de março de 1986); Neuberger *et al.*, Pedido PCT N.º WO 86/01533, (publicado a 13 de março de 1986); Kudo *et al.*, Pedido de Patente Europeu N.º 184187 (publicado a 11 de junho de 1986); Morrison *et al.*, Pedido de Patente Europeu N.º 173494 (publicado a 5 de março de 1986); Sahagan *et al.*, J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson *et al.*, Publicação Internacional N.º PCT/US86/02269 (publicada a 7 de maio de 1987); Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 84: 3439-3443 (1987); Sun *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 84: 214-218 (1987); Better *et al.*, Science 240: 1041-1043 (1988); e Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, 1988).

O anticorpo quimérico anti-TNF pode incluir, por exemplo, duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, cada uma das cadeias compreendendo, pelo menos, parte de uma região constante humana e, pelo menos, parte de uma região variável (V) de origem não humana a qual apresenta uma especificidade para o TNF humano, ligando-se o referido anticorpo, com elevada afinidade, a um determinante antigénico inibidor e/ou neutralizador do TNF humano, tal como o anticorpo cA2. O anticorpo também inclui um fragmento ou um derivado do referido anticorpo, tal como uma ou mais partes da cadeia do anticorpo, tal como as regiões constantes ou variáveis da cadeia pesada, ou as regiões constantes ou variáveis da cadeia leve.

O humanizar e renovar a superfície do anticorpo pode reduzir ainda mais as propriedades imunogénicas do anticorpo. Ver, por exemplo, Winter (Patente US. N.º 5 225 539 e EP 239,400 B1), Padlan *et al.* (EP 519 596 A1) e Pedersen *et al.* (EP 592 106 A1).

Os anticorpos preferidos que são úteis nos métodos e nas composições da presente invenção são os anticorpos anti-TNF quiméricos humano-murino, e fragmentos ou regiões destes, que têm atividade inibidora ou neutralizante *in vivo* contra TNF α humano. Tais anticorpos e anticorpos quiméricos podem incluir aqueles gerados por imunização usando TNF α recombinante purificado ou fragmentos de péptido destes compreendendo um ou mais determinantes antigénicos.

Um exemplo de um tal anticorpo quimérico cA2 e de anticorpos os quais irão competitivamente inibir *in vivo* a ligação ao TNF α humano do mAb A2 de murino anti-TNF α , do

cA2 mAb quimérico, ou a um anticorpo que apresente, substancialmente, as mesmas características de ligação específicas, assim como a fragmentos e regiões dos referidos. O cA2 mAb quimérico foi descrito, por exemplo, na Patente US N.º 6,284,471 (pedida em 4 de fevereiro de 1994), Patente US N.º 5,656,272 (pedida em 4 de fevereiro de 1994), Patente US N.º 5,919,452 (pedida em 4 de fevereiro de 1994), e Patente US N.º 5,698,195 (pedida em 18 de outubro de 1994), e por Le, J. *et al.* (Publicação Internacional N.º WO 92/16553 (publicada a 1 de outubro de 1992)); Knight, D.M. *et al.* (Mol. Immunol. 30: 1443-1453 (1993)); e Siegel, S.A. *et al.* (Cytokine 7(1): 15-25 (1995)).

O anti-TNF A2 quimérico é constituído pela região variável que se liga ao antigénio do anticorpo IgG1 TNF anti-humano de rato neutralizador com elevada afinidade, designado por A2, e pelas regiões constantes de um IgG1 humano, a imunoglobulina kappa. A região Fc IgG1 humana melhora a função efetora do anticorpo alogénico, aumenta o tempo de meia-vida do soro circulante e diminui as propriedades imunogénicas do anticorpo. A avidéz e a especificidade como determinante antigénico do A2 quimérico são derivadas da região variável de murino A2. O A2 quimérico neutraliza o efeito citotóxico tanto do TNF humano natural como do recombinante, de um modo dependente da dose. Dos ensaios de ligação do cA2 e do TNF humano recombinante, a constante de afinidade do cA2 foi calculada como sendo $1,8 \times 10^9 M^{-1}$. Os métodos preferidos para determinar a especificidade e a afinidade do mAb por inibição competitiva podem ser encontrados em Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1988; Colligan *et al.*, eds., *Current*

Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, Nova Iorque, (1992, 1993); Kozbor *et al.*, Immunol. Today 4: 72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nova Iorque (1987, 1992, 1993); e Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983).

Tal como aqui usado, o termo "região que se liga ao antigénio" diz respeito àquela parte de uma molécula de anticorpo a qual contém os resíduos de aminoácido que interagem com um antigénio e que conferem ao anticorpo a sua especificidade e afinidade para o antigénio. A região do anticorpo inclui os resíduos de aminoácido da "estrutura base" necessários para manter a conformação adequada dos resíduos que se ligam ao antigénio. Geralmente, a região que se liga ao antigénio é de origem de murino. Noutras formas de realização, a região que se liga ao antigénio pode ser derivada de outras espécies animais, tais como de ovelha, de coelho, de rato ou de hamster. As fontes preferidas para o DNA que codifica os referidos anticorpos não humano incluem as linhas de células que produzem anticorpos, de preferência linhas de células híbridas vulgarmente conhecidas como hibridomas. Numa das formas de realização, um hibridoma preferido é a linha de células de hibridoma A2.

Um "antigénio" é uma molécula ou uma parte de uma molécula capaz de ser ligado a um anticorpo e que é adicionalmente capaz de induzir um animal a produzir anticorpo capaz de se ligar seletivamente a um determinante antigénico daquele antigénio. Um antigénio pode apresentar um ou mais determinantes antigénicos.

O termo "determinante antigénico" diz respeito àquela porção do antígeno que é capaz de ser reconhecida por e de se ligar a um anticorpo numa, ou mais, das regiões de ligação ao antígeno. Os determinantes antigénicos consistem normalmente em grupos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares e apresentam três características estruturais dimensionais específicas assim como características de carga específicas. Pela expressão "inibindo e/ou neutralizando o determinante antigénico" pretende-se um determinante antigénico, o qual, quando ligado a um anticorpo, resulta numa perda de atividade biológica da molécula que contém o determinante antigénico, *in vivo* ou *in vitro*, mais preferivelmente *in vivo*, incluindo a ligação do TNF a um recetor de TNF. Foram identificados determinantes antigénicos do TNF dentro dos aminoácidos de 1 a cerca de 20, de cerca de 56 a cerca de 77, de cerca de 108 a cerca de 127 e de cerca de 138 a cerca de 149. De preferência, o anticorpo liga-se a um determinante antigénico que compreende, pelo menos, cerca de 5 aminoácidos do TNF dentro dos resíduos de TNF de cerca de 87 a cerca de 107, de cerca de 59 a cerca de 80 ou de uma combinação dos referidos. Normalmente, os determinantes antigénicos incluem, pelo menos, cerca de 5 aminoácidos e menos do que cerca de 22 aminoácidos que abraçam ou se sobrepõem a uma ou mais destas regiões.

Como exemplo, os determinantes antigénicos de TNF os quais são reconhecidos por, e/ou se ligam com uma atividade anti-TNF, um anticorpo, e fragmentos, e regiões variáveis do mesmo, incluem:

59-80: Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-

Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-
Thr-Ile (SEQ ID N.º 1); e/ou

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

Os anticorpos anti-TNF, e os seus fragmentos e regiões variáveis, os quais são reconhecidos por, e/ou se ligam com atividade anti-TNF, estes determinantes antigénicos bloqueiam a ação do TNF α sem se ligarem ao local de ligação do recetor putativo tal como é apresentado por Eck e Sprang (J. Biol. Chem. 264 (29): 17595-17605 (1989) (aminoácidos de 11 a 13, de 37 a 42, de 49 a 57 e de 155 a 157 do hTNF α). Rathjen *et al.*, Publicação Internacional N.º WO 91/02078 (publicada a 21 de fevereiro de 1991), aqui incorporada por referência, divulga ligandos de TNF os quais se podem ligar a determinantes antigénicos de TNF adicionais.

Produção de Anticorpos Usando Híbridomas

As técnicas para obter anticorpos com pequenas sequências de péptidos que reconhecem e se ligam a essas sequências na forma conjugada ou livre ou quando são apresentadas como uma sequência nativa no contexto de uma grande proteína, são bem conhecidas na técnica. Os referidos anticorpos podem ser produzidos por técnicas de híbridoma ou recombinantes conhecidas na técnica.

Anticorpos de Murino, os quais podem ser usados na preparação dos anticorpos úteis nos métodos e composições da presente invenção, foram também descritos em Rubin *et al.*, EP 0218868 (publicada a 22 de abril de 1987); Yone *et*

al., EP 0288088 (publicada a 26 de outubro de 1988); Liang, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137: 647-854 (1986); Meager, *et al.*, *Hybridoma* 6: 305-311 (1987); Fendly *et al.*, *Hybridoma* 6: 359-369 (1987); Bringman, *et al.*, *Hybridoma* 6: 489-507 (1987); Hirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96: 57-62 (1987); Möller, *et al.*, *Cytokine* 2: 162-169 (1990).

As fusões das células são realizadas por procedimentos padrão bem conhecidos para quem tenha conhecimentos no campo da imunologia. As linhas de células, parceiras de fusão, e os métodos para fundir e selecionar os hibridomas e encontrar os mAbs são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Ausubel *infra*, Harlow *infra* e Colligan *infra*.

O mAb de murino específico para o TNF α útil nos métodos e composições da presente invenção, pode ser produzido em grandes quantidades injetando as células de hibridoma ou de transfectoma que segregam o anticorpo para a cavidade peritoneal dos ratos e, depois de um tempo adequado, recolher os fluidos de ascites os quais contêm uma alta concentração de mAb, e isolando o mAb a partir daí. Para conseguir a referida produção *in vivo* do mAb com um hibridoma (por exemplo, de rato ou humano), as células de hibridoma são, de preferência cultivadas em ratos sem pelo irradiados ou atímicos. Alternativamente, os anticorpos podem ser produzidos cultivando as células de hibridoma ou de transfectoma *in vitro* e isolando o mAb segregado do meio de cultura das células ou recombinantemente, em células eucariotas ou procariotas.

Numa das formas de realização, o anticorpo usado nos métodos e nas composições da presente invenção é um mAb o qual se liga a aminoácidos de um determinante antigénico do

TNF reconhecido pelo A2, rA2 ou cA2, produzido por um hospedeiro de hibridoma ou recombinante. Numa outra forma de realização, o anticorpo é um anticorpo quimérico o qual reconhece um determinante antigénico reconhecido pelo A2. Ainda em outra forma de realização, o anticorpo é um anticorpo quimérico designado por A2 quimérico (cA2).

Como exemplos de anticorpos úteis nos métodos e nas composições da presente invenção, o A2 mAb de murino é produzido por uma linha de células designada como c134A. O anticorpo cA2 quimérico é produzido por uma linha de células designada como c168A. A c168A foi depositada na Coleção de Culturas Tipo Americana, Rockville, Maryland, como um "Depósito de Salvaguarda de Culturas."

Os "derivados" dos anticorpos, incluindo os fragmentos, as regiões ou as proteínas codificadas pelos genes truncados ou modificados de modo a dar origem a espécies moleculares que se assemelham funcionalmente aos fragmentos de imunoglobulina, também são úteis nos métodos e composições da presente invenção. As modificações incluem, mas não estão limitadas à adição de sequências genéticas que codificam para proteínas citotóxicas tais como as toxinas *vegetais* e *bacterianas*. Os fragmentos e os derivados podem ser produzidos a partir de células apropriadas, tal como é conhecido na técnica. Alternativamente, os anticorpos anti-TNF, os fragmentos e as regiões podem estar ligados a proteínas citotóxicas ou a compostos *in vitro*, de modo a disponibilizar anticorpos anti-TNF citotóxicos os quais irão seletivamente matar as células que têm TNF na sua superfície.

Os "fragmentos" dos anticorpos incluem, por exemplo, Fab,

Fab', F(ab')₂ e Fv. Estes fragmentos não apresentam o fragmento Fc do anticorpo intacto, saem mais depressa da circulação, e podem ter menos ligação não específica a tecidos do que um anticorpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Estes fragmentos são produzidos a partir de anticorpos intactos utilizando métodos bem conhecidos na técnica por, por exemplo, divisão proteolítica com enzimas tal como a papaína (de modo a produzir o fragmento Fab) ou a pepsina (para produzir os fragmentos F(ab')₂).

Expressão Recombinante dos Anticorpos Anti-TNF

Podem ser produzidos anticorpos recombinantes e/ou quiméricos murino-humano ou humano-humano que inibem o TNF, utilizando técnicas já conhecidas com base nos conhecimentos descritos na Patente US N.º 6,284,471 (pedida em 4 de Fevereiro de 1994), Patente US N.º 5,656,272 (pedida em 4 de Fevereiro de 1994), Patente US N.º 5,919,452 (pedida em 4 de Fevereiro de 1994), Patente US N.º 5,698,195 (pedida em 18 de Outubro de 1994) e Le, J. *et al.*, Publicação internacional N.º WO 92/16553, (publicada a 1 de Outubro de 1992), cujas referências são aqui incorporadas como referência. Ver, por exemplo, Ausutel *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nova Iorque (1987, 1992, 1993); e Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque (1989). Ver também, por exemplo, Knight, D.M., *et al.*, Mol. Immunol. 30: 1443-1453 (1993); e Siegel, S.A., *et al.*, Cytokine 7 (1): 15-25 (1995).

O DNA que codifica um anticorpo anti-TNF pode ser DNA genómico ou cDNA o qual codifica pelo menos uma das cadeias

pesadas da região constante (Hc), a cadeia pesada da região variável (Hv), a cadeia leve da região variável (Lv) e a cadeia leve da região constante (Lc). Uma alternativa conveniente à utilização de fragmentos de gene de cromossomas como a fonte de DNA que codifica o segmento que se liga ao antigénio da região V de murino, é o uso de cDNA para a construção de genes de imunoglobulina quimérica tal como, por exemplo, referido por Liu *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci., E.U.A.A. 84: 3439 (1987) e J. Immunology 139: 3521 (1987)). O uso de cDNA requer que os elementos adequados para a expressão do gene para a célula hospedeira sejam combinados com o gene de modo a alcançar a síntese da proteína desejada. O uso de sequências de cDNA é vantajoso relativamente às sequências genómicas (as quais contêm intrões), pois as sequências de cDNA podem ser expressas em bactérias ou noutros hospedeiros aos quais faltem os sistemas de corte de RNA apropriados. Um exemplo de uma preparação feita como referido é apresentado em baixo.

Porque o código genético se encontra degenerado, pode ser usado mais de um codão para codificar um aminoácido em particular. Usando o código genético, podem ser identificados um ou mais oligonucleótidos diferentes, cada um dos quais seria capaz de codificar o aminoácido. A probabilidade que um oligonucleótido particular poder, de facto, constituir a sequência de codificação XXX pode ser estimada considerando as relações de formação de pares anormais de bases e a frequência com a qual cada um dos codões em particular é realmente usado (para codificar um determinado aminoácido) em células eucariotas ou procariotas expressando um anticorpo ou fragmento anti-TNF. As referidas "regras de utilização de codões" são descritas por Lathe, *et al.*, J. Mol. Biol. 183: 1-12 (1985).

Utilizando as "regras de utilização de códões" de Lathe, é identificado um único oligonucleótido, ou um conjunto de oligonucleótidos, que contém uma sequência teórica "mais provável" capaz de codificar as sequências das regiões constantes ou variáveis anti-TNF.

Embora ocasionalmente uma sequência de aminoácidos possa apenas ser codificada por um único oligonucleótido, frequentemente a sequência de aminoácidos pode ser codificada por qualquer conjunto de oligonucleótidos semelhantes. De salientar que, embora todos os membros deste conjunto contenham oligonucleótidos os quais são capazes de codificar o fragmento de péptido e, deste modo, conter potencialmente a mesma sequência de oligonucleótidos que o gene o qual codifica o fragmento de péptido, apenas um membro deste conjunto contém a sequência de nucleótidos que é idêntica à sequência de nucleótidos do gene. Dado que este membro está presente dentro do conjunto, e é capaz de se hibridar ao DNA mesmo na presença dos outros membros deste conjunto, é possível utilizar o conjunto não fracionado de oligonucleótidos da mesma maneira que se utilizaria um único oligonucleótido para clonar o gene que codifica a proteína.

O oligonucleótido, ou o conjunto de oligonucleótidos, contendo a sequência "a mais provável" teórica, capaz de codificar um anticorpo ou um fragmento anti-TNF, incluindo uma região variável ou constante, é usada para identificar a sequência de um oligonucleótido complementar ou de um conjunto de oligonucleótidos o qual é capaz de se hibridar na sequência, ou conjunto de sequências, "as mais prováveis". Um oligonucleótido que contenha uma sequência complementar como a referida, pode ser usado como uma sonda

para identificar e isolar a região variável ou constante do gene anti-TNF (Sambrook *et al.*, *infra*).

Um oligonucleótido, ou um conjunto de oligonucleótidos, adequados, os quais são capazes de codificar um fragmento da região variável ou constante anti-TNF (ou o qual é complementar a um tal oligonucleótido, ou conjunto de oligonucleótidos) é identificado (usando o procedimento acima descrito), sintetizado e hibridado por meios bem conhecidos na técnica, contra um DNA ou, mais preferivelmente, contra uma preparação de cDNA derivada de células as quais são capazes de expressar anticorpos anti-TNF ou as suas regiões variáveis ou constantes. As moléculas de oligonucleótido de cadeia simples complementares do péptido "o mais provável", com as regiões variáveis e constantes anti-TNF, que codificam as sequências podem ser sintetizadas usando procedimentos que são bem conhecidos de quem seja especialista na técnica (Belagaje, *et al.*, J. Biol. Chem. 254: 5765-5780 (1979); Maniatis, *et al.*, In: Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression, Nierlich, *et al.*, eds., Acad. Press, Nova Iorque (1976); Wu, *et al.*, Proc. Nucl. Res Acid Molec. Biol. 21: 101-141 (1978); Khorana, Science 203: 614-625 (1979)). Adicionalmente, a síntese de DNA pode ser conseguida através do uso de sintetizadores automatizados. Algumas técnicas de hibridação de ácidos nucleicos são descritas por Sambrook *et al.*, em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque (1989); e por Haynes, *et al.*, em: Nucleic Acid Hybridization, A practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Técnicas tais como, ou semelhantes às acima descritas têm permitido, com sucesso, a clonagem de genes para as aldeído-desidrogenases humanas (Hsu, *et al.*, Proc.

Natl. Acad. Sci. E.U.A.A 82: 3771-3775 (1985), a fibronectina (Suzuki, *et al.*, *Bur. Mol. Biol. Organ. J.* 4: 2519-2524 (1985)), o gene recetor de estrogénio humano (Walter, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.A* 82: 7889-7893 (1985)), o ativador do plasminogéne do tipo dos tecidos (Pennica, *et al.*, *Nature* 301: 214-221 (1983) e o DNA complementar da fosfatase alcalina da placenta humana (Keun, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.A* 82: 8715-8719 (1985)).

Num modo alternativo de clonar um polinucleótido que codifica uma região constante ou variável anti-TNF, é preparada uma biblioteca de vetores de expressão através de clonagem do DNA ou, mais preferivelmente, do cDNA (de uma célula capaz de expressar um anticorpo ou uma região constante ou variável, anti-TNF) para um vetor de expressão. A biblioteca é então triada quanto a membros capazes de expressar uma proteína a qual inibe competitivamente a ligação de um anticorpo anti-TNF, tal como o A2 ou o cA2, e a qual apresente uma sequência de nucleótidos que seja capaz de codificar polipéptidos que apresentem a mesma sequência de aminoácidos que os anticorpos anti-TNF ou que fragmentos dos referidos. Nesta forma de realização, o DNA, ou mais preferivelmente, o cDNA, é extraído e purificado a partir de uma célula que é capaz de expressar um anticorpo anti-TNF ou um fragmento do mesmo. O cDNA purificado é fragmentado (através de corte, digestão com endonuclease, etc.) de modo a produzir uma reserva de DNA ou de fragmentos de cDNA. Os fragmentos de DNA ou de cDNA desta reserva são então clonados num vetor de expressão de modo a produzir uma biblioteca genómica de vetores de expressão cujos membros contêm cada um, um fragmento de DNA ou de cDNA clonado único tal como numa

biblioteca de fagos lambda, com expressão em células procariotas (como, por exemplo, em bactérias) ou em células eucariotas, (como, por exemplo, de mamíferos, de leveduras, de insetos ou de fungo). Ver, por exemplo, Ausubel, *infra*, Harlow, *infra*, Colligan, *infra*; Nyysönen *et al.* Bio/Technology 11: 591-595 (1993); Marks *et al.*, Bio/Technology 11: 1145-1149 (1993 de outubro). Após o ácido nucleico que codifica as referidas regiões constantes ou variáveis anti-TNF, ter sido isolado, o ácido nucleico pode ser adequadamente expressado numa célula hospedeira, em conjunto com outra cadeia leve ou pesada, constante ou variável, que codifique o ácido nucleico, de modo a disponibilizar anticorpos monoclonais recombinantes que se ligam ao TNF com uma atividade inibidora. Os referidos anticorpos compreendem, de preferência, uma região variável anti-TNF de humano ou murino, a qual contém um resíduo de estrutura base com resíduos determinantes com complementaridade, os quais são responsáveis pela ligação ao antigénio.

Os genes humanos que codificam as regiões constantes (C) dos anticorpos quiméricos, dos fragmentos e das regiões da presente invenção, podem ser derivados de uma biblioteca de fígado fetal humano, através de métodos já conhecidos. Os genes das regiões C humanas podem ser derivados de qualquer célula humana, incluindo aquelas que expressam e produzem as imunoglobulinas humanas. A região CH humana pode ser derivada de qualquer uma das classes ou isotipos conhecidos de cadeias H humanas, incluindo as gamas, μ , α , δ ou ϵ , e subtipos das referidas, tais como os G1, G2, G3 e G4. Considerando que o isotipo da cadeia H é responsável pelas várias funções de efetor de um anticorpo, a escolha da região CH irá ser guiada pelas funções de efetor que se

desejem, tais como a fixação de complemento, ou atividade na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). De preferência, a região CH é derivada da gama 1 (IgG1), gama 3 (IgG3), gama 4 (IgG4), ou μ (IgM). A região CL humana pode ser derivada de um dos isotipos de cadeia L humana, kapa ou lambda.

Os genes que codificam as regiões C de imunoglobulina humana são obtidos a partir de células humanas através de técnicas padrão de clonagem (Sambrook, *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989) e Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nova Iorque (1987-1993)). Os genes humanos da região C estão rapidamente disponíveis a partir de clones conhecidos que contêm os genes que representam as duas classes de cadeias L, as cinco classes de cadeias H e as subclasses das referidas. Os fragmentos de anticorpo quimérico, tais como o F(ab')₂ e o Fab, podem ser preparados através da construção de um gene quimérico de cadeia H a qual é adequadamente truncada. Por exemplo, um gene quimérico que codifique uma parte de uma cadeia H de um fragmento F(ab')₂ iria incluir as sequências de DNA que codificam o domínio CH1 e a região de dobra da cadeia H, seguidas por um codão de paragem translacional de modo a dar origem à molécula truncada.

Geralmente, os anticorpos, os fragmentos e as regiões de murino, humanos e quiméricos, são produzidos através de clonagem de segmentos de DNA que codificam as regiões que se ligam ao antigénio, de cadeia H e L de um anticorpo específico do TNF, e unindo os referidos segmentos de DNA a segmentos de DNA que codifiquem para regiões CH e de CL,

respetivamente, para produzir genes que codificam para a imunoglobulina de murino, humana ou quimérica. Deste modo, numa forma de realização preferida, é criado um gene quimérico de fusão, o qual compreende um primeiro segmento de DNA que codifica, pelo menos, para a região que se liga ao antigénio de origem não humana, tal como uma região V funcionalmente rearranjada com um segmento (J) de junção, ligado a um segundo segmento de DNA, o qual codifica, pelo menos, para uma parte de uma região C humana.

Deste modo, cDNA que codifica o anticorpo V e as regiões C e o método para produzir um anticorpo quimérico podem envolver vários passos, que são abaixo esboçados:

1. isolamento do RNA mensageiro (mRNA) a partir da linha de células que produzem um anticorpo anti-TNF e dos anticorpos adicionais opcionais que disponibilizam as regiões constantes pesadas e leves; clonagem e produção de cDNA a partir do referido;
2. preparação de uma biblioteca do comprimento completo do cDNA a partir de mRNA purificado, a partir do qual os segmentos de gene apropriados da região V e/ou C dos genes de cadeia L e H, podem ser: (i) identificados com sondas apropriadas, (ii) sequenciados, e (iii) tornados compatíveis com segmentos de gene C ou V de outro anticorpo para um anticorpo quimérico;
3. Construção de sequências de codificação de cadeias H ou L completas através da ligação dos segmentos de gene da região V específica clonada ao gene da região C clonado, tal como é acima

descrito;

4. Expressão e produção de cadeias L e H em hospedeiros selecionados, compreendendo células procariotas e eucariotas de modo a disponibilizar anticorpos de murino-murino, de humano-murino, de humano-humano ou de humano-murino.

Uma característica comum a todas as imunoglobulinas de genes de cadeia H e L e aos seus mRNAs codificados, é a região J. As regiões J das cadeias H e L apresentam sequências diferentes, mas existe um elevado grau de homologia de sequência (maior do que 80%) entre cada um dos grupos, em especial, quando se está próximo da região C. Esta homologia é explorada neste método e as sequências de consenso das regiões J das cadeias H e L, podem ser utilizadas para darem origem a oligonucleótidos para serem usados como iniciadores para introduzir locais de restrição úteis na região J para a subsequente ligação de segmentos da região V a segmentos da região C humanos.

Os vetores de cDNA da região C preparados a partir de células humanas podem ser modificados através de mutagênese dirigida em determinados locais, de modo a colocar um local de restrição numa posição análoga à da sequência humana. Por exemplo, é possível clonar a região (C_k) da cadeia C kapa humana completa e a região C (C gama-1) gama-1 humana completa. Neste caso, o método alternativo com base nos clones das regiões C genómicas como a fonte para os vetores da região C não iria permitir que estes genes se expressassem em sistemas bacterianos onde as enzimas necessárias para remover as sequências intervenientes nestes casos, estão ausentes. Os segmentos da região V

clonada são cortados e são ligados aos vetores da região C com as cadeias L ou H. Alternativamente, a região C gama-1 humana pode ser modificada através da introdução de um codão de terminação o qual irá gerar uma sequência de genes a qual codifica a parte da cadeia H de uma molécula de Fab. As sequências de codificação ligadas às regiões C e V são então transferidas para veículos de expressão apropriados de modo a se expressarem nos hospedeiros apropriados, procariotas ou eucariotas.

É dito que as duas sequências de DNA de codificação se encontram "operacionalmente ligadas" se a ligação resulta numa sequência continuamente translacionável sem alteração ou interrupção da grelha de leitura de triplete. Uma sequência que codifica o DNA está operacionalmente ligada a um elemento de expressão de gene se a referida ligação resultar na função adequada daquele elemento de expressão de gene de modo a resultar na expressão da sequência de codificação.

Os veículos de expressão incluem os vetores plasmídeos ou outros vetores. Os preferidos entre estes veículos são os que apresentam uma sequência de cadeia CH ou CL completa humana funcionalmente completa e que apresentam os referidos locais de restrição adequados criados de forma a que qualquer sequência de cadeia VH ou VL com as terminações coesivas apropriadas possa facilmente ser aí inserida. Os veículos contendo a sequência de cadeia CH ou CL humana servem assim como intermediários para a expressão de qualquer cadeia L ou H completa desejada em qualquer hospedeiro adequado.

Um anticorpo quimérico, tal como o de rato-humano ou

humano-humano, vai ser, tipicamente, sintetizado a partir de genes conduzidos pelos promotores de genes de cromossomas nativos para as regiões V de cadeias H e L de rato utilizadas nos elementos de construção; a emenda ocorre normalmente entre o local dador de emenda na região J de rato e o local aceitador de emenda que precede a região C humana e também nas regiões de emenda que ocorrem na região C humana; a poliadenilação e terminação da transcrição ocorrem nos locais dos cromossomas nativos a jusante das regiões de codificação humanas.

Uma sequência de ácidos nucleicos que codifica, pelo menos, um fragmento de anticorpo anti-TNF pode ser recombinada com um vetor de DNA de acordo com técnicas convencionais, incluindo os terminais lisos ou em ziguezague para ligação, digestão com o enzima de restrição para conseguir os terminais apropriados, o preencher com terminais aderentes tal como for apropriado, o tratamento com fosfatase alcalina de modo a evitar a formação de ligações indesejáveis, e ligação com ligases apropriadas. As técnicas para as referidas manipulações são descritas em, por exemplo, Ausubel, *supra*, Sambrook, *supra*, aqui incorporadas completamente por referência, e são bem conhecidas na técnica.

Uma molécula de ácido nucleico, tal como o DNA, é "capaz de expressar" um polipéptido se contiver sequências de nucleótidos as quais contenham informações reguladoras translacionais e transcrpcionais e se essas sequências estiverem "operacionalmente ligadas" a sequências de nucleótidos as quais codifiquem o polipéptido. Uma ligação operacional é uma ligação na qual as sequências de DNA regulador e a sequência de DNA que se procura que seja

expressa estão ligadas de um modo tal que permita a expressão do gene na forma de péptidos ou de fragmentos de anticorpo anti-TNF em quantidades recuperáveis. A natureza exata das regiões reguladoras necessárias para a expressão do gene podem variar de organismo para organismo e são bem conhecidas no campo de conhecimento análogo. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque (1989); e Ausubel, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nova Iorque (1987, 1993).

Estão disponíveis muitos sistemas de vetores para a expressão de genes com cadeias H e L de péptido anti-TNF clonados em células de mamífero (ver Glover, ed., *DNA Cloning*, Vol. II, págs. 143-238, IRL Press, Washington, DC, 1985). Podem ser seguidas diferentes aproximações para obter os anticorpos de H2L2 completos. É possível co-expressar as cadeias de H e L nas mesmas células de modo a conseguir uma associação intracelular e a ligação das cadeias de H e L originando anticorpos H2L2 tetraméricos completos. A co-expressão pode ocorrer usando os mesmos ou diferentes plasmídeos no mesmo hospedeiro. Os genes, tanto para as cadeias H como L, podem ser colocados no mesmo plasmídeo, o qual é então transfetado para as células, selecionando assim diretamente as células que expressem ambas as cadeias. Alternativamente, as células podem ser primeiro transfetadas com um plasmídeo que codifique uma cadeia como, por exemplo, a cadeia L, seguindo-se depois a transfeção da linha de células resultantes com um plasmídeo da cadeia H o qual contém um segundo marcador selecionável. As linhas de células que produzem as moléculas de H2L2 por qualquer uma das vias pode ser transfetada com plasmídeos que os quais codificam cópias adicionais dos péptidos,

cadeias de H, L, ou H mais L em conjunto com marcadores selecionáveis adicionais de modo a gerar linhas de células com propriedades melhoradas, tal como a maior produção de moléculas de anticorpo H2L2 em conjunto com uma estabilidade aumentada das linhas de células transfetadas.

Moléculas Recetoras

As moléculas recetoras (também aqui referidas como recetores de TNF solúvel) úteis para os métodos e composições da presente invenção são os que se ligam a TNF com alta afinidade (ver, e.g., Feldmann *et al.*, Publicação Internacional No. WO 92/07076 (publicada em 30 de abril, 1992), aqui incorporadas como referência) e que possuem baixa propriedades imunogénicas. Em particular, os recetores de superfície de célula TNF de 55 kDa (p55 TNF-R) e de 75 kDa (p75 TNF-R) são úteis para a presente invenção. As formas truncadas destes recetores, compreendem os domínios extracelulares ECD) dos recetores ou partes funcionais destes, são também úteis na presente invenção. As formas truncadas de recetores de TNF, que compreendem o ECD, foram detetadas na urina e soro como proteínas de ligação inibidoras de TNF de 30 kDa e 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, J. Biol. Chem. 265:1531-1536 (1990)). Moléculas multiméricas recetoras de TNF e moléculas de fusão imunorecetoras de TNF, e derivados e fragmentos ou partes destes, são exemplos adicionais de moléculas recetoras as quais são úteis nos métodos e composições da presente invenção. As moléculas recetoras as quais podem ser usadas na invenção são caracterizadas pela sua capacidade de tratar doentes durante períodos alargados com bom a excelente alívio dos sintomas e baixa toxicidade. Baixas propriedades imunogénicas e/ou alta afinidade, assim como outras propriedades não definidas, podem contribuir para os

resultados terapêuticos alcançados.

As moléculas multiméricas recetoras de TNF úteis na presente invenção compreendem todas ou uma parte funcional do ECD de dois ou mais recetores de TNF ligados através de um ou mais ligandos polipéptidos. As moléculas multiméricas podem compreender adicionalmente um péptido de sinal de uma proteína secretada para expressão direta da molécula multimérica. Estas moléculas multiméricas e métodos para a sua produção foram descritos na patente U.S. No. 7,070,783 (pedida a 9 de maio, 1995), o conteúdo do qual é aqui incorporada na íntegra como referência.

As moléculas de fusão imunorecetoras de TNF úteis nos métodos e composições da presente invenção compreendem pelo menos uma parte de uma ou mais moléculas de imunoglobulina e todas ou uma parte funcional de um ou mais recetores de TNF. Estas moléculas de fusão imunorecetoras podem ser montadas como monómeros, ou hetero- ou homomultímeros. As moléculas de fusão imunorecetoras podem também ser monovalentes ou multivalentes. Um exemplo de uma tal molécula de fusão imunorecetora de TNF é uma proteína de fusão recetora de TNF/IgG.

Molécula de fusão imunorecetora de TNF e métodos para a sua produção foram descritos na técnica (Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Butler *et al.*, Cytokine 6(6):616-623 (1994); Baker *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, Patente U.S. No. 5,447,851; e Pedido de Patente U.S. No. 08/442,133

(pedido em 16 de maio, 1995)). Estas referências são aqui incorporadas na íntegra como referência. Métodos para produzir moléculas de fusão imunoreceptoras podem também ser encontradas em Capon *et al.*, Patente U.S. No. 5,116,964; Capon *et al.*, Patente U.S. No. 5,225,538; e Capon *et al.*, Nature 337:525-531 (1989), cujas referências são aqui incorporadas como referencia.

Derivados, fragmentos, regiões e partes funcionais das partes funcionais das moléculas recetoras assemelham-se funcionalmente as moléculas recetoras que podem ser usados na presente invenção (i.e., ligam-se a TNF com alta afinidade e possuam baixas propriedades imunogénicas). Um equivalente funcional ou derivado da molécula recetora refere-se à parte da molécula recetora, ou a parte da sequência da molécula recetora que codifica a molécula recetora, que é de tamanho suficiente e sequências para funcionalmente se assemelhar às moléculas recetoras que podem ser usadas na presente invenção (i.e., ligam TNP com alta afinidade e possuem baixas propriedades imunogénicas). Um equivalente funcional da molécula recetora inclui também moléculas recetoras modificadas que se assemelham funcionalmente às moléculas recetoras que podem ser usadas na presente invenção (i.e., ligam TNF com alta afinidade e possuem baixa propriedade imunogénica). Por exemplo, um equivalente funcional da molécula recetora pode conter um codão um codão de "SILÊNCIO" de uma ou mais substituições, deleções ou adições de aminoácidos, (e.g., substituição de um aminoácido ácido por outro aminoácido ácido; ou substituição de um codão que codifica o mesmo ou diferente aminoácido hidrofóbico para outro codão que codifica um aminoácido hidrofóbico). Ver Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. e

Wiley-Interscience. New York (1989).

Metotrexato

As composições de metotrexato presentemente disponíveis por via oral e intravenosa incluem o pacote de dosagem de metotrexato Rheumatrex® (Lederle Laboratories, Wayne, NJ); os comprimidos de metotrexato (Mylan Pharmaceuticals Inc., Morgantown, WV; Roxane Laboratories, Inc., Colombo, OH); e comprimidos de metotrexato de sódio, para injeção e injeção (Immunex Corporation, Seattle, WA) e metotrexato LPF® de sódio (injeção de metotrexato de sódio) (Immunex Corporation, Seattle, WA). O metotrexato também está disponível a partir de Pharmacochemie (Holanda). Também podem ser usados pró-medicamentos, análogos e/ou homólogos de metotrexato (como, por exemplo, os antagonistas folato) nos métodos e nas composições da presente invenção. Alternativamente, podem ser usados outros agentes imunossupressores (ou medicamentos que suprimam o sistema imunitário) nos métodos e nas composições da presente invenção.

Administração

Os antagonistas TNP, metotrexato e as composições da presente divulgação podem ser administrados a um indivíduo através de uma grande variedade de meios. As vias de administração incluem a via intradérmica, transdérmica (por exemplo, nos polímeros de lenta libertação), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, oral, tópica, epidural, bucal, retal, vaginal e intranasal. Pode ser usada qualquer outra via de administração terapeuticamente eficaz tal como, por exemplo, a infusão ou a injeção de bolus, absorção pelas mucosas epiteliais ou mucocutâneas, ou através da terapia genética em que uma molécula de DNA,

a qual codifica a proteína ou péptido terapêutico é administrada ao paciente através de, por exemplo, um vetor, o qual faz com que a proteína ou péptido seja expressada e secretada em níveis terapêuticos *in vivo*. Para além do referido, os antagonistas TNF, o metotrexato e as composições da presente divulgação podem ser administrados em conjunto com outros componentes de agentes biologicamente ativos, tais como tensoativos farmacologicamente aceitáveis (por exemplo, os glicéridos), excipientes (como, por exemplo, a lactose), transportadores, diluentes e veículos. Se for desejado, também podem ser adicionados determinados agentes adoçantes, aromatizantes e/ou corantes.

Os antagonistas de TNF e o metotrexato podem ser administrados de um modo profilático ou terapêutico a um indivíduo. Os anticorpos anti-TNF podem ser administrados antes de, simultaneamente com (nas mesmas ou em diferentes composições) ou sequencialmente à administração de metotrexato, de tal modo que antagonistas de TNF são administrados como uma terapia concomitante à terapia com o metotrexato.

Para a administração parentérica (por exemplo, intravenosa, subcutânea ou intramuscular), os antagonistas de TNF, o metotrexato e as composições da divulgação podem ser formulados na forma de uma solução, suspensão, emulsão ou pó liofilizado em associação com um veículo parenteral farmacologicamente aceitável. Exemplos dos referidos veículos são a água, soro fisiológico, solução de Ringer, solução de dextrose, e albumina do soro humana a 5%. Também podem ser usados liposomas e veículos não aquosos tais como os óleos estáveis. O veículo ou o pó liofilizado podem

conter elementos aditivos que mantenham a isotonicidade (como, por exemplo cloreto de sódio ou manitol) e a estabilidade química (como, por exemplo, soluções tampão e conservantes). A formulação é esterilizada através de técnicas vulgarmente utilizadas.

São descritos transportadores farmacêuticos adequados no livro Ciências Farmacêuticas de Remington, A. Osol, um texto de referência padrão neste campo da técnica.

Como exemplo, uma composição parentérica adequada para administração através de injeção é preparada dissolvendo 1,5% em peso de componente ativo numa solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Os antagonistas de TNF e o metotrexato são administrados em quantidades terapeuticamente eficazes; as composições da presente invenção são administradas em quantidades terapeuticamente eficazes. Tal como aqui usado, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é tal que a administração do antagonistas de TNF e do metotrexato, ou a administração de uma composição da presente invenção, resulta na inibição da atividade biológica do TNP relativamente à atividade biológica do TNP quando não são administradas quantidades terapeuticamente eficazes de antagonista e de metotrexato, ou relativamente à atividade biológica do TNF quando uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição não é administrada. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é, de preferência, uma quantidade de antagonistas de TNF e metotrexato necessária para reduzir significativamente ou eliminar os sinais e sintomas associados a uma doença específica mediada pelo TNF. Tal como aqui usado, uma quantidade terapeuticamente eficaz não

é necessariamente uma quantidade tal que a administração do antagonistas de TNF sozinho, ou a administração do metotrexato sozinho, devem necessariamente resultar na inibição da atividade biológica do TNF.

Uma vez que tenha sido administrada uma quantidade terapêuticamente eficaz, pode ser administrada ao indivíduo uma quantidade de manutenção do antagonista de TNF sozinho, de metotrexato sozinho, ou de uma combinação de antagonistas de TNF e metotrexato. Uma quantidade de manutenção é a quantidade de antagonistas de TNF, de metotrexato, ou da combinação de antagonistas de TNF e metotrexato, necessária para manter a redução ou a eliminação dos sinais e dos sintomas associados a uma doença específica mediada pelo TNF, alcançada pela dose terapêuticamente eficaz. A quantidade de manutenção pode ser administrada na forma de uma única dose, ou numa série de doses separadas por intervalos de dias ou de semanas.

A dosagem administrada a um indivíduo irá variar, dependendo de uma grande variedade de fatores, que incluem as características farmacodinâmicas dos antagonistas específicos, e do seu modo e via de administração; do tamanho, idade, sexo, saúde, peso corporal e dieta do recetor; da natureza e extensão dos sintomas da doença a ser tratada, do tipo de tratamento simultâneo, da frequência do tratamento e do efeito desejado. Os métodos de determinar *in vitro* e *in vivo* a inibição do TNF num indivíduo são bem conhecidos para quem tenha qualificações na técnica. Os referidos ensaios *in vitro* podem incluir um ensaio de citotoxicidade do TNF (como, por exemplo, o ensaio de WEHI ou um ensaio radio-imunológico, ELISA). Os métodos *in vivo* podem incluir os ensaios de mortalidade de

roedores e/ou os sistemas modelo de patologias de primatas (Mathison *et al.*, J. Clin. Invest., 81: 1925-1937 (1988); Beutler *et al.*, Science 229: 869-871 (1985); Tracey *et al.*, Nature 330: 662-664 (1987); Shimamoto *et al.*, Immunol. Lett. 17: 311-318 (1988); Silva *et al.*, J. Infect. Dis. 162: 421-427 (1990); Opal *et al.*, J. Infect. Dis. 161: 1148-1152 (1990); Hinshaw *et al.*, Circ. Shock 30: 279-292 (1990)).

O antagonista TNF e o metotrexato podem, cada um, ser administrados em doses únicas ou em doses múltiplas, dependendo de fatores tais como a natureza e a extensão dos sintomas, do tipo de tratamento a ser dado em simultâneo e do efeito desejado. Deste modo, podem ser usados outros regimes terapêuticos ou agentes (como, por exemplo, os regimes de múltiplos medicamentos) em combinação com a coadministração terapêutica dos antagonistas de TNF e do metotrexato. Numa forma de realização específica, um antagonista de TNF é administrado em doses múltiplas. Numa outra forma de realização, o metotrexato é administrado na forma de uma série de doses baixas separadas por intervalos de dias ou semanas. O ajuste e a manipulação das gamas de dosagem estabelecidas são facilmente controlados por um especialista na técnica.

Normalmente uma dose diária de componente ativo pode variar de cerca de 0,01 a 100 miligramas por quilograma de peso corporal. Vulgarmente, de 1 a 40 miligramas por quilograma por dia dados em doses divididas de 1 a 6 vezes por dia ou numa forma que permita a libertação prolongada, são eficazes para obter os resultados desejados. As segundas ou subsequentes administrações podem ser administradas numa dosagem que seja igual, menor do que ou maior do que a dose

inicial ou prévia administrada ao indivíduo.

Uma segunda ou subsequente administração é, de preferência, feita durante ou imediatamente antes de uma recaída ou de um retorno da doença ou dos sintomas da doença. As segundas e subsequentes administrações podem, por exemplo, ser administradas entre cerca de um dia a 30 semanas da administração prévia. Podem ser dadas duas, três, quatro ou mais administrações totais ao indivíduo, tal como seja necessário.

As formas de dosagem (composição) adequadas para a administração interna contêm geralmente, de cerca de 0,1 miligrama a cerca de 500 miligramas de componente ativo por unidade. Nestas composições farmacêuticas o componente ativo está vulgarmente presente numa quantidade de cerca de 0,5 a 95% em peso com base no peso total da composição.

A presente invenção irá agora ser ilustrada pelos seguintes exemplos que não se pretende que sejam, de qualquer forma, limitantes.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 Tratamento Clínico da Artrite Reumatóide através de Infusões Múltiplas de um Anticorpo Anti-TNF com e sem o Metotrexato

Foi conduzido um estudo aleatório, duplamente-cego, com o efeito placebo controlado para avaliar a segurança e eficácia de um anticorpo anti-TNF monoclonal quimérico (cA2) dado em infusões múltiplas de 1, 3 ou 10 mg/kg de cA2, individualmente ou em combinação com o metotrexato, quando comparado com as infusões múltiplas de placebo em combinação com o metotrexato, no tratamento de artrite

reumatóide (RA) em pacientes.

Pacientes

Cento e um (101) pacientes de seis centros europeus que tinham estado a usar o metotrexato durante, pelo menos, 6 meses, e que tinham estado com uma dose estável de 7,5 mg/semana durante pelo menos 4 semanas, e que apresentavam a doença ativa (de acordo com os critérios da Faculdade de Reumatologia Americana) com mudanças erosivas nos raios X das mãos e dos pés, participaram na experiência. A doença ativa foi definida pela presença de seis ou mais articulações inchadas mais pelo menos três de quatro critérios secundários (duração da rigidez matutina ≥ 45 minutos; ≥ 6 articulações dolorosas ou amolecidas; velocidade de sedimentação de eritrócitos (ESR) ≥ 28 mm/hora; proteína C-reativa (CRP) ≥ 20 mg/l.

Em pacientes que utilizavam corticosteróides ($\leq 7,5$ mg/dia) ou medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (NSAID), as doses tinham estado estáveis durante 4 semanas antes do ensaio. A dose de corticosteróides permaneceu estável ao longo da participação no ensaio. A dose de NSAID também permaneceu essencialmente estável ao longo da participação no ensaio.

Infusões do Estudo

O anticorpo anti-TNF monoclonal quimérico (cA2) foi disponibilizado na forma de uma solução estéril que continha 5 mg de cA2 por cada ml de uma solução de soro fisiológico 0,01 M com tampão de fosfato em 0,15 M de cloreto de sódio com 0,01% de polisorbato 80, com pH 7,2. Os frascos de placebo continham 0,1% de albumina do soro humano na mesma solução tampão. Antes de ser usada, a

quantidade apropriada de cA2 ou de placebo foi diluída a 300 mL em soro fisiológico estéril pelo farmacêutico, e foi administrada por via intravenosa por um filtro de 0,2 µm em linha, durante 2 horas. As características dos sacos de placebo e da infusão de cA2 eram idênticas, e os investigadores e os pacientes não sabiam qual a infusão que estava a ser administrada.

Avaliações

Os pacientes foram aleatoriamente divididos em sete grupos de tratamento. O número de pacientes em cada grupo de dose (ou de tratamento) é indicado na Tabela 1. Cada um dos 101 pacientes recebeu múltiplas infusões de 0, 1, 3 ou 10 mg/kg de cA2. As infusões deveriam ser administradas nas semanas 0, 2, 6, 10 e 14. Começando na semana 0, os pacientes estavam a receber 7,5 mg/semana de metotrexato (Pharmacochemie, Holanda) ou 3 comprimidos/semana de placebo (Pharmacochemie, Holanda). Os pacientes foram observados quanto a eventos adversos durante as infusões e regularmente depois disso através de entrevistas, de exames físicos e de testes de laboratório.

As seis avaliações primárias da atividade da doença foram escolhidas de modo a permitir a análise da resposta em pacientes individuais de acordo com o índice de Paulus (Paulus, *et al.*, *Arthritis Rheumatism* 33: 477-484 (1990), cujas aprendizagens são aqui incorporadas por referência). As avaliações que contribuíram para este índice foram as contagens de articulações amolecidas e de articulações inchadas (60 e 58 articulações, respetivamente, não sendo as ancas avaliadas quanto ao inchaço; classificação de 0 a 3), a duração da rigidez matinal (minutos), a avaliação do paciente e do médico da severidade da doença (numa escala

de 5 pontos, variando de 1 (livre de sintomas) a 5 (muito severa)), e a velocidade de sedimentação dos eritrócitos (ESR). Era considerado que os pacientes tinham respondido se pelo menos quatro das seis variáveis melhorassem, definido como pelo menos 20% de melhorias nas variáveis contínuas e pelo menos dois níveis de melhoria, ou uma melhoria de 2 para 1 nas duas avaliações da severidade da doença (Resposta 20% de Paulus). As melhorias de pelo menos 50% nas variáveis contínuas foram também utilizadas (Resposta 50% de Paulus).

Outras avaliações da severidade da doença incluíram o valor da dor (de 0 a 10 cm numa escala análoga visual (VAS)), uma avaliação da fadiga (de 0 a 10 cm VAS) e uma avaliação da força muscular do aperto com as mãos (de 0 a 300 mmHg, média de três medidas por mão por ação do esfigmomanómetro).

A ESR foi medida em cada um dos locais do estudo com um método padrão (Westergen). A proteína C-reativa (CRP) foi medida pela velocidade da nefelometria (ensaio imunitário polarizante fluorescente de Abbott). Ver também Elliott *et al.*, Lancet 344: 1105-1110 (1994); Elliott *et al.*, Lancet 344: 1125-1127 (1994); e Elliott *et al.*, Arthritis Rheum. 36 (12): 1681 -1690 (1993), cujas referências são aqui inteiramente incorporadas por referência.

As avaliações foram feitas nas semanas 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 26.

Resultados

Os 101 pacientes foram aleatoriamente divididos em sete grupos de tratamento (ou de dose). Os pacientes que foram atribuídos a cada um dos grupos de dose foram bem estudados

quanto à demografia básica. A duração da doença e as contagens de articulações inchadas e amolecidas à partida também foram bem equilibradas ao longo dos vários grupos (Tabela 1). A Tabela 1 também apresenta a dose máxima de metotrexato administrada nos últimos 6 meses antes do ensaio. As médias das doses máximas para cada um dos grupos variavam entre 10 e 15 mg/semana; não existiam nenhuma diferença significativa entre os grupos de tratamento ($p = 0,404$).

TABELA 1 Contagens de articulações características da doença à partida
Grupos de tratamento

	Placebo	1 mg/kg de cA2	
	MTX +	MTX +	MTX -
Duração da doença. (anos)			
Pontos Avaliados	14	14	15
Média \pm SD	7,6 \pm 4,0	14,3 \pm 12,1	7,6 \pm 6,0
Mediana	6,9	11,4	5,2
Intervalo IQ	(4,3 11,5)	(3,3 24,7)	(3,4 9,0)
Intervalo	(1,8 14,2)	(0,7 37,3)	(2,5 21,3)
Número de articulações inchadas, conjunto de articulações de Paulus (0-58)			
Pontos Avaliados	14	14	15
Média \pm SD	18,1 \pm 8,6	16,9 \pm 7,8	21,2 \pm 11,2
Mediana	16,5	15,5	20,0
Intervalo IQ	(12,0 25,0)	(10,0 25,0)	(10,0 33,0)
Intervalo	(6,0 38,0)	(6,0 29,0)	(7,0 40,0)
Número de articulações amolecidas, conjunto de articulações de Paulus (0-60)			
Pontos Avaliados	14	14	15
Média \pm SD	31,5 \pm 14,2	19,1 \pm 10,7	29,9 \pm 17,1
Mediana	27,0	16,0	30,0
Intervalo IQ	(22,0 44,0)	(13,0 30,0)	(14,0 45,0)
Intervalo	(8,0 52,0)	(2,0 39,0)	(6,0 58,0)
Dose Máxima MTX 6 meses ant. (mg/kg)			
Pontos Avaliados	14	14	15
Média \pm SD	13,8 \pm 3,9	11,6 \pm 3,5	12,8 \pm 5,6
Mediana	15,0	11,3	12,5
Intervalo IQ	(10,0 15,0)	(10,0 12,5)	(10,0 15,0)
Intervalo	(7,5 20,0)	(7,5 20,0)	(7,5 30,0)

MTX = Metotrexato

TABELA 1 (Continuação)

Grupos de Tratamento

	3 mg/kg de cA2	
	MTX +	MTX -
Duração da doença. (anos)		
Pontos Avaliados	15	14
Média ± SD	12,1 ±9,0	7,8 ±4,3
Mediana	11,9	7,7
Intervalo IQ	(4,3 16,4)	(4,6 9,8)
Intervalo	(0,7 30,5)	(1,4 17,4)
Número de articulações inchadas, conjunto de articulações de Paulus (0-58)		
Pontos Avaliados	15	14
Média ± SD	17,7 ±5,9	19,7 ±9,9
Mediana	16,0	17,0
Intervalo IQ	(13,0 22,0)	(11,0 32,0)
Intervalo	(10,0 29,0)	(8,0 34,0)
Número de articulações amolecidas, conjunto de articulações de Paulus (0-60)		
Pontos Avaliados	15	14
Média ± SD	24,5 ±14,4	31,2 ±11,7
Mediana	21,0	31,0
Intervalo IQ	(12,0 32,0)	(23,0 39,0)
Intervalo	(10,0 52,0)	(9,0 52,0)
Dose Máxima MTX 6 meses ant. (mg/kg)		
Pontos Avaliados	14	13
Média ± SD	11,6 ±3,3	11,7 ±4,8
Mediana	10,0	10,0
Intervalo IQ	(10,0 15,0)	(7,5 12,5)
Intervalo	(7,5 17,5)	(7,5 25,0)

MTX = Metotrexato

TABELA 1 (Continuação)

Grupos de Tratamento

	10 mg/kg de cA2		Todos os Pacientes	Efeito do tratamento no valor de p
	MTX +	MTX -		
Duração da doença. (anos)				
Pontos Avaliados	14	15	101	
Média ± SD	11,1 ±7,4	9,7 ±7,4	10,0 ±7,8	0,634
Mediana	10,7	7,6	7,6	
Intervalo IQ	(4,5 15,5)	(4,9 14,9)	(4,3 14,4)	
Intervalo	(1,4 24,1)	(1,1 24,3)	(0,7 37,3)	
Número de articulações inchadas, conjunto de articulações de Paulus (0-58)				
Pontos Avaliados	14	15	101	
Média ± SD	21,1 ±8,2	17,8 ±8,7	18,9 ±8,7	0,643
Mediana	19,5	17,0	18,0	
Intervalo IQ	(15,0 31,0)	(11,0 21,0)	(12,0 25,0)	
Intervalo	(10,0 34,0)	(7,0 41,0)	(6,0 41,0)	
Número de articulações amolecidas, conjunto de articulações de Paulus (0-60)				
Pontos Avaliados	14	15	101	
Média ± SD	26,5 ±12,0	26,2 ±11,7	27,0 ±13,5	0,135
Mediana	25,5	23,0	25,0	
Intervalo IQ	(21,0 38,0)	(17,0 35,0)	(15,0 38,0)	
Intervalo	(8,0 44,0)	(11,0 48,0)	(2,0 58,0)	
Dose Máxima MTX 6 meses ant. (mg/kg)				
Pontos Avaliados	14	15	99	
Média ± SD	12,7 ±5,0	12,5 ±3,0	12,4 ±4,2	0,404
Mediana	10,0	12,5	12,5	
Intervalo IQ	(10,0 15,0)	(10,0 15,0)	(10,0 15,0)	
Intervalo	(7,5 25,0)	(7,5 20,0)	(7,5 30,0)	

MTX = Metotrexato

A análise primária previamente especificada neste ensaio era a comparação do tempo total de resposta clínica durante o período de duração do tratamento de 26 semanas. Os resultados para a análise primária são apresentados na Tabela 2. A duração da resposta de todos os grupos tratados com o cA2, com a exceção do grupo de 1 mg/kg que não recebia metotrexato, foi significativamente melhorada ($p < 0,001$) quando comparadas com o grupo de placebo que apenas recebia o metotrexato.

TABELA 2 Tempo total de Resposta * com base no critério de 20 % de Paulus

Grupos de Tratamento

	Placebo (n = 14)		1 mg/kg de cA2 (n = 15)		3 mg/kg de cA2 (n = 14)		10 mg/kg de cA2 (n = 13)		Efeito do tratamento no valor de p
	MTX +	MTX -	MTX +	MTX -	MTX +	MTX -	MTX +	MTX -	
Tempo total de resposta em semanas									
Mediana	0	16,6	2,6	17,2	16,5	17,2	> 23,1	10,4	<0,001
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	
Percentil 25	0,0	6,2	2,0	4,0	7,0	4,0	2,6	6,9	
Percentil 75	0,0	22,5	8,0	20,7	> 20,1	20,7	> 24,6	> 23,1	
Máximo	> 15,1	> 26,9	15,1	> 25,9	> 24,9	> 25,9	> 25,6	> 26,4	
val de p: vs. apenas MTX		<0,001	0,119	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
* Os pacientes foram controlados durante 26 semanas após a infusão inicial de cA2									

As taxas de resposta no critério de 20 % de Paulus são apresentados na Tabela 3. Os que desistiram foram considerados como não tendo respondido devido a terem desistido do estudo. Com a exceção do grupo de 1 mg/kg que não recebia metotrexato, todos os grupos tratados com o cA2 demonstraram apresentar benefício clínico durante 14

semanas quando a última dose de cA2 foi recebida. Um benefício clínico sustentado foi observado durante 26 semanas (quando ocorreu a última visita de acompanhamento) em pacientes que receberam 3 ou 10 mg/kg de cA2 com metotrexato. Cerca de metade dos pacientes que receberam 3 mg/kg de cA2 com metotrexato, demonstrou um benefício clínico continuado durante 26 semanas.

TABELA 3 Número de pacientes que responderam de acordo com o critério de 20 % de Paulus em cada uma das alturas de avaliação

	Grupos de tratamento		
	Placebo	1 mg/kg de cA2	
	MTX + (n = 14)	MTX + (n = 14)	MTX - (n = 15)
Pacientes com alguma resposta	21 % (3/14)	93 % 13/14	80 % 12/15
valor p vs. Apenas o MTX		< 0,001	0,006
Tempo após a infusão			
1 semana	0 % (0/14)	31 % (4/13)	53 % (8/15)
2 semanas	7 % (1/14)	64 % (9/14)	57 % (8/14)
4 semanas ^a	0 % (0/14)	79 % (11/14)	33 % (5/15)
6 semanas ^a	0 % (0/14)	71 % (10/14)	27 % (4/15)
8 semanas ^a	14 % (2/14)	64 % (9/14)	20 % (3/15)
10 semanas	7 % (1/14)	71 % (10/14)	20 % (3/15)
12 semanas ^a	7 % (1/14)	57 % (8/14)	13 % (2/15)
14 semanas ^a	0 % (0/14)	71 % (10/14)	7 % (1/15)
16 semanas ^a	14 % (2/14)	64 % (9/14)	7 % (1/15)
18 semanas	21 % (3/14)	50 % (7/14)	13 % (2/15)
20 semanas	7 % (1/14)	54 % (7/13)	13 % (2/15)
22 semanas	7 % (1/14)	46 % (6/13)	0 % (0/15)
26 semanas ^a	7 % (1/14)	21 % (3/14)	7 % (1/15)

^aAs visitas de avaliação foram previamente especificadas para a análise

TABELA 3 (Continuação)

Grupos de tratamento

	3 mg/kg de cA2		10 mg/kg de cA2		Efeito do tratamento no valor de p
	MTX + (n= 15)	MTX - (n= 14)	MTX + (n= 13)	MTX - (n= 15)	
Pacientes com alguma resposta	80 % 12/15	79 % 11/14	85 % 11/13	80 % 12/15	< 0,001
valor p vs. Apenas o MTX	0,002	0,002	0,001	0,004	
Tempo após a infusão					
1 semana	27 % (4/15)	43 % (6/14)	31 % (4/13)	60 % (9/15)	
2 semanas	27 % (4/15)	43 % (6/14)	62 % (8/13)	53 % (8/15)	
4 semanas ^a	40 % (6/15)	64 % (9/14)	54 % (7/13)	53 % (8/15)	0,002
6 semanas ^a	47 % (7/15)	50 % (7/14)	54 % (7/13)	47 % (7/15)	
8 semanas ^a	60 % (9/15)	71 % (10/14)	69 % (9/13)	40 % (6/15)	0,003
10 semanas	67 % (10/15)	64 % (9/14)	69 % (9/13)	53 % (8/15)	
12 semanas ^a	67 % (10/15)	64 % (9/14)	62 % (8/13)	60 % (8/13)	< 0,001
14 semanas ^a	60 % (9/15)	57 % (8/14)	77 % (10/13)	53 % (8/15)	
16 semanas ^a	67 % (10/15)	64 % (9/14)	54 % (7/13)	67 % (10/15)	< 0,001
18 semanas	71 % (10/14)	69 % (9/13)	62 % (8/13)	57 % (8/14)	
20 semanas	53 % (8/15)	43 % (6/14)	54 % (7/13)	53 % (8/15)	
22 semanas	47 % (7/15)	36 % (5/14)	54 % (7/13)	33 % (5/15)	
26 semanas ^a	47 % (7/15)	21 % (3/14)	54 % (7/13)	33 % (5/15)	0,013

^aAs visitas de avaliação foram previamente especificadas para a análise

As taxas de resposta ao critério de 50% de Paulus são apresentadas na Tabela 4. A magnitude do benefício clínico do tratamento com o cA2 era significativa. A maioria de pacientes estava a responder ao tratamento com o cA2 de acordo com o critério de 50% de Paulus.

TABELA 4 Número de pacientes que responderam de acordo com o critério de 50 % de Paulus em cada uma das alturas da avaliação

	Grupos de tratamento		
	Placebo	1 mg/kg de cA2	
	MTX + (n = 14)	MTX + (n = 14)	MTX - (n = 15)
Pacientes com alguma resposta	14,3 % (2/14)	85,7 % 12/14	40 % 6/15
valor p vs. Apenas o MTX		< 0,001	0,079
Tempo após a infusão			
1 semana	0,0 % (0/14)	7,7 % (1/13)	26,7 % (4/15)
2 semanas	0,0 % (0/14)	21,4 % (3/14)	28,6 % (4/14)
4 semanas ^a	0 % (0/14)	57,1 % (8/14)	13,3 % (2/15)
6 semanas ^a	0,0 % (0/14)	57,1 % (8/14)	0,0 % (0/15)
8 semanas ^a	7,1 % (1/14)	50 % (7/14)	0,0 % (0/15)
10 semanas	0,0 % (0/14)	57,1 % (8/14)	0,0 % (0/15)
12 semanas ^a	7,1 % (1/14)	50 % (7/14)	6,7 % (1/15)
14 semanas	0,0 % (0/14)	57,1 % (8/14)	6,7 % (1/15)
16 semanas ^a	0,0 % (0/14)	64,3 % (9/14)	6,7 % (1/15)
18 semanas	7,1 % (1/14)	50,0 % (7/14)	6,7 % (1/15)
20 semanas	7,1 % (1/14)	53,8 % (7/13)	0,0 % (0/15)
22 semanas	0,0 % (0/14)	38,5 % (5/13)	0,0 % (0/15)
26 semanas ^a	0,0 % (0/14)	21,4 % (3/14)	6,7 % (1/15)

^aAs visiras de avaliação foram previamente especificadas para análise

TABELA 4 (Continuação)**Grupos de tratamento**

	3 mg/kg de cA2		10 mg/kg de cA2		Efeito do tratamento no valor de p
	MTX+ (n=15)	MTX- (n=14)	MTX+ (n=13)	MTX- (n=15)	
Pacientes com alguma resposta	73,3 % (11/15)	64,3 % (9/14)	76,9 % (10/13)	66,7 % (10/15)	< 0,001
valor p vs. Apenas o MTX	0,001	0,008	0,002	0,009	
Tempo após a infusão					
1 semana	0,0 % (0/15)	35,7 % (5/14)	7,7 % (1/13)	26,7 % (4/15)	
2 semanas	6,7 % (1/15)	28,6 % (4/14)	15,4 % (2/13)	20,0 % (3/15)	
4 semanas ^a	13,3 % (2/15)	28,6 % (4/14)	46,2 % (6/13)	40,0 % (6/15)	0,006
6 semanas	26,7 % (4/15)	42,9 % (6/14)	38,5 % (5/13)	33,3 % (5/15)	
8 semanas ^a	40,0 % (6/15)	50,0 % (7/14)	69,2 % (9/13)	33,3 % (5/15)	< 0,001
10 semanas	40,0 % (6/15)	50,0 % (7/14)	69,2 % (9/13)	40,0 % (6/15)	
12 semanas ^a	60,0 % (9/15)	35,7 % (5/14)	61,5 % (8/13)	40,0 % (6/15)	< 0,001
14 semanas	40,0 % (6/15)	35,7 % (5/14)	61,5 % (8/13)	40,0 % (6/15)	
16 semanas ^a	60,0 % (9/15)	50,0 % (7/14)	53,8 % (7/13)	40,0 % (6/15)	< 0,001
18 semanas	71,4 % (10/14)	46,2 % (6/13)	61,5 % (8/13)	57,1 % (8/14)	
20 semanas	53,3 % (8/15)	35,7 % (5/14)	46,2 % (6/13)	40,0 % (6/15)	
22 semanas	46,7 % (7/15)	14,3 % (2/14)	53,8 % (7/13)	26,7 % (4/15)	
26 semanas ^a	40,0 % (6/15)	14,3 % (2/14)	46,2 % (6/13)	20,0 % (3/15)	0,008

^aAs visitas de avaliação foram previamente especificadas para análise

Proporcionalmente às taxas de resposta clínicas apresentadas nas Tabelas de 2 a 4, a maioria dos pacientes nos grupos de tratamento que demonstraram a eficácia do tratamento com o cA2 receberam todas as 5 infusões de cA2 (Tabela 5). A razão principal para pacientes não terem recebido o regime de dose completo foi a falta de eficácia no grupo de placebo (apenas recebiam metotrexato) e no grupo de 1 mg/kg que não recebia metotrexato. Todos os 15 pacientes do grupo de 3 mg/kg que recebiam metotrexato completaram o regime de 5 doses de infusão.

TABELA 5 Número de infusões completadas
Grupos de Tratamento

	Placebo MTX+ (n=14)		1 mg/kg de cA2 MTX+ (n=14)		3 mg/kg de cA2 MTX+ (n=15)		10 mg/kg de cA2 MTX+ (n=14)		Efeito do tratamento no valor de P	
	MTX+ (n=14)	MTX- (n=15)	MTX+ (n=14)	MTX- (n=14)	MTX+ (n=15)	MTX- (n=14)	MTX+ (n=14)	MTX- (n=15)		
Pacientes com infusões completadas ^a										
5 infusões	6 (42,86%)	12 (85,71%)	8 (57,14%)	12 (85,71%)	15 (100,00%)	12 (85,71%)	12 (85,71%)	12 (80,00%)		0,003
4 infusões	0	1 (7,14%)	0	1 (7,14%)	0	1 (7,14%)	1 (7,14%)	0		
3 infusões	2 (14,29%)	1 (7,14%)	6 (42,86%)	0	0	0	1 (7,14%)	1 (6,67%)		
2 infusões	5 (35,71%)	0	1 (6,67%)	1 (7,14%)	0	1 (7,14%)	0	2 (13,33%)		
1 infusões	1 (7,14%)	0	0	0	0	0	0	0		
0 infusões	0	0	0	0	0	0	0	0		

^a Os pacientes apenas são contabilizados uma vez para o primeiro grupo para o qual apresentaram qualificações (5 infusões > 4 infusões > etc...). Apenas se contam os pacientes que fizeram as infusões completas.

Os resultados para medidas das contagens de articulações inchadas e amolecidas e as avaliações globais do médico e dos pacientes são apresentados nas Figuras de 1 a 4. Os resultados da mediana nas Figuras de 1 a 4 foram observados para cada uma das visitas de avaliação baseados apenas nos pacientes com dados recolhidos. Quer dizer, não foi utilizada uma aproximação em que se utilizava o valor da última observação como válido na avaliação seguinte nos pacientes que desistiram. Em vez disso, o número de pacientes com dados que dão origem a cada um dos pontos nos gráficos foi apresentado no fundo das figuras.

Apesar do número de pacientes que desistiram no grupo do placebo e no grupo de 1 mg/kg que não recebiam metotrexato, os resultados nas Figuras de 1 a 4 demonstram que o tratamento com cA2 em combinação com o metotrexato reduz profundamente a atividade da doença para todas as medidas tradicionais de atividade da doença, chegando em muitos pacientes próximo da remissão completa.

Os resultados para um marcador do soro vulgarmente usado para a atividade inflamatória, a proteína C-reativa (CRP) são apresentados na Figura 5. O tratamento com o cA2 originou uma diminuição rápida da concentração de CRP que se manteve através das 26 semanas nos pacientes que receberam 3 ou 10 mg/kg de cA2.

Os resultados para o Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ) são apresentados na Figura 6. Esta medida de qualidade de vida/inaptidão demonstrou uma melhoria em função do tempo correspondente com a melhoria clínica observada nos pacientes tratados com cA2. O HAQ diminuiu de 2,0 à partida para 1,1 às 22 semanas nos pacientes tratados

com 3 mg/kg de cA2 e metotrexato.

Farmacocinética do cA2

Foram obtidas concentrações de cA2 no soro em todos os pacientes deste estudo. A concentração no soro em cada um dos pacientes ao longo do tempo é apresentada de acordo com a dose do grupo de cA2 na Figura 7. Os dados apresentados são as concentrações de cA2 no soro obtidas imediatamente antes da administração de cA2 às 2, 6, 10 e 14 semanas e depois às 18 e 26 semanas. Estes tempos de amostragem foram selecionados para melhor demonstrar a estabilidade da concentração de cA2 durante o regime de dose múltipla e o declínio da concentração de cA2 no soro depois da última dose ter sido administrada. Para os propósitos de apresentação dos dados, as escalas das concentrações de cA2 são condensadas para cada um dos gráficos à medida que a dose de cA2 foi aumentada.

Foram observadas diferenças substanciais em função do tempo para a concentração no soro de cA2 nos grupos de dose de 1mg/kg de acordo com se os pacientes receberam ou não metotrexato. A maioria dos pacientes que recebem 1 mg/kg de cA2 com o metotrexato apresentava concentrações de cA2 mensuráveis através de 18 semanas, embora seja aparente uma tendência para a concentração diminuir em função do tempo. Em grande contraste, a maioria de pacientes que receberam 1 mg/kg de cA2 sem receberem o metotrexato não foram capazes de manter concentrações de cA2 no soro mensuráveis em função do tempo. Tal como é aqui discutido, a falta de capacidade para manter o cA2 no soro destes pacientes foi associada a uma elevada velocidade de formação de anticorpo neutralizante.

Em contraste com os grupos de 1 mg/kg, os pacientes que receberam ou 3 mg/kg de cA2 ou 10 mg/kg de cA2 conseguiram manter concentrações de cA2 no soro ao longo do regime de doses múltiplas. No entanto, até mesmo nesses grupos de dosagem, existiam provas que o tratamento concomitante com o metotrexato estava associado a concentrações de cA2 no soro elevadas. Tal como é apresentado na Figura 8, a concentração mediana de cA2 no soro mediana em ambos os grupos com a dose de 3 e de 10 mg/kg e que recebiam metotrexato, era mais alta do que nos grupos correspondentes que não recebiam metotrexato.

As respostas imunitárias ao cA2

Foram recolhidas amostras de soro durante as 26 semanas de todos os pacientes e foram analisadas quanto aos anticorpos anti-quiméricos humanos (HACA) para o cA2. Os resultados para as respostas de HACA para cada um dos grupos de tratamento de cA2 são apresentados na Tabela 6. Deve ser salvaguardado que em vários pacientes do grupo de 3 mg/kg e na maioria dos pacientes do grupo de 10 mg/kg, o cA2 estava ainda presente na amostra das 26 semanas e poderia potencialmente ter interferido com a deteção de HACA no ensaio. No entanto, também poderia ser argumentado que se estavam presentes anticorpos neutralizantes às 26 semanas, então o cA2 não deveria estar presente. Deste modo, na apresentação dos dados da Tabela 6, os resultados para a velocidade de resposta imunitária são apresentados não incluindo os pacientes com cA2 no soro a 26 semanas e incluindo os pacientes com cA2 no soro a 26 semanas, assumindo que se o cA2 estava presente às 26 semanas, o paciente não tinha uma resposta de HACA positiva.

TABELA 6 Respostas de HACA

	1 mg/kg		3 mg/kg		10 mg/kg	
	MTX +	MTX -	MTX +	MTX -	MTX +	MTX -
Respostas de HACA não incluindo os pacientes com cA2 no soro às 26 semanas	2/13 (15,4%)	8/15 (53,3%)	0/10 (0%)	3/12 (25,0%)	0/2 (0%)	1/10 (10%)
Respostas ao HACA incluindo os pacientes com cA2 no soro às 26 semanas ¹	2/13 (15,4%)	8/15 (53,3%)	0/15 (0%)	3/14 (21,4%)	0/14 (0%)	1/15 (6,7%)
¹ Os pacientes com uma concentração de cA2 no soro mensurável após 26 semanas, foram considerados negativos no que respeita à resposta ao HACA para esta análise.						

Os resultados da Tabela 6 demonstram que o tratamento conjunto com o metotrexato suprime a resposta imunitária ao cA2, o que permite a obtenção de uma farmacocinética estável num regime de doses múltiplas de cA2. Este efeito também foi encontrado após um tratamento combinado com anticorpos anti-TNF/anti-CD4 em ratos com uma artrite induzida pelo colagénio e descrita no Pedido de Patente US N.º 6,270,766, pedido a 28 de fevereiro de 1996, cujas aprendizagens são aqui inteiramente incorporadas por referência.

Segurança Clínica

Dois de 86 dos pacientes (com a maior parte dos pacientes tendo recebido 5 tratamentos) sofreram reações de multissistema relacionadas com a infusão após o tratamento. As reações de multissistema relacionadas com a infusão incluíam dores de cabeça, febre, rubor facial, pruridos, mialgias, náuseas, apertos no peito, dispneia, vômitos, eritemas, desconforto abdominal, diaforese, arrepios, hipertensão, tonturas, hipotensão, palpitações e sonolência.

As reações de hipersensibilidade, tal como foram aqui descritas, podem ocorrer sempre que são administradas substâncias que contêm proteínas, tal como a cA2. Deste modo não é claro se estes sintomas representam um acontecimento imunológico ou fatores físicos tais como a velocidade de infusão e a agregação de imunoglobulina. Os investigadores comunicaram que os referidos sintomas se resolveram em alguns dos pacientes com a diminuição da velocidade da infusão. A literatura pré existente indica que os sintomas vasomotores têm sido observados em pacientes que recebem uma terapia de imunoglobulina intravenosa (Berkman, *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 112; 278-292 (1990); Ochs *et al.*, *Lancet* 2: 1158-1159 (1980)).

Um paciente desenvolveu hipotensão durante todas as três infusões de 10 mg/kg de cA2. O paciente não apresentava sinais clínicos de hipotensão e não necessitava de tratamento médico, mas atendendo aos critérios de segurança previamente definidos, o plano de tratamento deste paciente foi descontinuado.

Um paciente tratado com 3 infusões de 10 mg/kg de cA2 e com 7,5 mg/semana de metotrexato, desenvolveu sintomas de septicémia como resultado de uma pneumonia por estafilococos 2 semanas depois da sua última visita do estudo e 14 semanas depois da sua última infusão com o cA2. Seis dias depois de ter desenvolvido os sintomas foi admitido no hospital e foi tratado. Morreu um dia depois. (Esta paciente não tinha prosseguido com a quarta infusão por razões não ligadas à septicémia.) Os pacientes com RA que desenvolvem infeções apresentam resultados piores do que os esperados. Wolfe e a sua equipa descreveram uma razão entre observado:esperado para morte devido a

pneumonia de 5,307 e uma razão entre observado:esperado para morte devido a infecções (excluindo a pneumonia) de 6,213 para os pacientes com RA a partir da base de dados da ARAMIS (Wolfe *et al.* Arthritis Rheumatism 4: 481-494 (1994)).

Um paciente desenvolveu uma infecção pós-operatória grave após uma cirurgia às cataratas 9 semanas depois da quinta e última infusão de 3 mg/kg de cA2 (com 7,5 mg/semana de metotrexato), o que levou à remoção do olho. Este paciente estava a receber prednisolona (7 mg/dia). A incidência de endoftalmite depois da extração de cataratas tem sido relatada como estando entre 0,072 e 0,093 % (Kattan *et al.*, Ophthalmology 98 (9): 1147-1148 (1991)) e pode ser mais pesada em pacientes que estejam a receber uma terapia de corticosteróides

Oito de 87 pacientes (9 %) desenvolveram anticorpos de (ds)-DNA de cadeia dupla após as múltiplas infusões de cA2. Foram feitas observações à partida, e nas semanas 8, 16 e 26 (12 semanas após a última infusão). Nestes pacientes com os anticorpos contra o ds-DNA, existia uma tendência para um nível mais baixo de anticorpos na última avaliação, com dois dos pacientes sendo negativos.

Um paciente desenvolveu dispneia, uma dor no tórax pleurítica e um retorno da atividade da artrite na semana 14 do estudo (quatro semanas depois da quarta infusão de 3 mg/kg de cA2). Os sintomas foram eliminados e ela recebeu a sua quinta dose de cA2. Os sintomas reapareceram 3 semanas depois. O exame da série de amostras de sangue revelou que o teste quanto a anticorpos antinucleares e anti anticorpos ds-DNA eram negativos antes do tratamento, mas ficaram

positivos na semana 6 do estudo. Os sintomas do paciente responderam a uma administração diária de prednisolona de 20 a 30 mg por via oral. O diagnóstico da altura foi lúpus eritematoso disseminado (SLE). O paciente correntemente não apresenta sintomas de SLE mas apresenta uma RA ativa.

Até agora, embora tenham sido detetados anticorpos para com o ds-DNA em pacientes tratados com o cA2, estes representam geralmente aumentos passageiros e apenas um paciente foi sintomático. Em pacientes que tiveram um acompanhamento suficiente, os anticorpos anti ds-DNA acabaram por se resolver com a descontinuação do tratamento.

Para resumir, o tratamento com o cA2 é bem tolerado. As reduções na atividade da doença produzida pelo cA2 são significativas tal como é suportado pelas observações feitas que relatam uma baixa velocidade de resposta do placebo. São obtidas taxas de resposta clínica elevadas com um regime de dose múltipla de 3 mg/kg de cA2 em combinação com 7,5 mg/semana de metotrexato, e pode ser continuada durante 26 semanas. Este regime de dosagem é considerado preferível ao regime de 1 mg/kg mais metotrexato porque é obtida uma melhor farmacocinética, não foi detetada virtualmente nenhuma resposta imunitária e a resposta clínica é melhor mantida contínua após o último tratamento com o cA2. O benefício clínico obtido aumentando o regime de dose para 10 mg/kg de cA2 mais metotrexato é semelhante ao observado para o regime de 3 mg/kg de cA2 metotrexato.

Deste modo, os resultados deste estudo indicam que o tratamento feito com um regime de doses múltiplas de cA2 como terapia adjuvante e/ou concomitante à terapia feita com o metotrexato, em pacientes de RA cuja doença é

incompletamente controlada pelo metotrexato, produz uma resposta clínica altamente benéfica ou sinérgica, a qual pode ser mantida durante 26 semanas. O benefício produzido pelo cA2 excede normalmente reduções de 50 % nas medidas tradicionais da artrite reumatóide (articulações inchadas e amolecidas, avaliações de doença globais do paciente e do médico) e consegue uma remissão clínica em muitos pacientes. De acordo com o referido, os resultados deste estudo indicam que o tratamento com infusões múltiplas de cA2 como terapia adjuvante e/ou concomitante à terapia com o metotrexato é uma aproximação terapêutica importante e eficaz para tratar a RA em pacientes.

EXEMPLO 2 Tratamento clínico de artrite reumatóide através de uma única infusão de um anticorpo anti TNF em pacientes que estão a receber metotrexato

Foi conduzido um estudo aleatório, duplo-cego, com o efeito placebo controlado para avaliar os efeitos de uma única infusão de placebo, de 5, de 10 ou de 20 mg/kg de cA2 em combinação com o metotrexato, administrado numa dose de 10 mg/semana, no tratamento de artrite reumatóide (RA) em pacientes.

Pacientes

Vinte e oito (28) dos pacientes de RA de três centros nos Estados Unidos os quais, apesar de terem recebido três meses de terapia com metotrexato administrado numa dose estável de 10 mg/semana durante pelo menos 4 semanas antes da avaliação, ainda apresentavam a doença ativa de acordo com os critérios da Faculdade de Reumatologia Americana, foram selecionados para o estudo. A doença ativa foi definida pela presença de seis ou mais articulações inchadas mais, pelo menos, três de quatro critérios

secundários (duração da rigidez matutina ≥ 45 minutos; ≥ 6 articulações amolecidas ou dolorosas; velocidade de sedimentação dos eritrócitos (ESR) ≥ 28 mm/hora; proteína C-reativa (CRP) ≥ 20 mg/l).

Aos pacientes que estavam a receber NSAID e corticosteróides (prednisona) na altura da avaliação, foi-lhes permitido que continuassem com doses estáveis (7,5 mg/dia).

As Infusões do Estudo

O anticorpo anti-TNF monoclonal quimérico (cA2) foi disponibilizado na forma de uma solução estéril que continha 5 mg de cA2 por cada ml de uma solução de soro fisiológico 0,01 M com tampão de fosfato em 0,15 M de cloreto de sódio com 0,01 % de polisorbato 80, a pH 7,2. Os frascos de placebo continham 0,1 % de albumina do soro humano na mesma solução tampão. Antes de ser utilizada, a quantidade apropriada de cA2 ou de placebo foi diluída a 300 ml em soro fisiológico estéril pelo farmacêutico, e foi administrada por via intravenosa por um filtro de 0,2 μ m em linha, durante 2 horas. As características dos sacos de placebo e da infusão de cA2 eram idênticas, e os investigadores e os pacientes não sabiam qual a infusão que estava a ser administrada.

Avaliações

Os pacientes foram aleatoriamente divididos em um a quatro grupos de tratamento (7 pacientes por grupo). Cada um dos 28 pacientes recebeu uma dose única de 0, 5, 10 ou 20 mg/kg de cA2 e foram seguidos durante 12 semanas. Os pacientes continuaram o tratamento com o metotrexato (Pharmacochemie, Holanda) administrado a 10 mg/semana durante todo o tempo

do estudo. Os pacientes foram observados quanto a eventos adversos durante as infusões e regularmente depois disso através de entrevistas, de exames físicos e de testes de laboratório.

A medida primária da resposta clínica foi definida pela definição preliminar de resposta do ACR (Felson *et al.*, *Arthritis Rheumatism* 38(6):727-735 (1995)). Foi considerado que os pacientes tinham dado resposta se estes apresentassem uma redução de 20 % na contagem das articulações inchadas e amolecidas, e tinham sofrido uma redução de 20 % em 3 das 5 avaliações seguintes: a avaliação da dor do paciente (VAS), a avaliação global do paciente da atividade da doença (VAS), a avaliação global do médico da atividade da doença (VAS), a avaliação do paciente das funções físicas (HAQ), e um reagente da fase aguda (ESR). A ESR foi medida em cada um dos locais do estudo com um método padrão (Westergen).

Foram feitas as avaliações no dia 3, e nas semanas 1, 2, 4, 6, 8, 10, e 12.

Resultados

Os 28 pacientes foram aleatoriamente colocados nos grupos de tratamento (ou de dose) de um a quatro.

As taxas de resposta clínica em função do tempo pelo critério de 20 % do ACR, em cada dos grupos de tratamento, são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 Taxa de resposta clínica (pelo critério de 20 % do ACR) em pacientes que estavam a receber 10 mg/kg de metotrexato

Pacientes avaliados	Placebo	Dose de cA2			Pacientes tratados com cA2
		5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	
	7	7	7	7	21
Pacientes com qualquer resposta	1 (14,3%)	6 (85,7%)	5 (71,4%)	6 (85,7%)	17 (81,0%)
1 semanas	0 (0,0%)	4 (57,1%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	11 (52,4%)
2 semanas	0 (0,0%)	4 (57,1%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)	14 (66,7%)
4 semanas	1 (14,3%)	3 (42,9%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)	13 (61,9%)
6 semanas	0 (0,0%)	3 (42,9%)	5 (71,4%)	4 (57,1%)	12 (57,1%)
8 semanas	1 (14,3%)	3 (42,9%)	4 (57,1%)	4 (57,1%)	11 (52,4%)
10 semanas	1 (14,3%)	1 (14,3%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	8 (38,1%)
12 semanas	1 (14,3%)	2 (28,6%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	9 (42,9%)

Os benefícios clínicos do tratamento com o cA2 eram evidentes na primeira visita de avaliação depois de uma semana. Embora cada uma das 3 doses de cA2 tivesse produzido respostas clínicas na maioria dos pacientes tratados, a duração da resposta clínica pareceu ser melhor mantida ao longo das 12 semanas nos grupos que receberam 10 ou 20 mg/kg do cA2. A resposta clínica foi conseguida de um modo muito mais frequente entre os pacientes que receberam o cA2 do que os do grupo de placebo. Ou seja, 17/21 dos pacientes (81 %) nos 3 grupos de cA2 apresentaram resposta clínica, quando comparados a apenas 1/7 pacientes (14 %) do grupo tratado com placebo. A magnitude da resposta clínica foi notável. A contagem média das articulações amolecidas entre os pacientes tratados com o cA2 diminuiu de 30,1 à partida para 13,3 na semana 12, e o CRP médio diminuiu de 3,0 à partida para 1,1 na semana 12.

A duração da resposta clínica aparenta ser dependente da dose. 2/6 (33 %) dos pacientes tratados com 5 mg/kg de cA2 e que apresentaram resposta, mantinham essa resposta durante as 12 semanas em que decorreu o estudo, quando comparados a 7/11 (64 %) dos pacientes que receberam 10 ou

20 mg/kg e que apresentaram resposta. O tratamento em todos os grupos foi geralmente bem tolerado.

Como resumo, os resultados deste estudo indicam que o tratamento com o cA2 como terapia adjuvante e/ou concomitante à terapia com o metotrexato é eficaz na redução dos sinais e dos sintomas da artrite reumatóide em pacientes cuja doença não é completamente controlada pelo metotrexato individualmente. Para além do referido, a resposta clínica conseguida por esta aproximação pode ser mantida durante mais de 12 semanas depois de ter sido administrado um único tratamento. De acordo com o referido, os resultados deste estudo indicam que o tratamento com o cA2 como terapia adjuvante e/ou concomitante à terapia com o metotrexato é uma aproximação terapêutica importante e eficaz para tratar a RA em pacientes.

EXEMPLO 3 Tratamento clínico da artrite reumatóide por administração de dose repetida de um anticorpo anti-TNF em pacientes após uma experiência controlada com placebo, de duplo-cego, de dose única

Um estudo aberto foi conduzido de modo a avaliar os efeitos de repetidas infusões de 10 mg/kg de cA2 em combinação com o metotrexato, administrado numa dose de 10 mg/semana, no tratamento de artrite reumatóide em pacientes.

Pacientes

Foi conduzido um estudo sobre o cA2, de 12 semanas, aleatório, duplo-cego, com o efeito placebo controlado, tal como descrito no Exemplo 2, em pacientes de RA que apresentavam a doença ativa mesmo apesar de ter sofrido três meses de terapia com metotrexato administrado numa dose estável de 10 mg/semana durante pelo menos 4 semanas

antes da avaliação.

Na semana 12, os pacientes que tinham completado o período de avaliação de 12 semanas e não tinham sofrido eventos adversos que proibissem infusões adicionais de cA2, receberam 3 infusões subsequentes, de rótulo à vista, de cA2, administradas numa dose de 10 mg/kg, a intervalos de oito semanas (semanas 12, 20 e 28). Vinte e três (23) dos pacientes do estudo de 12 semanas foram envolvidos neste estudo.

Avaliações

Foram avaliados 11/23 pacientes que entraram neste estudo de rótulo à vista em 1 dos 3 centros nos Estados Unidos e foram seguidos até às 40 semanas depois da entrada inicial. Os pacientes continuaram o tratamento com o metotrexato administrado a 10 mg/semana ao longo de todo o estudo. Os tratamentos repetidos com cA2 foram, de um modo geral, bem tolerados. Três dos pacientes apresentaram sintomas passageiros relacionados com infusão (urticária e sonolência).

A medida primária da resposta clínica foi definida pela definição preliminar de resposta do ACR (Felson et al., *Arthritis Rheumatism* 38 (6): 727-735 (1995)). Foi considerado que os pacientes tinham dado resposta se estes apresentassem uma redução de 20% na contagem das articulações inchadas e amolecidas, e tinham sofrido uma redução de 20 % em 3 das 5 avaliações seguintes: avaliação da dor do paciente (VAS), avaliação global da atividade da doença do paciente (VAS), avaliação global da atividade da doença pelo médico (VAS), avaliação das funções físicas do paciente (HAQ), e um reagente da fase aguda (ESR). A ESR

foi medida em cada um dos locais do estudo com um método padrão (Westergen).

Resultados

De todos os seis pacientes que receberam o cA2 durante o estudo de duplo-cego descrito no Exemplo 2 e que responderam durante as 12 semanas daquele estudo, quatro pacientes mantiveram uma resposta ao longo do período de 40 semanas em que foram seguidos. Dos dois pacientes que restaram, um paciente ainda apresentou resposta ao longo da semana 28, e um paciente entrou recentemente neste ensaio de rótulo à vista. Para todos os 4 pacientes que completaram as 40 semanas em que foram seguidos, e para o paciente da semana 28, as contagens das articulações amolecidas foram iguais a 2 e as das articulações inchadas foram iguais a 1, quando comparadas a uma média de 23 e de 29, respetivamente, à entrada no ensaio duplo-cego descrito no Exemplo 2. Para 4 destes 5 pacientes, a ESR era de 18 mm/h e a CRP de 0,7, quando comparadas com a média de 27 e 3,9, respetivamente, à entrada no estudo de duplo-cego descrito no Exemplo 2.

Dos dois pacientes, em que ambos tinham recebido cA2 durante o estudo duplo-cego descrito no Exemplo 2 e que apenas responderam até à semana 10 daquele estudo, um paciente respondeu ao longo de 36 semanas e o outro paciente ainda apresenta resposta ao longo da semana 20.

Dos três pacientes que não responderam durante o estudo duplo-cego descrito no Exemplo 2 (2 que receberam placebo e 1 que recebeu 5 mg/kg de cA2), dois destes pacientes apresentaram uma resposta clínica passageira, e um paciente ainda apresenta resposta ao longo da semana 20.

Em resumo, os resultados preliminares deste estudo sugerem que uma terapia repetida com cA2, adjuvante e/ou concomitante, em pacientes de RA cuja doença não é completamente controlada pelo metotrexato, pode resultar numa significativa melhoria clínica para uma maioria dos pacientes. Para além disso, a resposta clínica conseguida por esta aproximação pode manter-se durante até 40 semanas de acompanhamento. Em concordância com o referido, os resultados deste estudo indicam que um tratamento repetido com cA2 como terapia adjuvante e/ou terapia concomitante à terapia com o metotrexato é uma aproximação terapêutica importante e eficaz para tratar a RA em pacientes.

Formas de realização da invenção podem incluir as características mencionadas nos itens enumerados que se seguem.

1. Método para tratar ou prevenir uma doença mediada pelo fator de necrose tumoral num indivíduo com necessidade disso, compreendendo a coadministração de metotrexato e de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral ou um seu fragmento ao referido indivíduo, em quantidades terapêuticamente eficazes.
2. Um método do item 1, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral e o metotrexato são administrados simultaneamente.
3. Um método do item 1, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral e o metotrexato são administrados sequencialmente.
4. Um método do item 1, em que a doença mediada pelo fator

de necrose tumoral é selecionada a partir do grupo que consiste em: doença autoimune, doença imune aguda ou crónica, doença inflamatória e doença neurodegenerativa.

5. Um método do item 4, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é administrado em doses múltiplas.
6. Um método do item 5, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo quimérico.
7. Um método do item 6, em que o anticorpo quimérico se liga a um ou mais aminoácidos de hTNF α , selecionado de entre o grupo que consiste em perto de 87-108 e em perto de 59-80.
8. Um método do item 6, em que o anticorpo quimérico se liga ao determinante antigénico reconhecido pelo cA2.
9. Um método do item 8., em que o anticorpo quimérico é o cA2.
10. Método para o tratamento ou prevenção da artrite reumatóide num indivíduo com necessidade disso, compreendendo a coadministração de metotrexato e de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral ao indivíduo, em quantidades terapêuticamente eficazes.
11. Um método do item 10, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral e o metotrexato são administrados simultaneamente.
12. Um método do item 10, em que o anticorpo anti-fator de

necrose tumoral e o metotrexato são administrados sequencialmente.

13. Um método do item 10, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é administrado em doses múltiplas.
14. Um método do item 13, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo quimérico.
15. Um método do item 14, em que o anticorpo quimérico se liga a um ou mais aminoácidos do hTNF, selecionado de entre o grupo que consiste em perto de 87-108 e em perto de 59-80.
16. Um método do item 14, em que o anticorpo quimérico se liga ao determinante antigénico de cA2.
17. Um método do item 16, em que o anticorpo quimérico é cA2.
18. Um método para o tratamento ou prevenção da doença de Crohn num indivíduo com necessidade disso, compreendendo a coadministração de metotrexato e de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral ao referido indivíduo, em quantidades terapêuticamente eficazes.
19. O método do item 18, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral e o metotrexato são administrados simultaneamente.
20. O método do item 18, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral e o metotrexato são administrados sequencialmente.

21. Um método do item 18, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é administrado em doses múltiplas.
22. Um método do item 21, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo quimérico.
23. Um método do item 22, em que o anticorpo quimérico se liga a um ou mais aminoácidos do hTNF alfa, selecionado de entre o grupo que consiste em perto de 87-108 e em perto de 59-80.
24. Um método do item 22, em que o anticorpo quimérico se liga ao determinante antigénico reconhecido de cA2.
25. Um método do item 22, em que o anticorpo quimérico é cA2.
26. Uma composição compreendendo metotrexato e um anticorpo anti-fator de necrose tumoral ou um seu fragmento.
27. Uma composição do item 26, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo quimérico.
28. Uma composição do item 27, em que o anticorpo quimérico se liga a um ou mais aminoácidos do hTNF, selecionado de entre o grupo que consiste em cerca de 87-108 e cerca de 59-80.
29. Uma composição do item 27, em que o anticorpo quimérico se liga ao determinante antigénico pelo cA2.
30. Uma composição do item 29, em que o anticorpo

quimérico é o cA2.

31. Um método para tratar ou prevenir uma doença mediada pelo fator de necrose tumoral num indivíduo com necessidade disso, compreendendo a coadministração de metotrexato e de um antagonista do fator de necrose tumoral ao indivíduo, em quantidades terapêuticamente eficazes.
32. Uso de metotrexato e de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral ou de um seu fragmento para a produção de medicamentos administráveis de modo simultâneo ou sequencial, para tratar ou prevenir uma doença mediada pelo fator de necrose tumoral num indivíduo.
33. O uso do item 32, para o tratamento de doenças mediadas pelo fator de necrose tumoral, selecionadas de entre doença autoimune, doença imune aguda ou crônica, doença inflamatória e doença neurodegenerativa.
34. Uso de metotrexato e de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral para a produção de medicamentos administráveis de modo simultâneo ou sequencial, para tratar ou prevenir a artrite reumatóide num indivíduo.
35. Uso de metotrexato e de um anticorpo anti-fator de necrose tumoral para a produção de medicamentos administráveis de modo simultâneo ou sequencial, para tratar ou prevenir a doença de Crohn num indivíduo.
36. O uso dos itens 32, 34 ou 35, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo quimérico.

37. O uso dos itens 32, 34 ou 35, em que o anticorpo quimérico se liga a um ou mais aminoácidos do hTNF α , selecionado de entre o grupo que consiste em perto de 87-108 e em perto de 59-80.
38. O uso dos itens 32, 34 ou 35, em que o anticorpo quimérico se liga ao determinante antigénico de cA2.
39. O uso dos itens 32, 34 ou 35, em que o anticorpo quimérico é o cA2.
40. Uso de metotrexato e de um antagonista do fator de necrose tumoral para a produção de medicamentos para tratar ou prevenir uma doença mediada pelo fator de necrose tumoral num indivíduo com necessidade disso.
41. Uso de metotrexato e um o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou um seu fragmento para a produção de medicamentos coadministráveis em separado para tratar uma doença mediada por um fator de necrose tumoral humano num indivíduo, em que o anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou um seu fragmento (a) se liga a um determinante antigénico no fator α de necrose tumoral e (b) inibe a ligação do fator α de necrose tumoral humano aos recetores da superfície celular do fator α de necrose tumoral humanos.
42. O uso do item 41, em que os medicamentos coadministráveis são para uso num regime terapêutico para o tratamento de artrite reumatóide num indivíduo, em que no regime terapêutico, (a) o medicamento contendo metotrexato é para ser administrado

semanalmente, e (b) o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou fragmento de anticorpo contendo o medicamento a ser administrado múltiplas vezes, cada uma das administrações (1) sendo separada por um intervalo de duas a oito semanas a partir da administração anterior, e (ii) aplicação de 10 mg ou menos por kg de peso corporal do indivíduo do anticorpo de fator α de necrose tumoral anti-humano ou um seu fragmento.

43. Uso de um o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou um seu fragmento para a produção de um medicamento para realizar uma terapia adjuvante com metotrexato num indivíduo que sofre de artrite reumatóide e que recebeu semanalmente um medicamento contendo metotrexato, em que na terapia adjuvante o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou o fragmento de anticorpo contendo o medicamento é para ser administrado ao indivíduo várias vezes, cada uma das administrações (i) sendo separada por um intervalo de duas a oito semanas a partir da administração anterior, e (ii) aplicar 10 mg ou menos por kg de peso corporal do indivíduo d o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou um seu fragmento.

44. O uso do item 43, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral "alfa" humano ou um fragmento deste (a) se liga a um determinante antigénico no fator de necrose tumoral "alfa" humano e (b) inibe a ligação do fator de necrose tumoral "alfa" a recetores do fator de necrose tumoral "alfa" à superfície da célula.

45. O uso de qualquer dos itens 41-44, em que cada

administração do medicamento contendo metotrexato aplica 7,5 mg ou mais de metotrexato; opcionalmente, em que cada administração do medicamento contendo metotrexato aplica 10 mg ou mais de metotrexato; e ainda opcionalmente em que cada administração do medicamento contendo metotrexato aplica desde 10 mg até 15 mg de metotrexato.

46. O uso de qualquer dos itens 41, 44, ou 45, em que cada administração do anticorpo anti-fator de necrose tumoral "alfa" humano ou um fragmento de anticorpo contendo o medicamento aplica 10 mg ou menos por kg de peso corporal do indivíduo anticorpo monoclonal fator de necrose tumoral α anti-humano ou um seu fragmento; e opcionalmente em que cada administração do anticorpo anti-fator de necrose tumoral "alfa" humano ou fragmento de anticorpo contendo o medicamento aplica 3 mg por kg ou menos de peso corporal do indivíduo o anticorpo anti-fator de necrose tumoral "alfa" humano ou um seu fragmento.

47. O uso de qualquer dos itens 41 a 46, em que uma administração anterior do of the anticorpo antifator de necrose tumoral "alfa" ou fragmento de anticorpo contendo o medicamento é separado a partir de um é separado a partir de uma administração posterior por:

- (a) um intervalo de duas a quatro semanas; ou
- (b) um intervalo de duas semanas; ou
- (c) um intervalo de quatro semanas.

48. O uso de qualquer dos itens 41-47, em que cada administração do anticorpo anti-fator de necrose

tumoral "alfa" humano ou um fragmento de anticorpo contendo o medicamento (a) aplica 10 mg por kg de peso corporal do indivíduo anticorpo anti-fator de necrose tumoral "alfa" humano ou um seu fragmento, e (b) é separado por um intervalo de quatro até oito semanas a partir da administração anterior.

49. Uso de metotrexato e de um recetor de fator α de necrose tumoral humano solúvel ou um fragmento funcional deste para a produção de medicamentos coadministráveis em separado para o tratamento de uma doença mediada por fator de necrose tumoral num indivíduo, em que o recetor de fator α de necrose tumoral humano solúvel ou um fragmento funcional deste (a) se liga a um determinante antigénico no fator de necrose tumoral α e (b) inibe a ligação do fator de necrose tumoral "alfa" a recetores do fator de necrose tumoral "alfa" à superfície da célula.
50. O uso de qualquer item 49, em que o recetor de fator de necrose tumoral α humano solúvel p75 é uma célula multimérica.
51. O uso de qualquer dos itens 49 ou 50, o recetor de fator de necrose tumoral α humano solúvel é:
- (a) uma proteína de fusão imunorecetora de fator de necrose tumoral α solúvel; e/ou
 - (b) o recetor p55 ou p75; e/ou
 - (c) uma proteína de fusão recetora de fator de necrose tumoral α p75/lgG.
52. O uso do item 41 a 51, em que a doença mediada por

fator de necrose tumoral é:

(a) uma doença neurodegenerativa, psoríase, ou espondilite anquilosante; ou

(b) uma artrite e em cujo caso é opcionalmente artrite reumatóide ou é selecionada de artrite juvenil crónica, artrite de células gigantes, artrite psoriática, artrite enteropática, artrite reativa e artrite associada a doença inflamatória do intestino; ou

(c) é doença de Crohn; ou

(d) é doença imune aguda ou crónica associada a transplante.

53. O uso de qualquer dos itens 41 a 52, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral α humano ou um seu fragmento é:

(a) um anticorpo; e/ou

(b) um anticorpo quimérico; e/ou

(c) um anticorpo quimérico que se liga a um ou mais aminoácidos do fator de necrose tumoral α selecionado a partir do grupo de aminoácidos consecutivos desde as posições de 87-108 ou até cerca das posições 59-80; e/ou

(d) um anticorpo quimérico que liga o determinante antigénico reconhecido por cA2; e/ou

(e) um anticorpo quimérico o qual é cA2.

54. O uso de qualquer dos itens 41 a 52, em que o anticorpo é um anticorpo de humano.

55. O uso de qualquer dos itens 41 a 54, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa humano ou

fragmento de anticorpo contém o medicamento ou o recetor do fator de necrose tumoral "alfa" solúvel é administrado por infusão.

Lisboa, 27 de Julho de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um antagonista do fator de necrose tumoral para a preparação de um medicamento para o tratamento da artrite reumatóide, da artrite crónica juvenil ou da artrite psoriática, em que o antagonista do fator de necrose tumoral deve ser administrado como terapia adjuvante à com o metotrexato e em que o antagonista do fator de necrose tumoral é
 - i) um anticorpo antifator de necrose tumoral, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral, ou
 - ii) um recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral.
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista do fator de necrose tumoral é um anticorpo de antifator de necrose tumoral, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral.
3. Uso de acordo com a reivindicação 2, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo monoclonal.
4. Uso de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo quimérico.
5. Uso de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo anti-fator de necrose tumoral é um anticorpo humanizado.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1 em que o antagonista do fator de necrose tumoral, ou um fragmento deste, se liga especificamente ao fator de necrose tumoral.
7. Uso de acordo com a reivindicação 6 em que o recetor solúvel ou o fragmento deste compreende uma forma truncada do recetor TNF p55 compreendendo os domínios extracelulares, ou uma forma truncada do recetor TNF p75 compreendendo os domínios extracelulares.
8. Uso de acordo com a reivindicação 6 em que o recetor solúvel ou o fragmento deste é uma molécula multimérica compreendendo todo ou uma parte funcional do domínio extracelular de dois ou mais recetores de TNF ligado via de um ou mais ligantes polipeptídicos.
9. Uso de acordo com a reivindicação 6 em que o recetor solúvel ou o fragmento deste é uma molécula de fusão imunorecetora de TNF, ou o fragmento ou a parte desta, compreendendo pelo menos uma porção de uma ou mais moléculas de imunoglobulina e toda ou uma parte funcional de um ou mais recetores de TNF.
10. Uso de acordo com a reivindicação 1, para o tratamento da artrite reumatóide.
11. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, em que o antagonista de TNF deve ser administrado em doses múltiplas.
12. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, em que o antagonista de TNF deve ser administrado numa dose única.

13. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 12, em que o metotrexato deve ser administrado em doses múltiplas.
14. Uso de acordo com a reivindicação 13, em que o metotrexato deve ser administrado na forma de uma série de doses baixas separadas por intervalos de dias ou semanas.
15. Antagonista do fator de necrose tumoral para uso no tratamento da artrite reumatóide, artrite juvenil crónica, ou artrite psoriática, em que antagonista do fator de necrose tumoral deve ser administrado como terapia adjuvante à terapia com metotrexato e em que o antagonista do fator de necrose tumoral é
 - i) anticorpo antifator de necrose tumoral, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral, ou
 - ii) um recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral.
16. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 15 o qual é anticorpo antifator de necrose tumoral, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral.
17. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 16, o qual é anticorpo antifator de necrose tumoral e é monoclonal.
18. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com

a reivindicação 17, o qual é anticorpo antifator de necrose tumoral e é quimérico.

19. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 17, o qual é anticorpo antifator de necrose tumoral e é humanizado.
20. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 15 o qual é um recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou um fragmento deste, o qual se liga especificamente ao fator de necrose tumoral.
21. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 20 em que o recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou o fragmento deste compreende uma forma truncada do recetor TNF p55 compreendendo os domínios extracelulares, ou uma forma truncada do recetor TNF p75 compreendendo os domínios extracelulares.
22. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 20 em que o recetor de fator de necrose tumoral solúvel, ou o fragmento deste é uma molécula multimérica compreendendo toda ou uma parte funcional do domínio extracelular de dois ou mais recetores TNF ligados através de um ou mais ligantes polipeptídicos.
23. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 20 em que o recetor solúvel ou o fragmento deste é uma molécula de fusão imunorecetora de TNF, ou fragmento ou parte desta, compreendendo pelo menos uma porção de um ou mais moléculas de

imunoglobulina e toda ou uma parte funcional de um ou mais recetores de TNF.

24. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 15, para uso no tratamento da artrite reumatóide.
25. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 24, para administração em doses múltiplas.
26. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 24, para administração numa dose única.
27. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 26, em que o metotrexato deve ser administrado em doses múltiplas.
28. Antagonista do fator de necrose tumoral de acordo com a reivindicação 27, em que o metotrexato deve ser administrado na forma de uma série de doses baixas separadas por intervalos de dias ou semanas.

Lisboa, 27 de Julho de 2012

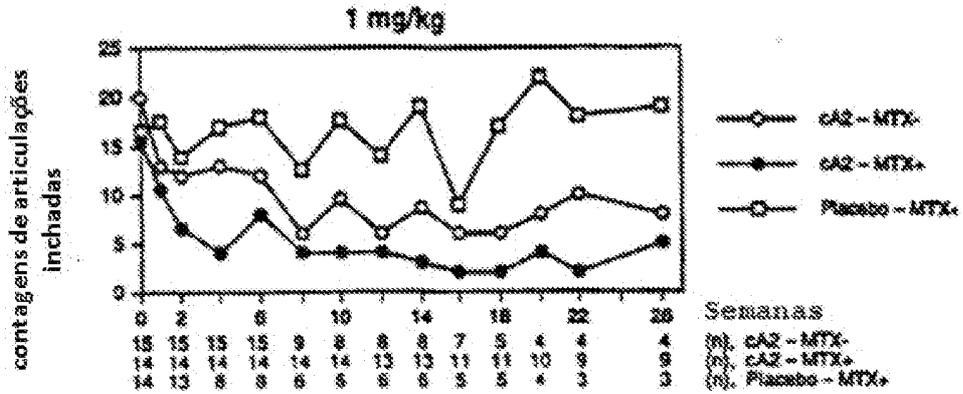


Figura 1A

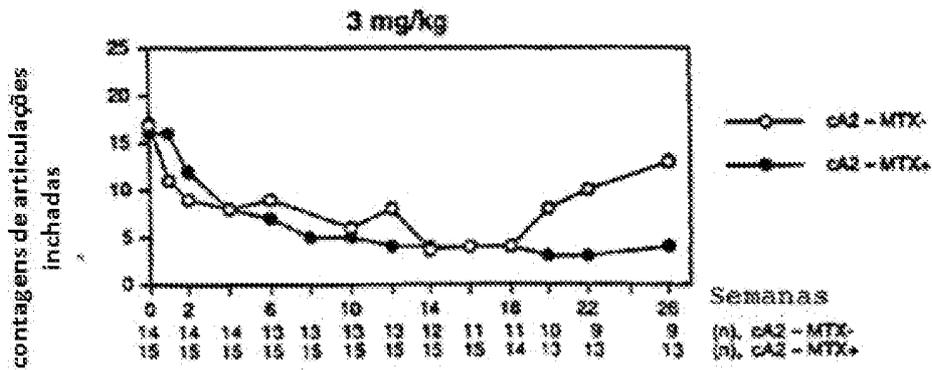


Figura 1B

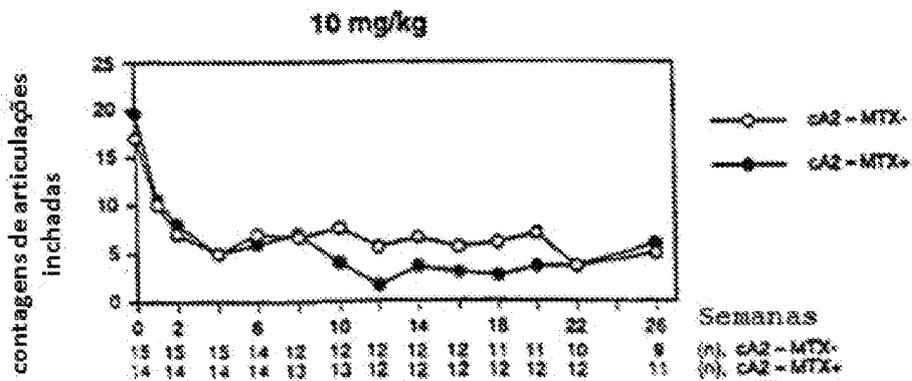


Figura 1C

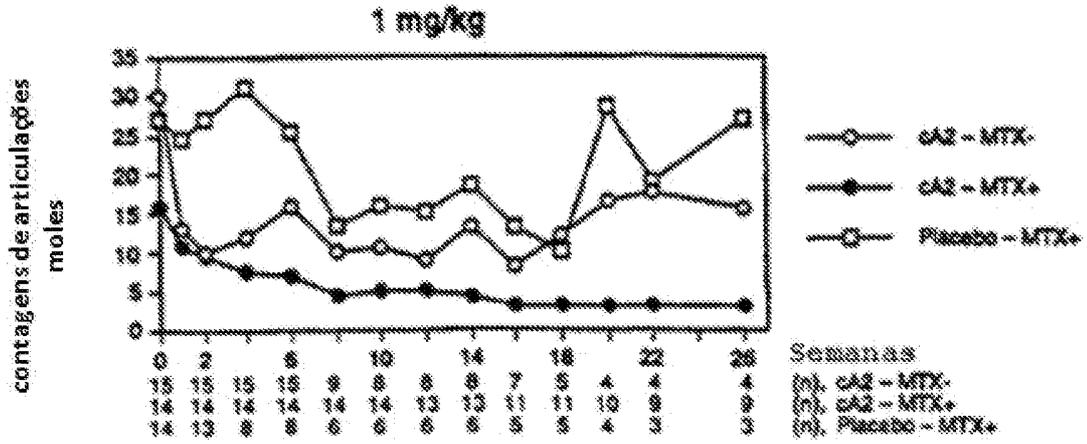


Figura 2A

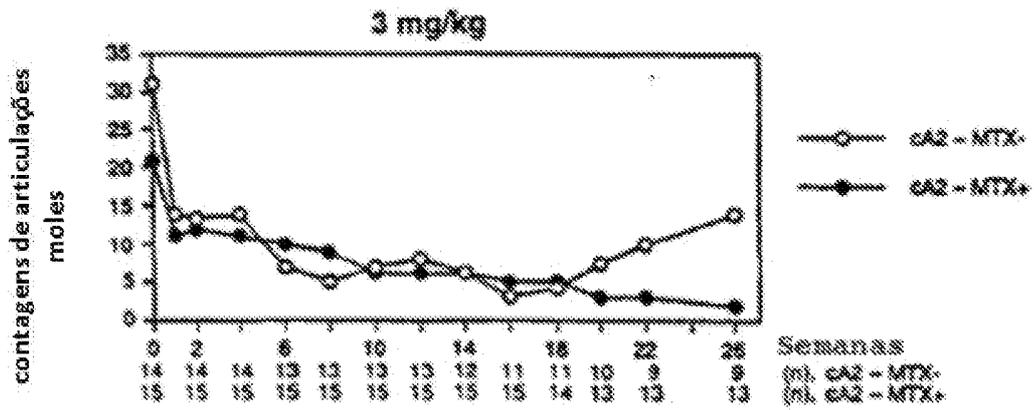


Figura 2B

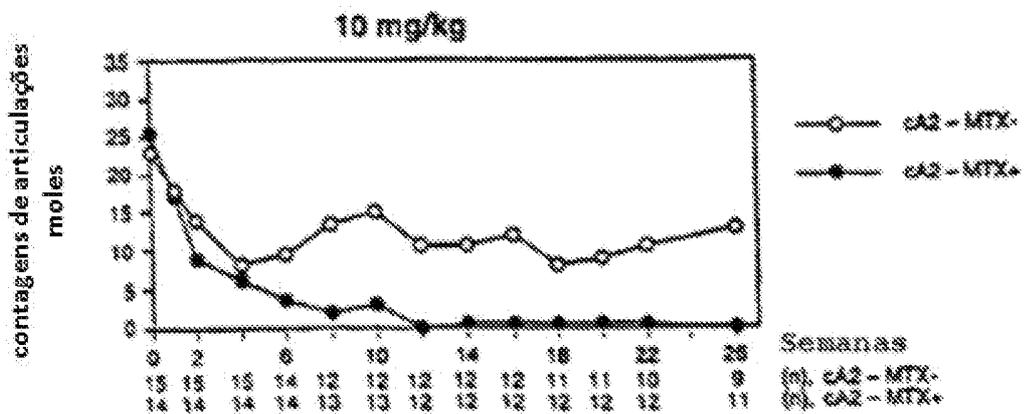


Figura 2C

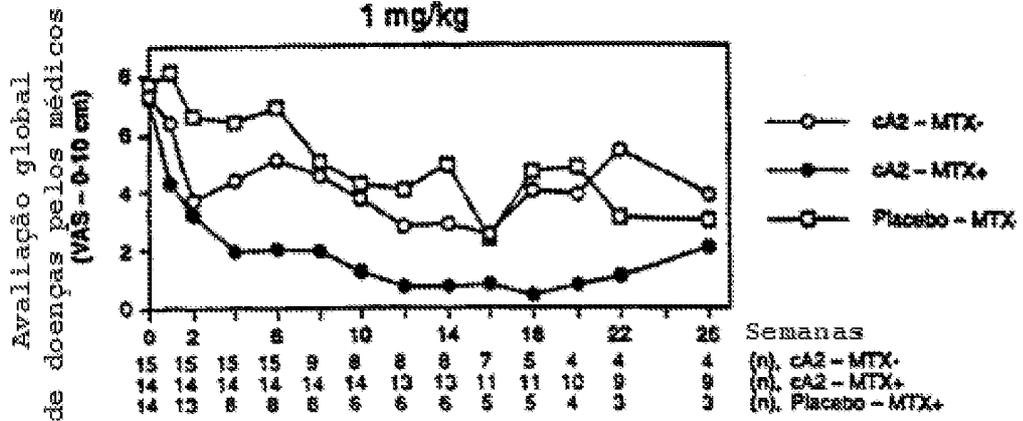


Figura 3A

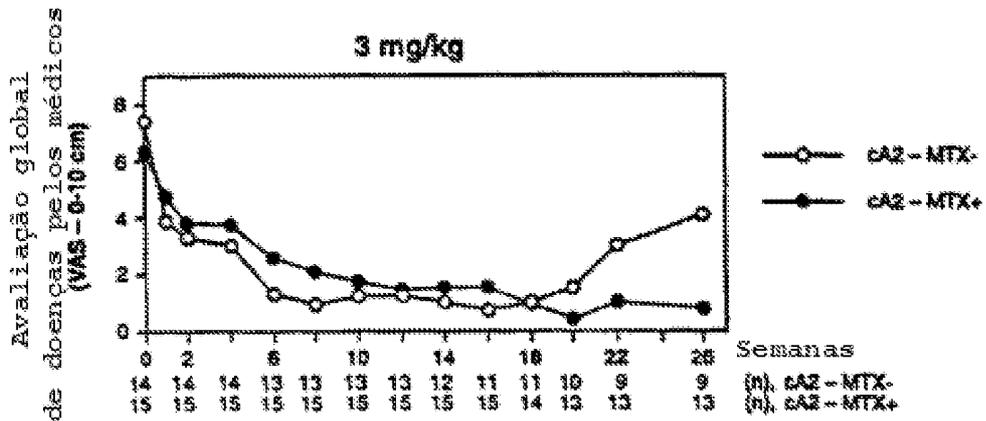


Figura 3B

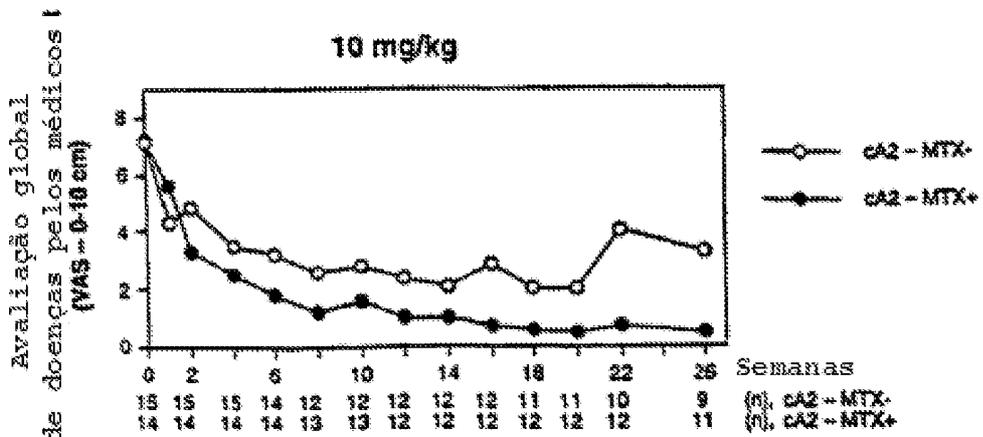


Figura 3C

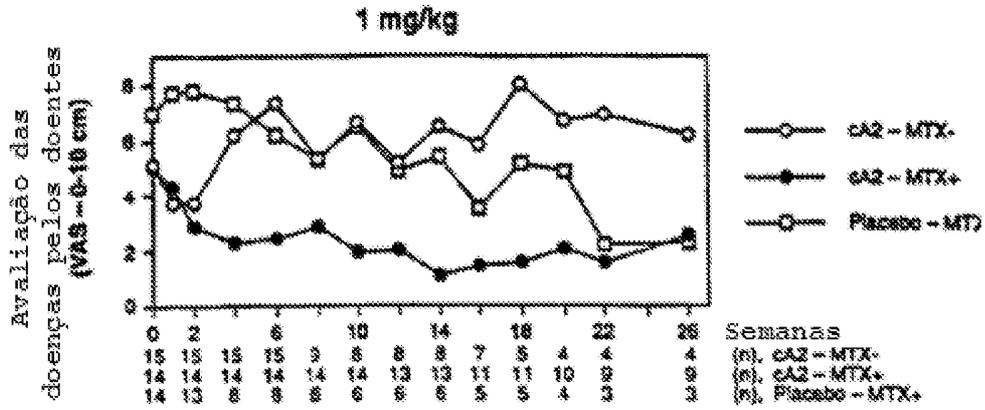


Figura 4A

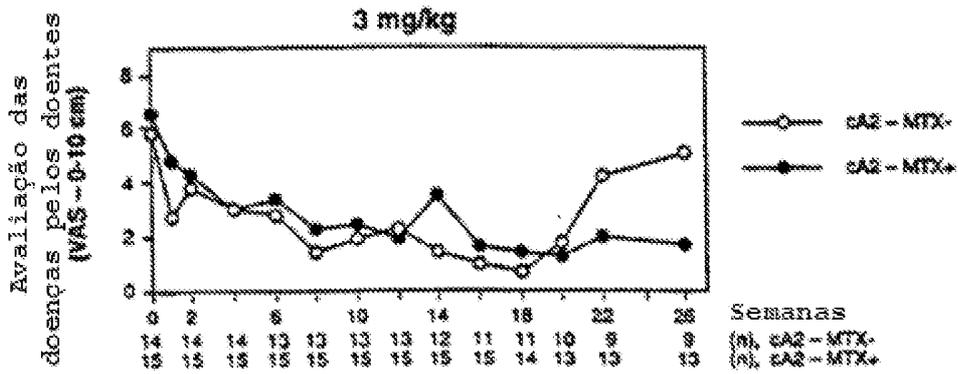


Figura 4B

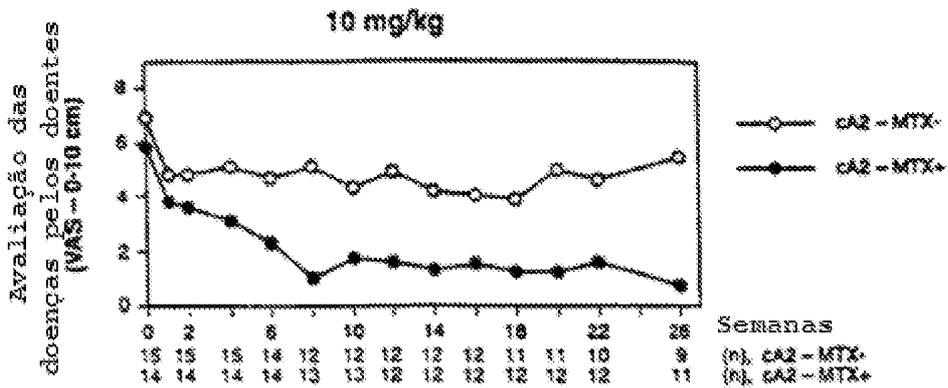


Figura 4C

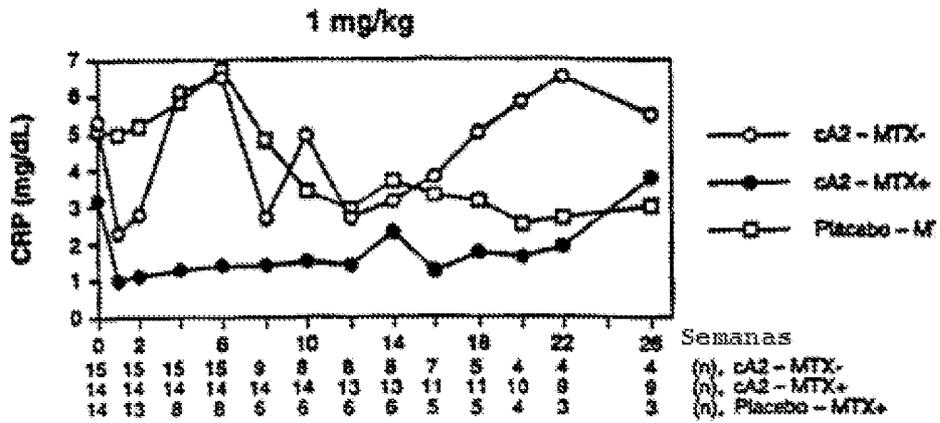


Figura 5A

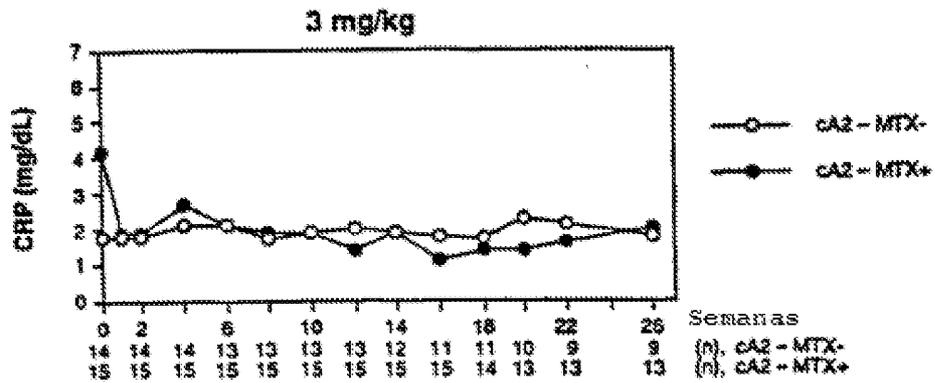


Figura 5B

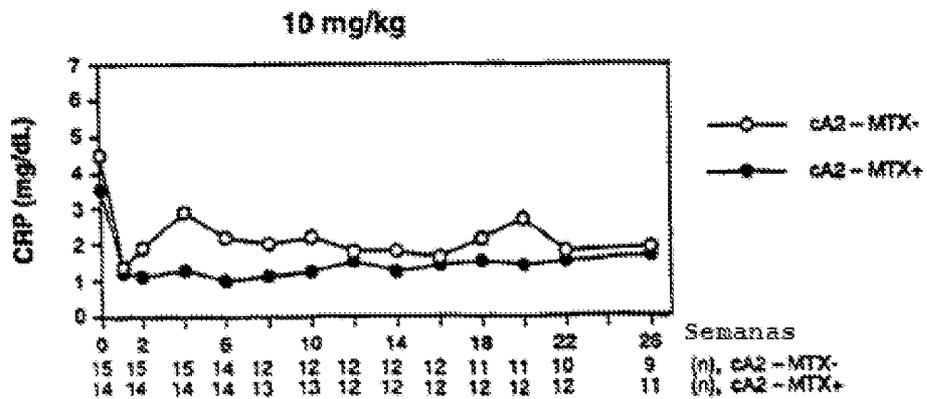


Figura 5C

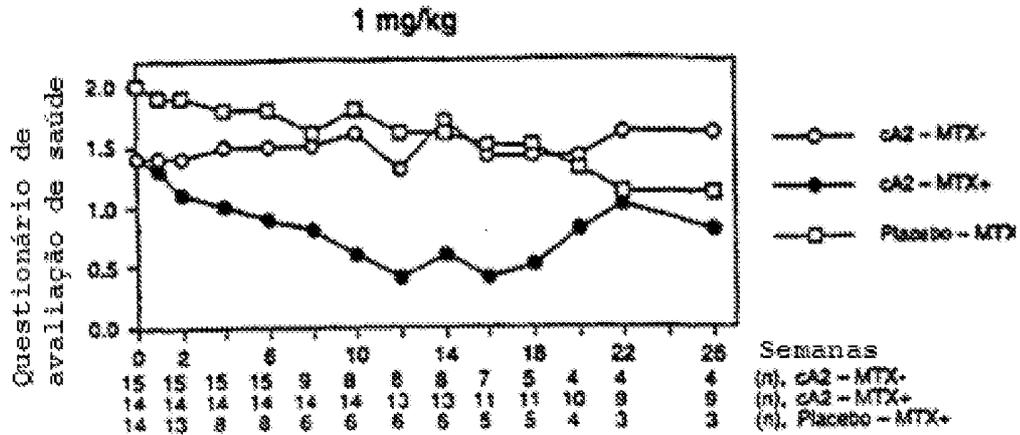


Figura 6A

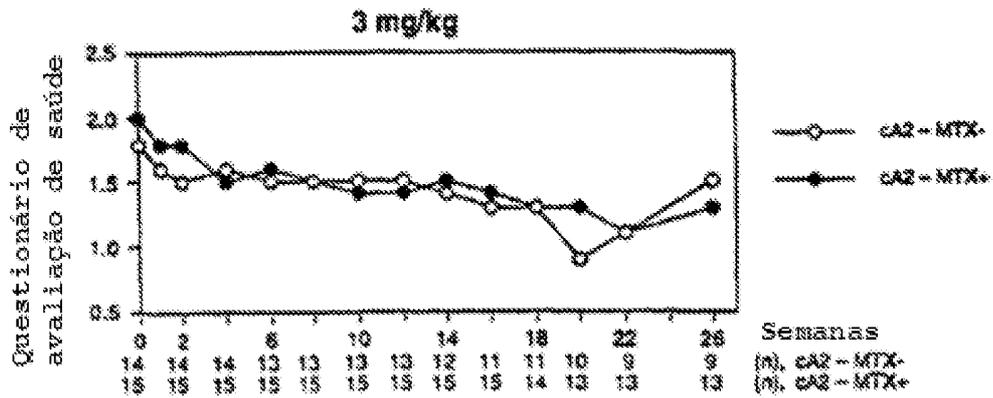


Figura 6B

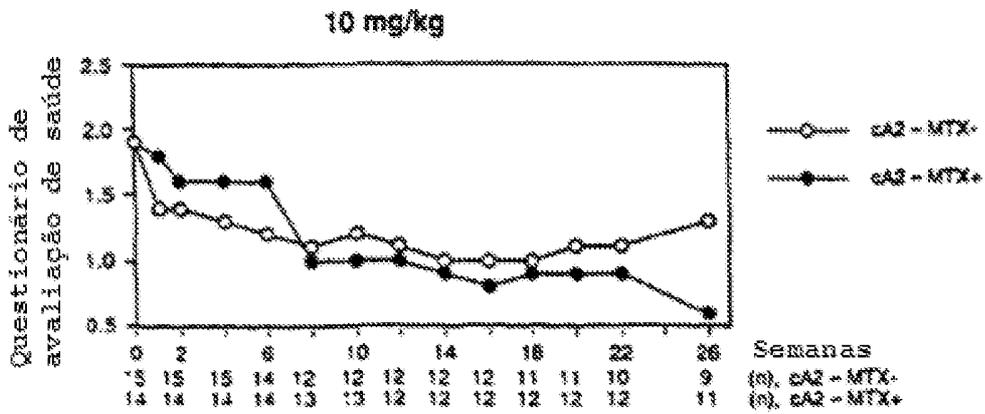


Figura 6C

Concentrações cA2 de Soro

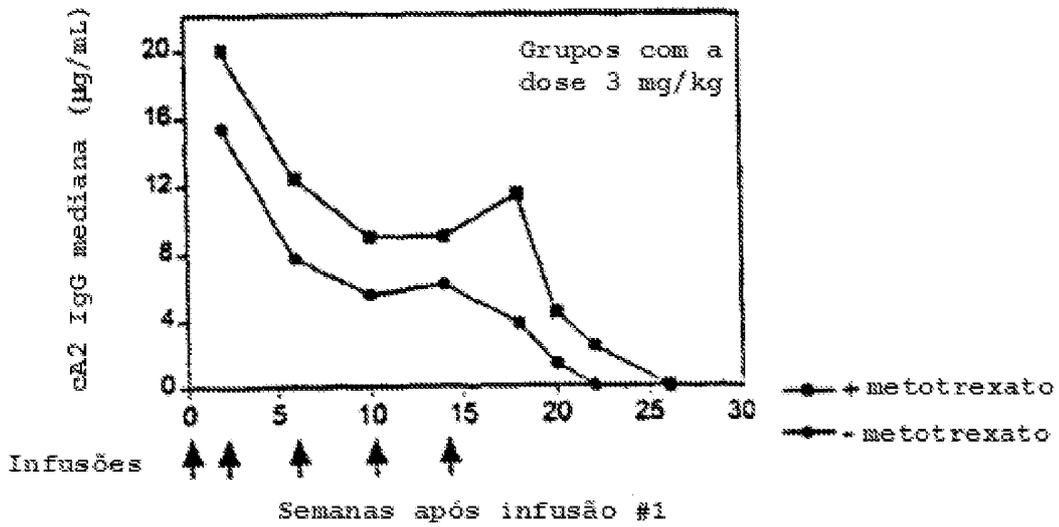


Figura 8A

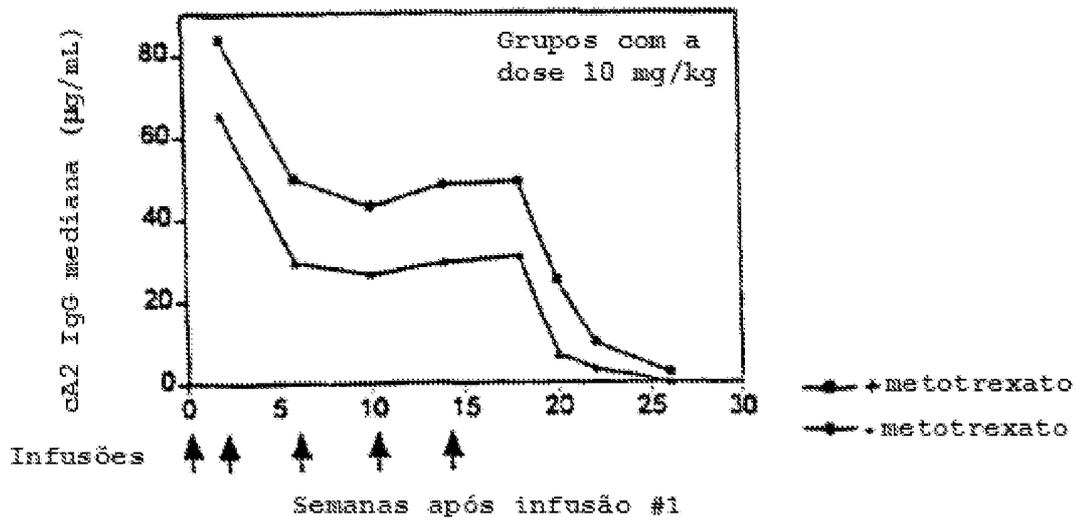


Figura 8B