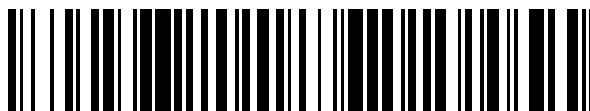


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 419**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2009 E 09782400 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2341937**

54 Título: **Composición para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

29.09.2008 GB 0817810
29.09.2008 GB 0817811
29.09.2008 GB 0817809
10.03.2009 WO PCT/EP2009/052811
10.03.2009 WO PCT/EP2009/052809
10.03.2009 WO PCT/EP2009/052810

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2015

73 Titular/es:

BIOTEST AG (100.0%)
Landsteinerstr. 5
63303 Dreieich, DE

72 Inventor/es:

OSTERROTH, FRANK;
AIGNER, SILKE;
UHEREK, CHRISTOPH;
WARTENBERG-DEMAND, ANDREA;
RUDNEV, ANATOLY;
SOLDAN, MICHAEL;
BRUECHER, CHRISTOPH;
DAELKEN, BENJAMIN;
ZUBER, CHANTAL;
SCHULZ, GREGOR y
CZELOTH, NIKLAS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 419 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento de enfermedades

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades reumáticas. La invención implica una composición farmacéutica altamente eficaz que comprende un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+, que es un anticuerpo monoclonal humanizado y el fármaco metotrexato. La composición y los kits de la invención son particularmente eficaces en el tratamiento de la artritis reumatoide. La invención concibe composiciones farmacéuticas o kits que comprenden el agente y el metotrexato, así como los usos médicos de empleo de la
10 composición y los kits.

Las enfermedades reumáticas son un grupo de enfermedades que afectan al tejido conjuntivo, especialmente las articulaciones y estructuras relacionadas, y se caracterizan por inflamación, degeneración o desequilibrio metabólico. Ejemplos de enfermedades reumáticas son artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis reumatoide
15 juvenil y espondilitis anquilosante.

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que produce inflamación crónica de articulaciones y tejidos circundantes, y también puede afectar otros tejidos y órganos corporales. La enfermedad se produce cuando las células T, que son normalmente tolerantes con respecto a los tejidos autólogos, reconocen y reaccionan con
20 moléculas propias, es decir con moléculas producidas por las células del huésped. La activación de células T 'autorreactivas' por presentación de autoantígenos procesados por células presentadoras de antígenos (APC) da lugar a su expansión clonal y a la migración a los tejidos específicos, donde inducen inflamación y destrucción tisular.

25 Hay un gran número de tratamientos para artritis reumatoide que están disponibles actualmente, incluyendo los fármacos de primera línea para controlar el dolor y la inflamación que se clasifican como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, naproxeno, etc. El tratamiento secundario de la artritis incluye los corticosteroides (por ejemplo, prednisona y dexametasona), que son versiones sintéticas de la hormona
30 cortisona corporal, fármacos antirreumáticos de acción lenta (SAARD) o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), por ejemplo, hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, penicilamina, ciclofosfamida, sales de oro, azatioprina, leflunomida, etc.

Muchos pacientes que se diagnostican por primera vez de RA comienzan con un DMARD, tal como el metotrexato (MTX). El MTX (4-amino-N10-metilpterol ácido glutámico) es un análogo del ácido fólico, que se conoce por
35 obstaculizar la producción de una forma de ácido fólico importante para el crecimiento de las células activamente tales como las que se encuentran en la piel, sangre, tejidos gastrointestinales y las que están implicadas en el sistema inmunitario. No está claro del todo como disminuye el MTX la gravedad de la RA, sin embargo, se cree que tiene un papel en la acción antiinflamatoria y se ha propuesto una variedad de mecanismos farmacológicos para su acción, incluyendo la inhibición de la síntesis de purinas, la promoción de la liberación de adenosina, la inhibición de
40 la producción de citoquinas proinflamatorias y la modulación de la inflamación (Swierkot et al., 2006, Pharmacological Reports 2006; 58: 473-492). El MTX también se sabe que inhibe, por ejemplo, la actividad de una enzima llamada dihidrofolato reductasa (DHFR), y también interfiere con otras varias enzimas.

Otro grupo de fármacos para el tratamiento de RA se llaman modificadores de la respuesta biológica (BRM), que
45 incluyen los anticuerpos monoclonales. Ejemplos de estos son los antagonistas del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), tales como adalimumab, infliximab, y etanercept, que actúan uniéndose al receptor del TNF-alfa o uniéndose directamente a la proteína TNF-alfa en sí misma. Se han aprobado por la FDA varios inhibidores del TNF-alfa para el tratamiento de artritis reumatoide, incluyendo adalimumab (Humira®), Infliximab (Remicade®) y Etanercept (Enbrel®). El TNF-alfa representa un mediador clave en la artritis reumatoide, y se produce
50 principalmente en los macrófagos activados con la sinovia de los pacientes con RA. Actuando como una citoquina pro-inflamatoria, el TNF alfa está presente abundantemente en el tejido sinovial de pacientes con RA. Induce la producción y liberación de quimioquinas que atraen los leucocitos de la sangre al tejido inflamado (Tracey et al., 2008, Pharmacol Ther. 2008; 117(2):244-79). Junto a la mediación en la inflamación sinovial, el TNF alfa está implicado en la destrucción de la articulación y la degradación del cartílago. Adicionalmente, es capaz de inhibir la
55 actividad supresora de células T reguladoras CD4+ CD25+ (Andersson et al., 2008, Scand J Immunol. 2008; 68(1):103-11).

En algunos casos los pacientes con RA se tratan con una combinación de los fármacos tratados anteriormente. En particular, se utilizan frecuentemente los DMARD como primer tratamiento. Sin embargo, puede ser deseable en
60 pacientes donde no se consigue controlar la enfermedad, utilizarlos en combinación con tratamientos que se han aprobado más recientemente, tal como los agentes biológicos, por ejemplo, antagonistas del TNF-alfa. Se ha comunicado que una combinación de MTX con algunos anticuerpos monoclonales (etanercept, infliximab, adalimumab y anakirina) da lugar a una mayor eficacia terapéutica en comparación con la terapia con MTX solo (Swierkot et al., Pharmacological Reports 2006; 58: 473-492). Sin embargo, el MTX ejerce una variedad de acciones farmacológicas y sus efectos clínicos se pueden atribuir a múltiples dianas (Wessels et al., 2008, Rheumatology (Oxford) 2008; 47(3):249-55). En consecuencia, no se puede prever fácilmente como afectará el MTX a la actividad
65

terapéutica, y por lo tanto la eficacia, de un fármaco que es eficaz como agentes único.

A pesar de la cantidad de fármacos disponibles actualmente, no todos los pacientes responden bien a los tratamientos anteriores y tienen varios efectos secundarios adversos. Por ejemplo, el tratamiento del TNF-alfa regula negativamente el sistema inmunitario haciendo que los pacientes tratados sean más susceptibles a infecciones y enfermedades. En consecuencia, existe una necesidad de desarrollar terapias alternativas.

Luggen et al., desvela los resultados de un estudio aleatorio, doble ciego en fase II de un anticuerpo monoclonal (clenoliximab) anti-CD4 no mermante que se administra en combinación con metotrexato (MTX) en pacientes con artritis reumatoide moderada a grave (Annuals of the Rheumatic Diseases, Vol. 62, N° Supl. 1, 1 Julio 2003, página 99).

Se tiene el acuerdo en general que las células T CD4+ participan en una parte importante del inicio y mantenimiento de la autoinmunidad. En consecuencia se ha propuesto que el uso de los mAbs contra las moléculas de superficie de las células T CD4, y en particular los mAbs anti CD4, como agentes inmunosupresores en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide.

Un ejemplo bajo investigación posterior es el anticuerpo anti-CD4 B-F5 (IgG1 murina anti CD4 humano), que se ha ensayado en diferentes enfermedades autoinmunes. En los pacientes de artritis reumatoide, los resultados que se observan en un ensayo controlado por placebo con una dosis diaria de B-F5 no indicaba una mejoría significativa (Wendling et al. J Rheumatol; 25(8):1457-61, 1998). Sin embargo, en el documento WO 2004/083247, se desarrolla un anticuerpo B-F5 humanizado (denominado de aquí en adelante como hB-F5 o BT061) que tiene propiedades de unión al CD4 similares al B-F5 parental de ratón. Una evaluación preliminar del efecto de la versión humanizada del anticuerpo B-F5 de ratón en pacientes que también recibían el fármaco antiinflamatorio no esteroideo Diclofenaco proporcionaba una indicación de una inmunosupresión eficaz, que se refleja por un efecto clínico positivo en los pacientes cuando se utiliza en un tratamiento de 10 días.

El estudio también lo describen Wijdenes et al., en un resumen y un póster presentado en la conferencia EULAR, junio 2005. Describieron el tratamiento de 11 pacientes que padecen artritis reumatoide con 5 infusiones intravenosas de 5 mg de hB-F5 día sí día no con un tratamiento concomitante de 150 mg de Diclofenaco (Wijdenes et al., Resumen y póster, conferencia EULAR, junio 2005).

En el documento WO 2004/083247 se señala que el anticuerpo era capaz de activar un subgrupo particular de células T CD4+, a saber células T reguladoras (Treg) CD4+ CD25+. Estas células constituyen un 5-10% de células T CD4+ periféricas y, una vez estimuladas, son competentes para suprimir la respuesta de células T CD4+ y células T CD8+ así como para inhibir la activación de células B y la expansión clonal. Por tanto estas células representan un nivel de control importante en el sistema inmunitario. En particular, las células Treg CD4+ CD25+ están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria en la periferia, y en la regulación de la autoinmunidad y las respuestas inmunitarias patogénicas.

El tratamiento de la artritis reumatoide por medio de un mecanismo que activa las células T reguladoras CD4+ CD25+ representa una vía importante de investigación, y el uso del agente hB-F5 en ensayos clínicos en fase II en pacientes que padecen artritis reumatoide se trata en las publicaciones de Solicitud de Patente Internacional números WO 2009/121690, WO 2009/124815 y WO 2009/112502.

Sin embargo, no se puede prever fácilmente si cualquier nuevo tratamiento puede combinarse satisfactoriamente con los tratamientos actuales para dar un efecto terapéutico beneficioso. Como se ha mencionado anteriormente, este es particularmente el caso con el MTX.

Varios estudios han informado de hallazgos que sugieren que el MTX tiene un efecto negativo sobre las células T reguladoras y por lo tanto es probablemente para evitar que el MTX se utilice en terapia de combinación con un agente que dependa de la activación de las células T reguladoras CD4+ CD25+ para su mecanismo terapéutico. Wascher et al., (Clin Invest. 1994 Jul; 72(7):535-40) y Herman et al., (Inflamm Res. 2005 Jul; 54(7):273-80) informan de hallazgos que sugieren que el MTX puede reducir el número de linfocitos T disponibles. Wascher et al., informan de que la administración de altas dosis de MTX administradas por vía intravenosa a las 12 semanas reducen significativamente ($P < 0,01$) los linfocitos totales en sangre periférica y da lugar a una redistribución pronunciada de subgrupos de linfocitos con un efecto reductor preferido sobre los linfocitos B ($P < 0,005$) y linfocitos T ($P < 0,05$). Herman et al., informan de un efecto inductor de apoptosis del MTX en linfocitos T in vitro, a concentraciones reflejo de una terapia de dosis baja de pacientes con RA (7,5 mg).

Además, en un estudio in vitro dirigido por Porter et al., (Cell Therapy and Islet Transplantation. 2006. 83(1); 23-29) se informa de una influencia del MTX sobre la viabilidad de células T reguladoras. A concentraciones in vitro de 50 nM (la máxima concentración analizada) las actividades supresoras de las células Treg estaban reducidas significativamente desde el 94% al 88% ($p < 0,05$). Esto sugiere que la presencia de MTX puede inhibir la supresión de las Treg.

Aún más, Yamaguchi et al., (Immunity. 2007 Jul; 27(1):145-59) informaron que las células Treg naturales expresan constantemente altas cantidades del receptor de folato 4 (FR4). Como el MTX es un análogo del folato, se sugiere que el MTX puede también captarse por las células Treg. Tal captación es probable que dé como resultado la interferencia en el metabolismo de esta población celular.

5 Además, se sabe que la actividad terapéutica de muchos anticuerpos está influenciada por los receptores Fc en las células que expresan el receptor Fc. Algunos anticuerpos necesitan incluso unirse a los receptores Fc en las células que expresan el receptor Fc para activarse. Sin embargo, se sabe que la terapia con MTX da como resultado un descenso en la expresión de Fc gamma R1 en monocitos (Wijngaarden et al., Arthritis Rheum. 2004 Dic; 10 50(12):3878-87, y Wijngaarden et al., Rheumatology (Oxford). 2005 Jun; 44(6):729-34) in vivo. La influencia reductora del MTX sobre la expresión del receptor Fc en monocitos se ha demostrado también en pacientes que se trataron con MTX y el anticuerpo terapéutico anti-TNF alfa Infliximab (Wijngaarden et al., Clin Exp Rheumatol. 2008 Ene-Feb; 26(1):89-95). Como resultado, se considera en general que el MTX tiene una influencia negativa en la actividad de unión de los anticuerpos al Fc. En consecuencia, se espera que el MTX tendrá una influencia negativa sobre la capacidad de un anticuerpo para activar Treg.

Dado lo anterior, se espera que el MTX tendrá un impacto negativo en la capacidad terapéutica de un agente que actúa por medio de la activación de las células T reguladoras CD4+ CD25+, tales como el hB-F5. Por lo cual, se puede apreciar que el resultado de las estrategias de tratamiento combinado no se puede prever.

20 Con respecto a la técnica precedente descrita anteriormente, la presente invención pretende desarrollar más y mejorar las composiciones farmacéuticas para tratar la artritis reumatoide.

25 En consecuencia, en un primer aspecto la presente invención se proporciona un kit que comprende por separado un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+, tal como el hB-F5 y metotrexato, donde el agente es un anticuerpo anti CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, y donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSYIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.

35 Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que una combinación de un agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ con metotrexato tiene un efecto terapéutico, y es sorprendentemente ventajosa en relación con la reducción del número de efectos secundarios relacionados con anticuerpos. La combinación también es sorprendentemente ventajosa en relación con la velocidad a la que se alcanza un alto nivel del efecto terapéutico.

40 En consecuencia, la presente invención también proporciona un agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ y metotrexato como una preparación combinada para su uso simultáneo, por separado o secuencial en medicina, en el que el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, y donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSYIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.

50 La presente invención también proporciona un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ para su uso en el tratamiento de una enfermedad reumática, en el que el agente es para su uso simultáneo, por separado o secuencial con metotrexato como terapia de combinación, donde el agente es un anticuerpo anti CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSYIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.

55 En particular, el agente para el uso especificado en el párrafo anterior puede utilizarse en el tratamiento de una enfermedad reumática en un paciente que no responde al tratamiento con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD), preferentemente en el que el DMARD es el metotrexato.

60 Además, la presente invención proporciona un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ para su uso en el tratamiento de una enfermedad reumática en un paciente, en el que el paciente está sometido al tratamiento con metotrexato, donde el agente es un anticuerpo anti CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSYIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80%

con la SEC ID N° 2.

De manera alternativa, la presente invención proporciona una composición que comprende metotrexato para su uso en el tratamiento de una enfermedad reumática en un paciente, en el que el paciente está sometido al tratamiento con un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+, donde el agente es un anticuerpo anti CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMY, VISVKSENYGANYAESVRG y SYYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSYIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.

En otro aspecto más la presente invención proporciona un método que comprende la preparación de un kit que comprende el agente y el metotrexato de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La invención se ilustrará a modo de ejemplo solamente, con referencia a las siguientes Figuras, en las que:

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo de proliferación in vitro llevado a cabo con células T reguladoras CD4+ CD25+ tomadas de dos donantes (Exp. 1 y Exp. 2) del Ejemplo 1.

La Figura 2A y 2B muestra los gráficos del % de pacientes que consiguen al menos una puntuación de ACR20 durante el curso de ensayo clínico del Ejemplo 2 al compararse con pacientes en los grupos de dosis más eficaz comunicados en los ensayos en fase III publicados por Keystone et al., (Arthritis Rheum. 2004 May; 50(5): 1400-11) y (Ann Rheum Dis. 2009 Jun; 68(6):789-96). El gráfico de la Figura 2B está corregido por el placebo.

La Figura 3A y 3B muestran los gráficos del % de pacientes que consiguen al menos una puntuación de ACR50 durante el curso del ensayo clínico descrito en el Ejemplo 2 al compararse con los pacientes de los grupos de dosis más eficaz comunicado en los ensayos en fase III publicados por Keystone et al., (Arthritis Rheum. 2004 May; 50(5): 1400-11) y (Ann Rheum Dis. 2009 Jun; 68(6):789-96). El gráfico de la Figura 3B está corregido por el placebo.

La Figura 4A y 4B muestran los gráficos del % de pacientes que consiguen al menos una puntuación de ACR70 durante el curso del ensayo clínico descrito en el Ejemplo 2 al compararse con los pacientes de los grupos de dosis más eficaz comunicado en los ensayos en fase III publicados por Keystone et al., (Arthritis Rheum. 2004 May; 50(5): 1400-11) y (Ann Rheum Dis. 2009 Jun; 68(6):789-96). El gráfico de la Figura 4B está corregido por el placebo.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 3) de un fragmento del plásmido que codifica la región V_H del B-F5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está subrayada y la secuencia polipeptídica correspondiente (SEC ID N° 15) se indica debajo de la secuencia de nucleótidos.

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 4) de un fragmento del plásmido que codifica las regiones V_K del B-F5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está subrayada y la secuencia polipeptídica correspondiente (SEC ID N° 2) se indica debajo de la secuencia de nucleótidos.

La Figura 7 muestra el alineamiento de las secuencias polipeptídicas de la V_K del B-F5 murino (SEC ID N° 6), FK-001 (SEC ID N°s 7, 8, 9 y 10), L4L (SEC ID N° 1), y H37V (SEC ID N° 15) en el diseño de la forma humanizada del B-F5.

La Figura 8 muestra el alineamiento de las secuencias de polipéptidos de la V_H del B-F5 (SEC ID N° 5), M26 (SEC ID N°s 11, 12, 13 y 14), H37L (SEC ID N° 1), y H37V (SEC ID N° 15) en el diseño de la forma humanizada del B-F5.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ y metotrexato. La presente invención proporciona un kit que comprende por separado un agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ y metotrexato, como se ha definido anteriormente.

El agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ y el metotrexato pueden estar en una sola formulación o en formulaciones separadas. Las formulaciones pueden consistir en el agente y/o el metotrexato. De manera alternativa, las formulaciones pueden comprender el agente y/o el metotrexato y además pueden comprender componentes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos o excipientes.

En un aspecto el agente y/o metotrexato se adaptan para administrarse por vía parenteral, preferentemente administración intramuscular, intravenosa o subcutánea. Lo más preferible es que el agente y/o el metotrexato sean adecuados para su administración subcutánea.

5 En una realización de este aspecto el agente y/o metotrexato se adaptan para su administración intravenosa y se proporcionan en un volumen de dosificación de 0,5 a 500 ml o en forma para dilución al volumen de dosificación de 0,5 a 500 ml. En una realización alternativa la composición es adecuada para su administración subcutánea o intramuscular y se proporciona en un volumen de dosificación de 0,1 a 3 ml. De manera alternativa, el agente y/o metotrexato son adecuados para proporcionar un volumen de dosificación de 0,5 a 1,5 ml o 15 a 25 ml.

En un aspecto alternativo el metotrexato se adapta para su administración oral y puede estar en forma de comprimidos.

10 En más aspectos la composición o el kit puede ser adecuado para su uso como una dosis única o adecuado para su uso como parte de una pluralidad de dosis, en particular, cuando la dosis se va a administrar semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada seis semanas o una vez cada ocho semanas.

15 En una realización de este aspecto el kit comprende una pluralidad de dosis separadas del agente y el metotrexato. En una realización más, se proporciona un envase de dosificación que comprende una pluralidad de dosis de la composición farmacéutica envasadas por separado.

20 En una realización específica el agente, opcionalmente con el metotrexato, es adecuado para su administración subcutánea y se proporciona en una forma lista para su administración que no necesita diluirse de tal forma que se pueda administrar fácilmente por personal no médico.

25 Los agentes que son adecuados para su uso son los capaces de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+. El agente puede ser un polipéptido, una proteína o un anticuerpo. Cuando el agente es un anticuerpo podría ser un anticuerpo monoclonal. Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-CD4. El anticuerpo puede también ser preferentemente un anticuerpo IgG1 y puede ser un anticuerpo IgG1 sin modificar.

30 Los anticuerpos que son más adecuados para su uso son los anticuerpos anti-CD4 humanizados, o fragmentos o derivados de los mismos, que son capaces de activar células T reguladoras CD4+ CD25+. Ejemplos de anticuerpos que son capaces de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ se tratan en Becker et al., (European Journal of Immunology (2007), Vol. 37: páginas 1217-1223) y se describen en el documento WO 2004/083247.

35 En general, el anticuerpo que se utiliza comprende uno o más dominios variables que son capaces de unirse a CD4. El anticuerpo puede comprender una región constante humana (Fc). Esta región constante puede seleccionarse de entre los dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquiera de los isotipos, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las regiones constantes preferidas se seleccionan de entre los dominios constantes de IgG, en particular de la IgG1.

40 La presente descripción también incluye cualquier fragmento del anticuerpo. Los fragmentos comprenden preferentemente las regiones de unión al antígeno o V del anticuerpo, y son en particular los fragmentos Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv y scFv.

45 En un aspecto particularmente preferido el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o un fragmento o derivado del mismo derivado del anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón B-F5. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende una secuencia que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal B-F5 de ratón, opcionalmente con variaciones en la secuencia que no afecten sustancialmente a la especificidad del anticuerpo y/o la afinidad del mismo.

50 Ejemplos de anticuerpos se proporcionan en el documento WO 2004/083247, en el que se desvela la producción de varias versiones humanizadas del anticuerpo B-F5 de ratón. En particular, el documento WO 2004/083247, desvela la producción de un anticuerpo BT061 humanizado (hB-F5) que tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

55 - Cadena H dominio V: EEQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^ACAASGFS^FSDCRMYWLRQAPGK^GLEWIGVISVKS
ENYGANYAESVRGRFTISR^DDDSKNTVYLQMN^SLKTEDTAVY YCSAS YYRYDVGAWFAYWGGQTLVTVSS (SEC ID N° 1)

60 - Cadena L dominio V:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ
KPGQPPKLLIYLASILE SGVPDRFSGSGSDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWT
FG QGTKVEIK (SEC ID N° 2).

65 Los derivados de este anticuerpo también son adecuados para los usos descritos en el presente documento. Los derivados incluyen los que tienen dominios V definidos por secuencias de polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95% con la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.

Anticuerpos particularmente preferidos son los que comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del mAb B-F5 de ratón, y mantienen la capacidad del hB-F5 para activar las células reguladoras CD4+ CD25+. La localización de las CDR en los dominios V_H y V_K se muestran en las Figuras 7 y 8. Tales anticuerpos pueden tener opcionalmente variaciones en la secuencia de las CDR que no afecten sustancialmente la especificidad y/o la afinidad de unión.

En general, el anticuerpo utilizado comprende además una región constante humana (Fc). Esta región constante puede seleccionarse de entre los dominios constantes que se indicaron anteriormente.

La presente descripción también incluye cualquier fragmento del anticuerpo B-F5 o derivado del mismo que comprende las regiones V del mismo. Este comprende en particular fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, Fv y scFv.

Con el fin de preparar el anticuerpo B-F5 se puede fusionar un polinucleótido que codifica el dominio V de la cadena H o de la cadena L de un anticuerpo BT061 con un polinucleótido que codifica la región constante de una cadena H o una cadena L humana. Con el fin de expresar las cadenas H y L completas obtenidas de esta manera se puede añadir también una secuencia que codifica un péptido de señal que permita la secreción de la proteína.

El polinucleótido que se ha descrito anteriormente se une en un vector de expresión a las secuencias de control adecuadas que permiten la regulación de su transcripción y traducción en una célula huésped elegida. Estas construcciones de ADN recombinante se pueden obtener e introducir en células huésped por técnicas bien conocidas de ADN recombinante y modificación genética.

Las células huésped útiles pueden ser células procariotas o eucariotas. Entre las células eucariotas adecuadas, se mencionarán, a modo de ejemplo, células vegetales, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, células de insectos tales como *Drosophila*, o *Spodoptera*, y células de mamífero tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

El anticuerpo BT061 (hB-F5) que se utiliza en la invención se puede obtener cultivando una célula huésped que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, bajo condiciones adecuadas para la expresión del mismo, y recuperando dicho anticuerpo del cultivo de la célula huésped.

Un aspecto más es un método que comprende la preparación de un kit o una composición farmacéutica que comprende el agente y el metotrexato.

Como se ha indicado anteriormente, la presente descripción proporciona además los usos médicos y los métodos de tratamiento de pacientes que padecen, o son susceptibles a enfermedades reumáticas. En particular, en un aspecto se proporciona un método para tratar una enfermedad reumática en un paciente que comprende una etapa (a) de administración de un agente capaz de activar células reguladoras CD4+ CD25+ y una etapa (b) de administración de metotrexato, en que la etapa (a) y la etapa (b) pueden llevarse a cabo simultáneamente, por separado o secuencialmente y en cualquier orden. En una realización de este aspecto la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo el mismo día. En una realización alternativa de este aspecto la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en la misma semana.

En aspectos alternativos, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad reumática en un paciente que está sometido al tratamiento con metotrexato que comprende una etapa de administración de un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+, y un método para tratar una enfermedad reumática en un paciente sometido a tratamiento con un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ que comprende una etapa de administración de metotrexato.

Las enfermedades reumáticas se definen como enfermedades que afectan al tejido conjuntivo, especialmente las articulaciones y estructuras relacionadas, que se caracteriza en particular por inflamación, degeneración o desequilibrio metabólico. En un aspecto preferido de la invención la enfermedad reumática es artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil o espondilitis anquilosante.

El tratamiento de artritis reumatoide es el preferido. La eficacia clínica del tratamiento de artritis reumatoide se puede evaluar utilizando la puntuación ACR.

La puntuación ACR es un método de evaluación de la artritis reumatoide que muestra un paciente tratado fijada por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y funciona por medio de la medición de un grupo central de parámetros (Felson et al., *Arthritis & Rheumatism*, 1995, 38(6), 727-735). Este sistema define un valor de ACR20 como una mejoría de al menos el 20% en los recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas y al menos un 20% de mejoría en 3 de las 5 medidas restantes del grupo central ACR: evaluaciones globales del paciente y el médico, dolor, discapacidad, y un reactivo de fase aguda, tal como la proteína reactiva C (CRP) o la Tasa de Sedimentación de Eritrocitos (ESR). De manera similar, las puntuaciones ACR50 y ACR70 definen una mejoría de al menos el 50% y al menos el 70%, respectivamente.

En un aspecto más, el tratamiento se puede administrar a un paciente que no responde al tratamiento con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD). Un paciente que no responde es un paciente que muestra una respuesta inadecuada al tratamiento con un DMARD. En particular, un paciente muestra una respuesta inadecuada si él/ella continúa teniendo artritis reumatoide activa clínicamente, por ejemplo, si el fármaco no consigue una ACR20 en el paciente o si no se consigue una inhibición de la progresión del daño estructural de las articulaciones o si se pierde una respuesta inicial al fármaco durante el tiempo que dure el tratamiento.

Ejemplos de DMARD son por ejemplo, hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, penicilamina, ciclofosfamida, sales de oro, azatioprina, leflunomida, etc.

Como se ha indicado anteriormente, el agente y el metotrexato se pueden administrar al paciente de cualquier manera adecuada. En particular, se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración del agente, se prefiere particularmente la administración intravenosa o subcutánea. Además, el metotrexato se puede administrar por vía oral.

El volumen en el que se dosifican el agente y/o el metotrexato variará dependiendo del método de administración. Cuando la dosis se va a administrar por infusión intravenosa, el volumen de dosificación puede ser desde 0,1 o 0,5 hasta 500 ml, preferentemente entre 14 y 25 ml, y típicamente aproximadamente 20 ml. Cuando la dosis se va a administrar por inyección subcutánea o intramuscular, el volumen de dosificación puede ser entre 0,1 y 1,5, y típicamente aproximadamente 1 ml.

La frecuencia de administración no se limita especialmente, siempre que no interfiera con la eficacia del tratamiento. El tratamiento puede comprender una dosis única o una pluralidad de dosis. Se prefiere que la pluralidad de dosis se administre con al menos las bases siguientes: semanalmente, cada dos semanas, cada 4 semanas, cada 6 semanas, cada 12 semanas, cada 24 semanas, cada mes, cada 6 meses, o anualmente. Por lo tanto, las dosis se pueden separar por al menos una semana, o por al menos dos semanas, al menos un mes o por al menos 3 meses o por al menos 6 meses o por al menos un año (lo que significa que las dosis se toman cada semanas, cada dos semanas, o cada mes o cada 6 meses o cada año). Se prefiere particularmente que la dosis se administre al menos cada dos o tres semanas.

La longitud del tratamiento no está especialmente limitado, y, como es típico en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, el tratamiento prosigue indefinidamente, o hasta que los síntomas se reduzcan a un nivel manejable para el paciente. En general se administra el tratamiento al sujeto al menos durante 1 mes.

También se entenderá que el agente y el metotrexato se van a administrar en cantidades terapéuticamente eficaces, es decir, en cantidades que sean eficaces para mejorar, evitar o tratar la enfermedad reumática.

En particular, cuando la enfermedad es artritis reumatoide, el agente y el metotrexato se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para proporcionar una respuesta ACR50, más preferentemente una respuesta ACR70.

En un aspecto, el agente se va a administrar a un sujeto a una dosis de 0,2 a 10 mg, y más preferentemente a una dosis desde 0,2 a 6,25 mg, y más preferentemente en una dosis desde 0,2 a 3 mg. Estas dosis son particularmente preferidas cuando la dosis se administra por vía intravenosa.

Cuando el agente es el anticuerpo BT061 humanizado los inventores han descubierto sorprendentemente que los valores de C_{máx} eficaces del anticuerpo circulante en el plasma de voluntarios saludables 3 horas después del final de la infusión intravenosa son mucho más bajos que los esperados, como se muestra en la Tabla 1, a continuación. Esto se considera un reflejo de un aclaramiento más rápido mediado por la diana.

Tabla 1 – niveles de BT061 en el plasma esperados y eficaces tras la administración intravenosa. Se indica el intervalo de niveles plasmáticos medidos en tres voluntarios diferentes por grupo de dosis

dosificación (mg)	Nivel plasmático (mg/ml)		
	cmáx teórica	cmáx eficaz (tras el fin de la infusión)	conc. 3 h tras el fin de la infusión
2,5	0,71	0,06 - 0,14	0
5	1,43	0,32 - 0,44	0,09 - 0,16
10	2,86	0,8 - 2,0	0,46 - 1,4
20	5,71	2,3 - 4,1	1,7 - 3,3
40	11,43	5,9 - 6,5	4,4 - 6,1
60	17,14	8,9 - 15,1	7,7 - 11,08

En consecuencia, en una realización preferida se administran 0,2 a 10 mg del agente por vía intravenosa y la concentración máxima del agente en el plasma del paciente tres horas después de la administración es menor de 2,5 µg/ml. Preferentemente, se administran 0,2 a 5 mg del agente por vía intravenosa y la concentración máxima del

agente en el plasma del paciente tres horas después de la administración es menor de 0,3 µg/ml. Aún más preferentemente, se administran 0,5 a 3 mg del agente por vía intravenosa y la concentración máxima del agente en el plasma del paciente tres horas después de la administración es menor de 0,1 µg/ml. Estos valores se obtienen tras cualquier administración y/o tras la primera y/o la segunda administración del agente.

5 La dosis también se puede calcular basándose en el área de superficie corporal (BSA) del sujeto. El área de la superficie corporal (BSA) se puede calcular de acuerdo con cualquier método conocido. Ejemplos de métodos de cálculo del BSA son: La fórmula de Mosteller ($BSA (m^2) = ([\text{Altura (cm)} \times \text{Peso (kg)}] / 3600)^{1/2}$ (Mosteller RD., N Engl J Med 1987 Oct 22;317(17):1098); la fórmula de DuBois y DuBois de $BSA (m^2) = 0,20247 \times \text{Altura (m)}^{0,725} \times \text{Peso (kg)}^{0,425}$ (DuBois D; DuBois EF., Arch Int Med 1916 17:863-71); la fórmula Haycock de $BSA (m^2) = 0,024265 \times \text{Altura (cm)}^{0,3964} \times \text{Peso (kg)}^{0,5378}$ (Haycock G.B., et al., The Journal of Pediatrics 1978 93:1:62-66); la fórmula Gehan y George de $BSA (m^2) = 0,0235 \times \text{Altura (cm)}^{0,42246} \times \text{Peso (kg)}^{0,51456}$ (Gehan EA, y George SL, Cancer Chemother Rep 1970 54:225-35); y la fórmula Boyd: $BSA (m^2) = 0,0003207 \times \text{Altura (cm)}^{0,3} \times \text{Peso (gramos)}^{0,7285} - (0,0188 \times \text{LOG(gramos)})$.

15 En consecuencia, el agente se puede administrar a un sujeto a una dosis desde 0,1 a 5 mg/m² de área de superficie corporal del paciente, preferentemente desde 0,1 a 2,5 mg/m² y más preferentemente desde 0,25 a 1,5 mg/m². De manera alternativa, la dosis se puede calcular basándose en el peso corporal del sujeto, tal que en un aspecto más el agente se va a administrar a un sujeto a una dosis de 2 a 150 µg/kg, preferentemente de 2 a 75 µg/kg, y más preferentemente de 5 a 45 µg/kg. Como anteriormente, se prefiere particularmente que estas dosificaciones se utilicen cuando el agente se administre por vía intravenosa.

25 Como se ha indicado anteriormente, en un aspecto el agente y/o el metotrexato se administran por vía subcutánea. En general, como se sabe en la técnica, las dosis subcutáneas tienen que ser mayores que las dosis intravenosas con el fin de conseguir el efecto terapéutico equivalente. Los presentes inventores han demostrado en ensayos de monoterapia en pacientes de artritis reumatoide con el anticuerpo BT061 que el efecto terapéutico que se alcanza tras la administración intravenosa de 2 mg es aproximadamente equivalente que la que se consigue tras una administración subcutánea de 50 mg. Estos resultados se presentan en la Tabla 2 a continuación.

30 Tabla 2 – porcentaje de pacientes con artritis reumatoide que muestran mejorías de ACR la semana 7 tras ser tratados con una dosis semanal de BT061 (2 mg intravenosos o 50 mg subcutáneos) durante un periodo total de tratamiento de seis semanas.

Los resultados representan datos cegados de 8 individuos, 2 que reciben placebo y seis que reciben BT601.

semana 7	ACR20 (%)	ACR50 (%)	ACR70 (%)
2 mg i.v	50	25	12,5
50 mg s.c.	50	25	12,5

35 En consecuencia, en un aspecto preferido más el agente se administra al paciente por vía subcutánea o intramuscular a una dosis de desde 20 mg a 80 mg, y más preferentemente de desde 30 mg a 70 mg. De manera alternativa, el agente se puede administrar a una dosificación de desde 8 a 50 mg/m² o de desde 0,2 a 1,5 mg/kg. En este aspecto se prefiere particularmente que la administración sea como mucho aproximadamente una vez cada dos semanas. Se señala que los aspectos descritos en este párrafo se puede combinar con los otros aspectos y características preferidas expuestos en esta solicitud.

45 La composición farmacéutica o kit comprende además metotrexato (MTX). El tratamiento de la RA con MTX se conoce bien en la técnica y se planea que el MTX se administre en las dosificaciones descritas anteriormente. En particular el MTX se administra habitualmente en una dosis entre 5 a 30 mg, preferentemente entre 7,5 mg y 30 mg y más preferentemente entre 10 a 25 mg. En algunos casos la dosis dependerá del pretratamiento del paciente con MTX o la tolerancia a este fármaco.

50 En otro aspecto el método incluye una etapa más de administración de un agente terapéutico adicional adecuado para tratar una enfermedad reumática. Los agentes terapéuticos adicionales comprenden uno o más de los siguientes agentes: un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un antiinflamatorio esteroideo, un compuesto de oro, un fármaco anti-malaria, ácido fólico, ciclosporina, leflunomida, azatioprina, sulfasalazina, d-penicilamina, ciclofosfamida, micofenolato, minociclina y clorambucilo. Estos agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar por separado, simultáneamente o secuencialmente con el agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ y el MTX.

55 Como se ha mencionado anteriormente los presentes inventores han demostrado sorprendentemente que la composición farmacéutica y el kit descritos en el presente documento son capaces de tratar enfermedades reumáticas. En particular, como se muestra posteriormente en el Ejemplo 2 el tratamiento de artritis reumatoide da como resultado una mejoría significativa en la enfermedad. En consecuencia, en un aspecto más en el que la enfermedad es la artritis reumatoide el tratamiento proporciona una mejoría de la enfermedad en el paciente de al

menos ACR20, preferentemente al menos ACR50, y más preferentemente al menos ACR70, de acuerdo con el sistema de puntuación del Colegio Americano de Reumatología. En otras palabras el tratamiento proporciona una mejoría de los parámetros de la enfermedad del paciente de al menos un 20%, preferentemente al menos un 50% y más preferentemente al menos un 70% de acuerdo con la puntuación del Colegio Americano de Reumatología (ACR).

Más preferentemente el tratamiento proporciona al menos una respuesta ACR70 en el paciente entre 6 a 8 semanas tras el inicio del tratamiento.

Como también se aprecia en el Ejemplo 2 y las Figuras relacionadas, el tratamiento descrito en el presente documento tiene la capacidad de mejorar la artritis reumatoide en un número de pacientes. En consecuencia, el método de tratamiento es capaz de tratar la artritis reumatoide proporcionando al menos una mejoría de la condición de enfermedad de ACR20 en al menos un 20% de los pacientes. Además, el método de tratamiento es capaz de tratar artritis reumatoide proporcionando al menos una mejoría de la condición de la enfermedad de ACR50, más preferentemente ACR70, en al menos un 10% de los pacientes.

La invención se describirá ahora además con los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1 Ensayo de proliferación in vitro con el anticuerpo BT061 utilizando células T reguladoras CD4+ CD25+ recién aisladas

Método

Aislamiento de células T reguladoras CD4+ CD25+

Se obtuvieron especímenes de sangre de 50 ml en EDTA de donantes sanos de control. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T reguladoras (Treg) y células T auxiliares como células T de respuesta (Tresp) de las muestras de sangre periférica como se había descrito anteriormente (Haas et al., J Immunol. 2007 Jul 15;179(2):1322-30).

Ensayos de proliferación in vitro

Las Treg recién aisladas se preincubaron durante 48 horas con 1 µg/ml de anticuerpo unido a la placa (BT061), 1 µg/ml de BT061 soluble o Medio.

Las Treg recién aisladas ($2,5 \times 10^4$, donante A) obtenidas de 2 donantes (Exp. 1 y Exp. 2) se preincubaron durante 48 horas con 1 µg/ml de BT061 soluble o unido a la placa. Para conseguir la estimulación alogénica las $2,5 \times 10^4$ Treg preincubadas se transfirieron entonces a 1×10^5 células T como células de respuesta (Tresp) de un segundo donante (donante B) en presencia de 2×10^5 PBMC irradiadas (30 gray) y mermadas de células T (donante A). Tras 4 días de estimulación se añadió 1 µCi [3H] timidina por pocillo y se midió la proliferación tras 16 horas adicionales.

Resultados

El porcentaje de inhibición de la proliferación de Tresp mediada por Treg se muestra en la Figura 1 como el porcentaje de supresión de proliferación de las Tresp incubadas con PBMC en ausencia de Treg. Los resultados se muestran para las Treg obtenidas de los dos donantes (Exp. 1 y Exp. 2). Las barras rayadas representan los resultados obtenidos con las Treg pre-incubadas con el anticuerpo soluble, mientras que las barras rellenas representan los resultados obtenidos con las células Treg pre-incubadas con el anticuerpo unido a la placa. Como control de la actividad supresora se muestran las Treg tratadas con medio (barras vacías). Los números encima de las barras representan el porcentaje de inhibición de la proliferación de Tresp.

Como se muestra en la Figura 1, las Treg pre-incubadas con el anticuerpo unido a la placa o soluble eran capaces de reducir la media de respuestas proliferativas de Tresp estimuladas alogénicamente al contrario que las células Treg incubadas solo con medio. Además, la supresión obtenida con el anticuerpo unido a la placa era más fuerte al compararse con la supresión obtenida con el anticuerpo soluble.

Bajo condiciones fisiológicas in vivo se espera que el BT061, como anticuerpo IgG1 que es, se una a los receptores Fc en las células que expresan el receptor Fc. Esta interacción debería dar lugar al reclutamiento de BT061 distribuido homogéneamente (unido a CD4) en el sitio de interacción local de las células diana y las células que expresan el receptor Fc, dando lugar a un entrecruzamiento de BT061 y CD4. Se espera que la interacción con las células que expresan el receptor Fc confiere una señal similar a las células Treg diana como se observa con el anticuerpo unido a la placa ya que ambos mecanismos reclutan varias moléculas diana (CD4) en estrecha proximidad en la superficie celular.

EJEMPLO 2 – Ensayo clínico en pacientes con artritis reumatoide

La capacidad de las composiciones farmacéuticas y kits descritos en el presente documento para proporcionar un tratamiento eficaz de la RA se demostró en pacientes que padecían RA.

5 El ensayo de combinación en el que se estudió el BT061 en combinación con MTX comprendía un estudio doble ciego controlado por placebo aleatorio en fase II realizado en pacientes con RA moderada a grave. Todos los pacientes habían tomado dosis estables de MTX durante al menos 3 meses antes del comienzo del estudio, y se continuó con estas dosis en todos los pacientes con un intervalo de 15 a 20 mg por semana administrados durante el curso del ensayo por vía oral o intramuscular.

15 Los pacientes se dividieron en tres grupos. Los pacientes del grupo I (14 pacientes) recibieron una dosis intravenosa de 0,5 mg de BT061 y una dosis de MTX en un intervalo de 15 a 20 mg. Los pacientes del grupo II (42 pacientes) recibieron una dosis intravenosa de 2,0 mg de BT061 y una dosis de MTX en el intervalo de 15 a 20 mg. Los pacientes del grupo III (14 pacientes) recibieron una dosis de MTX en un intervalo de 15 a 20 mg. Los pacientes se dosificaron una vez a la semana durante un periodo de ocho semanas.

20 Para la administración intravenosa el agente se va a infundir en la vena del antebrazo según los procedimientos aceptados médicamente.

25 La eficacia del tratamiento se evaluó semanalmente durante el periodo de dosificación, y durante varias semanas después de completarse la dosificación, evaluando los parámetros ACR (página de inicio de la Sociedad Americana de Reumatología) y en particular estudiando el número de articulaciones sensibles e hinchadas y haciendo un seguimiento de los niveles de proteína C reactiva (CRP) y la tasa de sedimentación eritrocitaria (ESR). Estos parámetros también se evaluaron antes del ensayo para proporcionar un valor de línea base el día 0.

30 Los resultados del ensayo se muestran en las Figuras 2 a 4 en los que se comparan los datos obtenidos de los pacientes del grupo de dosis II, que recibieron dosis de 2 mg de BT061 + MTX, con los grupos de dosis más eficaz obtenidos en dos ensayos en fase III publicados que implicaban anticuerpo anti-TNF alfa, Humira (adalimumab) por Keystone et al., (Arthritis Rheum. 2004 May;50(5):1400-11 - ensayo DE019) y Simponi (golimumab) por Keystone et al., (Ann Rheum Dis. 2009 Jun;68(6):789-96 – ensayo Go-Forward) Los grupos de dosis más eficaz se muestran para todos los estudios.

35 Se debería señalar que los resultados de la técnica anterior que se incluyen con fines comparativos son ensayos en fase III en los que las dosis de las composiciones farmacéuticas se han optimizado.

40 En particular, la Figura 2 muestra el porcentaje de pacientes del grupo de dosis de 2 mg que consigue una puntuación ACR20, mientras que las Figuras 3 y 4 muestran el porcentaje de pacientes del grupo de dosis de 2 mg que consiguen una puntuación ACR50 y ACR70, respectivamente.

45 Como se ve en las Figuras, en los ensayos clínicos con anticuerpo anti-TNF alfa, el pico de actividad terapéutica que se mide por mejoría de las puntuaciones ACR necesita normalmente varios meses. En general, el porcentaje de pacientes que muestran una respuesta ACR20 es máxima y alcanza una meseta tras 3 meses. Para la ACR50 la meseta se alcanza tras 4 meses y para la ACR70 la meseta se alcanza tras 6 meses.

50 Sin embargo, los resultados de la terapia combinada de la presente invención muestra varias diferencias. En particular, en las figuras que muestran los resultados corregidos por el placebo se puede ver que se retrasa el inicio del efecto terapéutico; el porcentaje de pacientes que consiguen una puntuación de ACR20 no alcanza más del 5% durante la semana 8. Sin embargo, tras el inicio, el efecto terapéutico aumenta rápidamente tal que la semana 9 el porcentaje de pacientes que consiguen la ACR50 es comparable a la que se alcanza con los ensayos en fase III con los anticuerpos anti-TNF alfa, Humira y Simponi. El porcentaje de pacientes que alcanzan la ACR20, ACR50 y ACR70 aumenta rápidamente entre las semanas 7 a 9 tal que la semana 9 el porcentaje de pacientes ACR20, ACR50 y ACR70 es aproximadamente del 25%, 18% y 17%, respectivamente. Hay que señalar que este porcentaje de pacientes ACR70 no se alcanza en los ensayos con Humira y Simponi hasta 24 a 26 semanas tras el inicio del tratamiento.

60 Además, los presentes inventores han señalado que el número de efectos secundarios adversos apreciados con la terapia de combinación de BT061 y MTX es menor que el que se aprecia en los ensayos llevados a cabo utilizando BT061 solo, y por lo tanto el MTX tiene la capacidad de reducir los efectos secundarios de los anticuerpos terapéuticos que activan las células T reguladoras CD4+ CD25+.

65 Estos resultados demuestran la eficacia y las ventajas sorprendentes de la combinación de un agente capaz de activar las células T reguladoras CD4+ CD25+ y el MTX de la presente invención en el tratamiento de la enfermedad reumática.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Biotest AG
 - 5 <120> Composición Farmaceutica para el Tratamiento de Enfermedades
 - <130> 322248.WO/JND/CJS
 - <160> 16
 - 10 <170> PatentIn versión 3.3
 - <210> 1
 - <211> 124
 - 15 <212> PRT
 - <213> Secuencia artificial
 - <220>
 - 20 <223> Dominio V de cadena H del anticuerpo hB-F5H37L humanizado
 - <400> 1
- ```

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
 20 25 30

Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

```
- 25 <210> 2
  - <211> 111
  - <212> PRT
  - <213> Secuencia artificial
  - <220>
  - 30 <223> Dominio V de cadena K del anticuerpo hB-F5L4M humanizado
  - <400> 2

ES 2 528 419 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 3  
 <211> 550  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Parte de plásmido que codifica el dominio V de la cadena H del anticuerpo hB-F5 humanizado  
 <400> 3

gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcattcttc tgcctgtgct gggcctccca 60  
 tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg aggggtgttt 120  
 cactttgctg tttccttttg tctccagggtg tctgtcaga ggaacagctt gtggagtctg 180  
 ggggaggctt ggtgaaaccc ggaggttctc tgaggetctc ctgtgcagcc tegggtttca 240  
 gtttcagtga ctgccggatg tactgggttc gccaggctcc agggaagggg ctggagtgga 300  
 ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag tctgtgaggg 360  
 gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggg ctatctgcag atgaacagct 420  
 tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgctc ctattatagg tacgagctgg 480  
 gggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca ggtaagaatg 540  
 gccaaagcttg 550

<210> 4  
 <211> 498  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 528 419 T3

<220>

<223> Parte de plásmido que codifica el dominio V de la cadena K del anticuerpo hB-F5 humanizado

<400> 4

5

```

ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta aatgacatat 60
ttcaattata tctgagacag cgtgtataag tttatgtata atcattgtcc attcctgact 120
acagggtgct acggggacat cgtgatgacc cagtctccag actcctggc tgtgtctctg 180
ggcgagaggg ccacatcaa ctgcagggcc agcaaaagtg tcagtacatc tggctacagt 240
tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgctcat ttaccttgca 300
tccatcctag aatctggggt ccctgaccga ttcagtggca gcgggtctgg gacagatttc 360
actctcacca tcagcagcct gcaggctgaa gatgtggcag tttattactg tcagcacagt 420
agggaacttc cgtggacggt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacg tgagtagaat 480
ttaaatttta agcttctt

```

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 5

```

Gln Glu Tyr Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
20 25 30

Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

```

15

ES 2 528 419 T3

<210> 6  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Gly  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

10 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

20 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 8

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

ES 2 528 419 T3

<210> 9  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 9

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

10 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 10

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 1 5 10

20 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

30 <210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly  
 1 5 10

35 <400> 12

40 <210> 13  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr  
 20 25 30



ES 2 528 419 T3

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 14  
                   Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   1                  5                  10  
 10 <210> 15  
       <211> 124  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
       <223> Domino V de cadena H del anticuerpo hB-F5H37V humanizado  
       <400> 15  
                   Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
                   1                  5                  10                  15  
                   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys  
                   20                  25                  30  
                   Arg Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                  40                  45  
                   Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu  
                   50                  55                  60  
                   Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
                   65                  70                  75                  80  
                   Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                  90                  95  
 20 Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala  
                   100                  105                  110  
                   Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                  120  
 25 <210> 16  
       <211> 111  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
       <223> Dominio V de cadena K del anticuerpo hB-F5L4L humanizado  
       <400> 16

ES 2 528 419 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
                  20                   25                   30

Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
          35                   40                   45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp  
      50                   55                   60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65                   70                   75                   80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
          85                   90                   95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
          100                   105                   110

## REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende por separado un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ y metotrexato, donde el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende un dominio V de cadena H y un dominio V de cadena L, y donde: (a) el dominio V de cadena H comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y el dominio V de cadena L, comprende las secuencias RASKSVSTSGYSIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) el dominio V de cadena H tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y el dominio V de cadena L tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.
2. Un kit de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de cadena H definido por la SEC ID N° 1 y un dominio V de cadena L definido por la SEC ID N° 2.
3. Un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ y metotrexato como una preparación combinada para su uso simultáneo, por separado o secuencial en medicina, donde el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, y donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.
4. Un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ para su uso en el tratamiento de una enfermedad reumática, donde el agente es para su uso simultáneo, por separado o secuencial con metotrexato como terapia de combinación, donde el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, y donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.
5. Un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ para su uso en el tratamiento de una enfermedad reumática en un paciente, donde el paciente está sometido a tratamiento con metotrexato, en donde el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, y donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.
6. Una composición que comprende metotrexato para su uso en el tratamiento de una enfermedad reumática en un paciente, donde el paciente está sometido a tratamiento con un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+, donde el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado que comprende una cadena H dominio V y una cadena L dominio V, y donde: (a) la cadena H dominio V comprende las secuencias DCRMV, VISVKSENYGANYAESVRG y SYRYDVGAWFAY, y la cadena L dominio V comprende las secuencias RASKSVSTSGYSIY, LASILES y QHSRELPWT; y/o (b) la cadena H dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 1 y la cadena L dominio V tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2.
7. Un agente capaz de activar células T reguladoras CD4+ CD25+ para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el tratamiento de una enfermedad reumática en un paciente que no responde al tratamiento con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD), preferentemente donde el DMARD es metotrexato.
8. Un agente o composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 donde la enfermedad reumática se selecciona de entre la artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis reumatoide juvenil y espondilitis anquilosante, y preferentemente donde la enfermedad reumática es la artritis reumatoide.
9. Un agente o composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde el agente es adecuado para su administración como una dosis única, como parte de una pluralidad de dosis, o una vez cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas.
10. Un agente o composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 con un agente terapéutico adicional adecuado para el tratamiento de la enfermedad, seleccionado de entre un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un antiinflamatorio esteroideo, un compuesto de oro, un fármaco anti-malaria, ácido fólico, ciclosporina, leflunomida, azatioprina, sulfasalazina, d-penicilamina, ciclofosfamida, micofenolato, minociclina y cloramucilo.

11. Un agente o composición para su uso con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10 donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende una cadena H dominio V definido por la SEC ID N° 1 y una cadena L dominio V definido por la SEC ID N° 2.
- 5 12. Un método que comprende la preparación de un kit que comprende el agente y el metotrexato de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

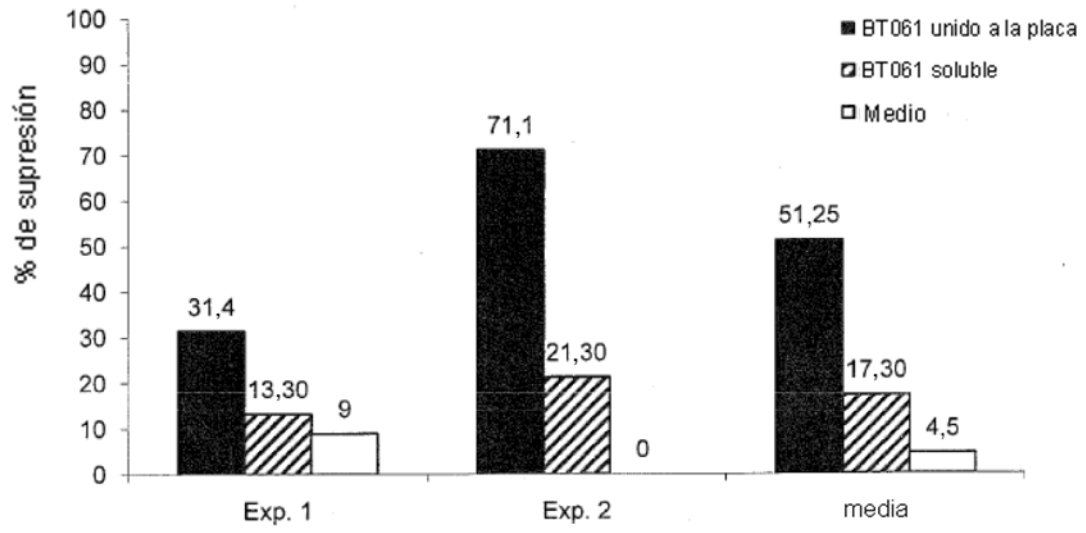


FIGURA 1

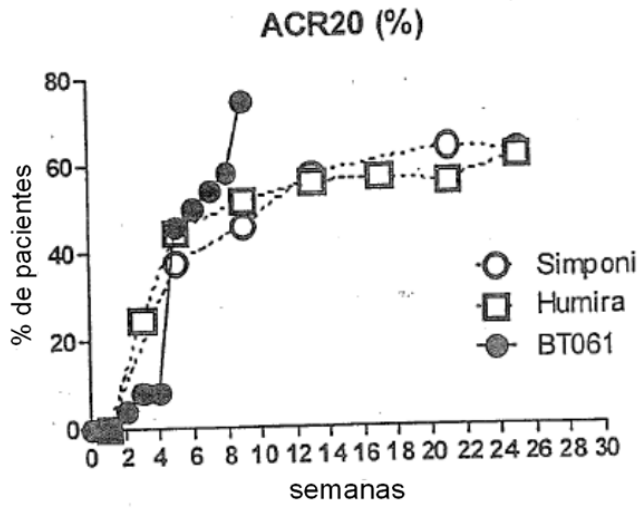


FIGURA 2A

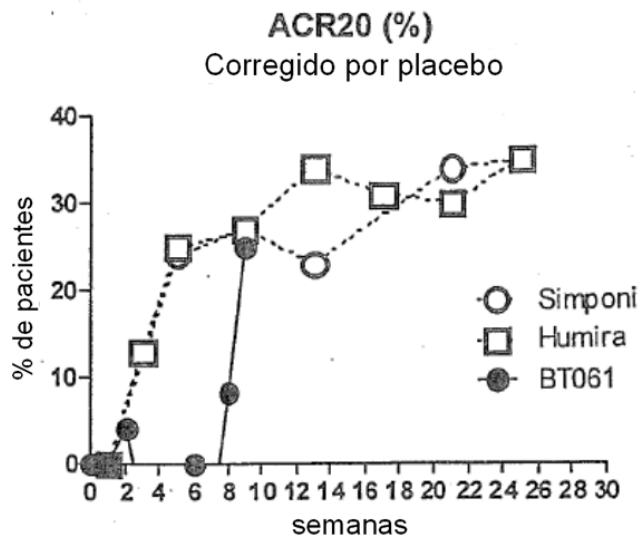


FIGURA 2B

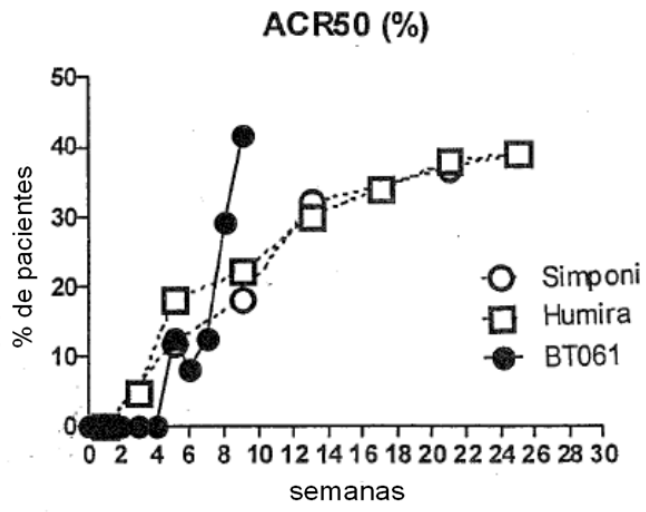


FIGURA 3A

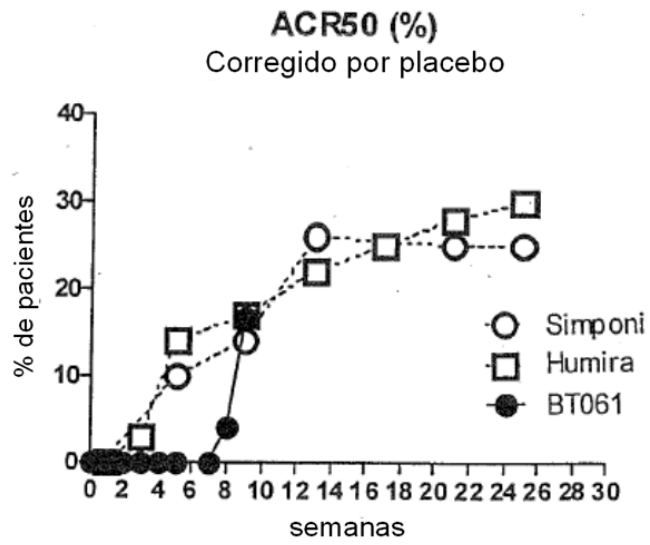


FIGURA 3B

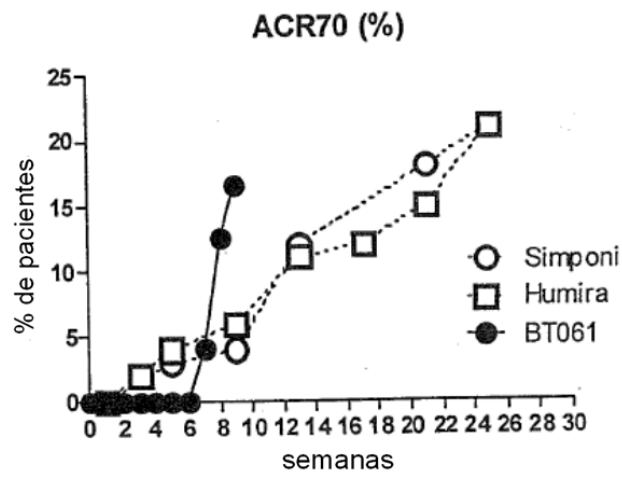


FIGURA 4A

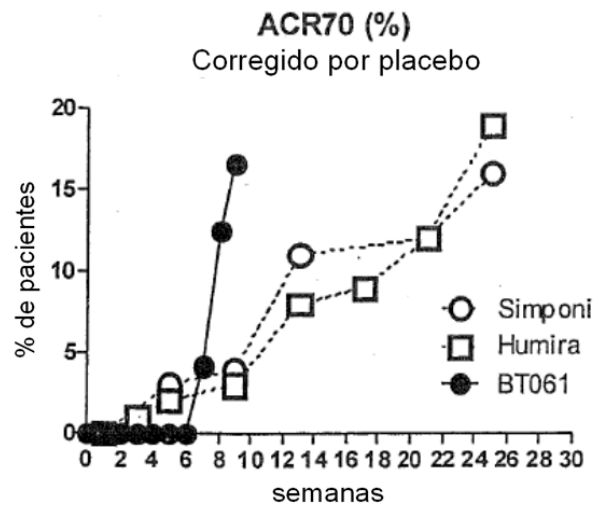


FIGURA 4B





GGA GGA TCC AAT TAT CTG CTG ACT TAT AAT ACT ACT AGA AAG CAA ATT TAA ATG ACA  
TAT TTC AAT TAT ATC TGA GAC AGC GTG TAT AAG TTT ATG TAT AAT CAT TGT CCA TTC  
CTG ACT ACA GGT GCC TAC GGG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT  
D I V M T Q S P D S L A  
GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA  
V S L G E R A T I N C R A S K S V S T  
TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG  
S G Y S Y I Y W Y Q Q K P G Q P P K L  
CTC ATT TAC CTT GCA TCC ATC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC  
L I Y L A S I L E S G V P D R F S G S  
GGG TCT GGC ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA  
G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A  
GTT TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGC ACC AAG  
V Y Y C Q H S R E L P W T F G Q G T K  
GTG GAA ATC AAA CGT GAG TAG AAT TTA AAT TTT AAG CTT CTT  
V E I K

FIGURA 6

ES 2 528 419 T3

|          | FR1                     |                 | CDR1            |   |  | FR2             |  |
|----------|-------------------------|-----------------|-----------------|---|--|-----------------|--|
|          | 1                       | 2               | 3               | 4 |  |                 |  |
|          | 12345678901234567890123 |                 | 456777778901234 |   |  | 567890123456789 |  |
|          | ABCD                    |                 |                 |   |  |                 |  |
| mB-F5    | DIVLTQSPSSLVVSLGQRATISC | RASKSVSTSGYSYIY | WYQQIPGQPPKLLIY |   |  |                 |  |
| hB-F5L4M | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC | RASKSVSTSGYSYIY | WYQQKPGQPPKLLIY |   |  |                 |  |
| hB-F5L4L | -----                   | -----           | -----           |   |  |                 |  |
| FK-001   | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC |                 | WYQQKPGQPPKLLIY |   |  |                 |  |

|          | CDR2    |                 | FR3                              |   |  |
|----------|---------|-----------------|----------------------------------|---|--|
|          | 5       | 6               | 7                                | 8 |  |
|          | 0123456 |                 | 78901234567890123456789012345678 |   |  |
| mB-F5    | LASILES | GVPCRFSGSGSGTDF | LTNIHPVEEEDAATYYC                |   |  |
| hB-F5L4M | LASILES | GVPDRFSGSGSGTDF | LTISLQAEDVAVYYC                  |   |  |
| hB-F5L4L | -----   | -----           | -----                            |   |  |
| FK-001   |         | GVPDRFSGSGSGTDF | LTISLQAEDVAVYYC                  |   |  |

|          | CDR3      |            | FR4        |  |
|----------|-----------|------------|------------|--|
|          | 9         | 10         |            |  |
|          | 901234567 |            | 8901234567 |  |
| mB-F5    | QHSRELPWT | FGGGTKLEIK |            |  |
| hB-F5L4M | QHSRELPWT | FGQGTKVEIK |            |  |
| hB-F5L4L | -----     | -----      |            |  |
| FK-001   |           | FGQGTKVEIK |            |  |

FIGURA 7

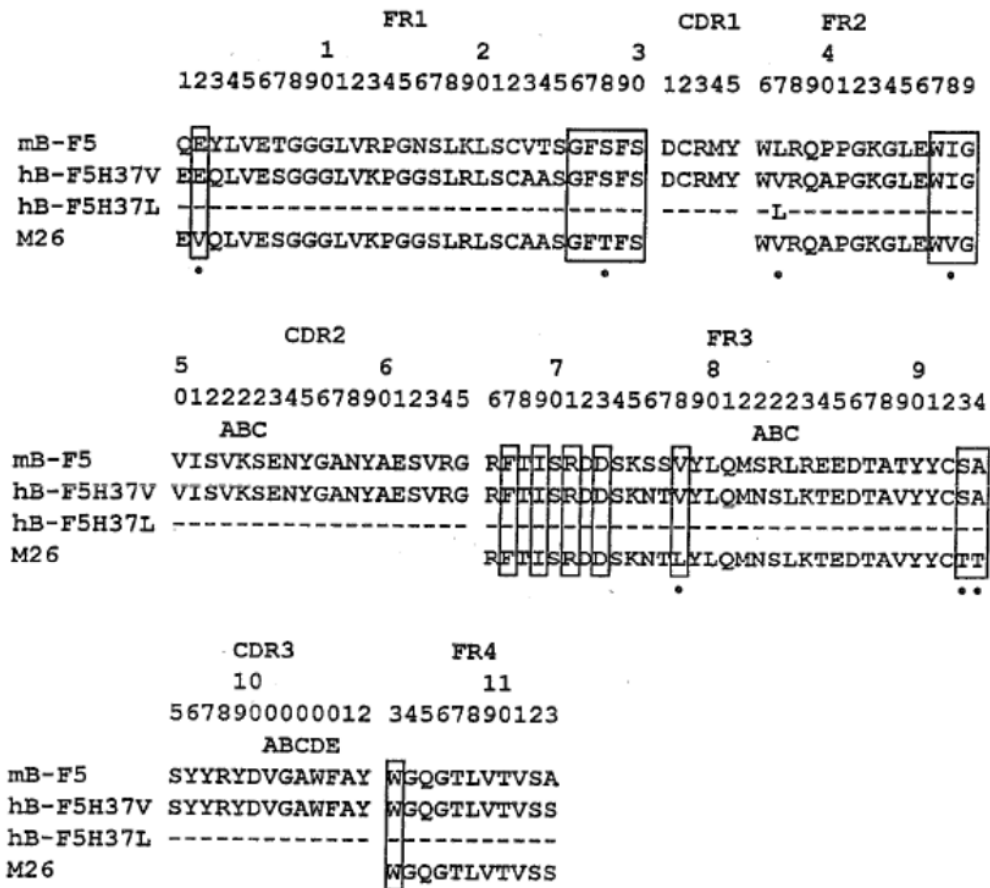


FIGURA 8