

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 217**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09729626 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2262838**

54 Título: **Agente para tratar enfermedades**

30 Prioridad:

13.03.2008 GB 0804684

29.09.2008 GB 0817810

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

09.05.2016

73 Titular/es:

BIOTEST AG (100.0%)

Landsteinerstr. 5

63303 Dreieich, DE

72 Inventor/es:

GERMER, MATTHIAS;

OSTERROTH, FRANK;

AIGNER, SILKE;

UHEREK, CHRISTOPH;

KRAUS, ELMAR;

WARTENBERG-DEMAND, ANDREA;

WOLF, DANIELE;

KAISER, SIBYLLE;

LINDNER, JUERGEN;

BRUECHER, CHRISTOPH;

DAELKEN, BENJAMIN y

SCHULZ, GREGOR

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

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

ES 2 569 217 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

Agente para tratar enfermedades

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunes. La invención implica un agente que es un anticuerpo monoclonal humanizado que se puede administrar a pacientes en dosificaciones más elevadas de las descritas anteriormente. Es particularmente eficaz para pacientes que tienen enfermedades o características que requieren dosis más elevadas para tratamiento eficaz. La descripción concibe una composición farmacéutica que comprende el agente, tal como el anticuerpo, en concentración eficaz, así como usos y métodos de tratamiento que
10 usan las composiciones y medicamentos que comprenden el agente.

La autoinmunidad es la imposibilidad de un organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (a niveles submoleculares) como "auto", lo que da como resultado una respuesta inmune contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que como resultado una respuesta inmune anómala de este tipo se denomina una
15 enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes incluyen esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide (RA), psoriasis, artritis psoriática, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia gravis (MG), síndrome poliglandular autoinmune de tipo II (APS-II), tiroiditis de Hashimoto (HT), diabetes de tipo 1 (T1D), lupus sistémico eritematoso (SLE) y síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALS).

20 La enfermedad autoinmune se produce cuando los linfocitos T reconocen y reaccionan a las 'auto' moléculas, es decir, moléculas producidas por las células del hospedador. La activación de los linfocitos T 'autorreactivos' mediante presentación de autoantígenos procesados por las células que presentan antígenos (APC) conduce a su expansión clonal y a la migración a los tejidos específicos, donde inducen inflamación y destrucción del tejido.

25 Normalmente, los linfocitos T son tolerantes con respecto al tejido autólogo y solamente reaccionan a la presentación de estructuras heterólogas. La tolerancia central y la tolerancia periférica comprenden los dos mecanismos mediante los que el sistema inmunológico dificulta a los linfocitos T autorreactivos en la inducción de sus funciones perjudiciales. La tolerancia central está mediada a través de selección negativa. Este proceso conlleva la eliminación, a través de supresión clonal, de linfocitos T autorreactivos, durante el desarrollo ontogénico en el
30 timo.

La tolerancia periférica es el respaldo disponible si falla la tolerancia central y las células autorreactivas escapan del timo. Este mecanismo de tolerancia se produce de forma continua durante toda la vida, manteniendo las células autorreactivas en comprobación a través de ignorancia inmunológica (anergia), delección periférica y/o supresión
35 activa.

Los linfocitos T reguladores (Tregs, también denominados anteriormente "células supresoras"), como parte de supresión activa, mantienen la tolerancia periférica y regulan la autoinmunidad (Suri-Payer *et al.*, J Immunol. 157: 1799-1805 (1996); Asano *et al.*, J Exp. Med. 184: 387-396 (1996); Bonomo *et al.*, J. Immunol. 154: 6602-6611 (1995); Willerford *et al.*, Immunity 3: 521-530 (1995); Takahashi *et al.*, Int. Immunol. 10: 1969-1980 (1998); Salomon *et al.*, Immunity 12: 431-440 (2000); Read *et al.*, J Exp. Med. 192: 295-302 (2000). En general, los linfocitos T reguladores inhiben la dirección y/o función del tipo 1 de linfocitos T auxiliares (TH1) y células efectoras TH2. La desregulación de la frecuencia o funcionamiento de linfocitos Treg puede conducir a enfermedades autoinmunes debilitantes (Baecher-Allan *et al.*, Immunol. Review 212: 203-216 (2006); Shevach, Annu. Rev. Immunol. 18: 423-449 (2000); Salomon *et al.*, Immunity 12: 431-440 (2000); Sakaguchi *et al.*, Immunol. Rev. 182: 18- 32 (2001)).
45

Se han caracterizado varios subconjuntos de linfocitos reguladores T. La familia Tregs consiste en dos subconjuntos fundamentales: Tregs de aparición natural, por ejemplo CD4⁺CD25⁺ e inducidos de forma periférica, Tregs Tr1 y Th3. Además, NKTregs y Tregs CD8⁺ se han descrito en seres humanos y roedores (Fehérvári *et al.*, J. Clin. Investigation 114: 1209-1217 (2004)).
50

Los linfocitos Treg derivados del timo (Treg CD4⁺CD25⁺ de origen natural) son las principales células reguladoras implicadas en la regulación de la autoinmunidad o respuestas inmunes patológicas:

55 i) son linfocitos T CD4⁺ y constituyen un 5-10 % de los linfocitos T CD4⁺ periféricos
ii) maduran en el timo
iii) por lo general se caracterizan por la expresión combinada del receptor IL-2 (CD25), la isoforma de bajo peso molecular de la molécula CD45, CD 152 (CTLA-4), y el factor de transcripción FoxP3.

60 La función de los Tregs se observa mejor a modo de ejemplo con experimentos que implican la reconstitución de ratones atímicos inmunodeficientes con linfocitos CD4⁺ que fueron privados de linfocitos CD25⁺. Los ratones atímicos reconstituidos con CD4⁺CD25⁻ desarrollan diversas enfermedades autoinmunes específicas de órganos, tales como gastritis, ooforitis, orquitis, y tiroiditis (Suri-Payer *et al.*; J. Immunol. 160: 1212-1218 (1998)).

65 La inclusión del subconjunto CD4⁺CD25⁺ en experimentos de reconstitución con ratones atímicos evita el inicio de estas enfermedades (Sakaguchi *et al.*, J Immunol. 155: 1151-1164 (1995)). El valor protector de los linfocitos

CD4⁺CD25⁺ con respecto a la autoinmunidad específica de órganos también se ha mostrado en otros varios modelos de autoinmunidad (por ejemplo, gastritis autoinmune, prostatitis, ooforitis, glomerulonefritis, epididimitis y tiroiditis) causada por timectomía neonatal producida 3 días después del nacimiento (d3Tx) o enfermedad inflamatoria del intestino causada por reconstitución de ratones SCID con CD45RB elevado, linfocitos T CD4⁺CD25⁺.

5 La administración de anticuerpo anti-CD25 *in vivo* en ratones también enfermedad autoinmune localizada en órganos.

El descubrimiento de la importancia del regulador de la transcripción, FoxP3, en la función de los linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺ y las observaciones previas de que pacientes con síndrome IPEX (desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía y herencia ligada al cromosoma X), una enfermedad inflamatoria grave similar a la observada en ratones deficientes en células reguladoras de CD4⁺CD25⁺ (síndrome escamoso), tienen mutaciones en *FoxP3*, proporcionaron una correlación directa entre un modelo de animal a autoinmune, linfocitos T reguladores de ratón, y una enfermedad autoinmune humana (Sakaguchi *et al.*, *J Immunol.* 155: 1151-1164 (1995)).

15 El mecanismo farmacéutico de los linfocitos T reguladores no está totalmente claro. Los Tregs CD4⁺CD25⁺ inhiben la activación policlonal y específica de antígeno de los linfocitos T. La supresión está mediada por un mecanismo que depende del contacto celular que requiere la activación de los Tregs CD4⁺CD25⁺ a través de TCR pero los Tregs no muestran una respuesta proliferativa después de la activación por la estimulación de TCR con anticuerpos mitogénicos (anérgicos) (Shevach, *Nature Rev. Immunol* 2 : 389 (2002)). Una vez estimulados, son competentes para suprimir, de una manera dependiente del antígeno, la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ y de los linfocitos T CD8⁺ así como para inhibir la activación de los linfocitos B y su expansión clonal.

Hay datos adicionales que indican que la actividad supresora de los Tregs CD4⁺CD25⁺ también se basa en parte en citoquinas antiinflamatorias tales como TGF-β (Kingsley *et al.*, *J Immunol.* 168: 1080 (2002); Nakamura *et al.*, *J Exp. Med.* 194: 629-644 (2001)). La significancia funcional de la secreción de TGF-β está apoyada además por los hallazgos de que los ratones con déficit de TGF-β desarrollan enfermedad autoinmune y que esa administración de anticuerpos de neutralización para TGF-β anula *in vivo* la prevención de la autoinmunidad o actividad de inducción de tolerancia de los linfocitos T CD4⁺ en algunos modelos.

30 Dentro del subconjunto de linfocitos T CD4⁺, pueden existir al menos 2 tipos de células diferentes más con función supresora, que se inducen después de exposición a antígeno exógeno, específico (denominados 'linfocitos T reguladores adaptativos o inducibles'): linfocitos T reguladores de Tipo 1 (Tr1) y linfocitos Th3. Parece que estos tipos de células se pueden distinguir de los Tregs CD4⁺CD25⁺ basándose en sus perfiles de producción de citoquinas. Sin embargo, la relación entre estos tipos diferentes no es clara y los modos de acción se superponen.

35 Los linfocitos Tr1 se indujeron mediante estimulación de TCR repetitiva en presencia de IL-10 y se mostró que regulan de forma negativa principalmente las respuestas inmunes a través de la producción de niveles elevados de IL-10 junto con cantidades moderadas de TGF-β (Chen *et al.*, *J. Immunol.* 171: 733-744 (2003)).

40 Los linfocitos Th3 (identificados en un modelo de EAE después de administración oral de antígeno) producen cantidades elevadas de TGF-β y cantidades variables de IL-4 e IL-10. Se mostró que IL-4, por sí mismo, era un factor fundamental para la diferenciación de los linfocitos Th3, al contrario que los linfocitos Tr1 que se diferencian con IL-10 (Chen *et al.*, *Science* 265: 1237-1240 (1994)).

45 La supresión de la función de los linfocitos T con el uso de fármacos inmunosupresores es una estrategia terapéutica fundamental que se ha usado de forma satisfactoria para tratar enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estos fármacos inducen una inmunosupresión general debido a su escasa selectividad, dando como resultado la inhibición, no solamente de las funciones perjudiciales del sistema inmune, sino también las útiles. Como consecuencia, se pueden producir varios riesgos como infección, cáncer y toxicidad a fármacos.

50 Algunos agentes que interfieren con la función de los linfocitos T son pilares terapéuticos para diversas enfermedades autoinmunes.

Hasta ahora se ha demostrado que el enfoque para el uso de estos agentes destinados a la activación de los linfocitos T reguladores para la terapia de enfermedades autoinmunes es extremadamente difícil. La activación de los Tregs a través de TCR usando el anticuerpo OKT-3 anti-CD3 agonístico (Abramowicz *et al.*, *N Engl. J Med.* 1992 Sep 3; 327 (10): 736) o a través de la molécula coestimuladora, CD28, usando el anticuerpo TGN 1412 anti-CD28 superagonístico conduce a una supresión completa de la población de linfocitos T reguladores así como otros linfocitos T convencionales y la inducción sistémica y liberación de excesivas cantidades de citoquinas proinflamatorias que incluyen IFN-γ, TNF-α IL-1 e IL-2, dando como resultado un síndrome de liberación de citoquinas clínicamente evidente (CRS) en seres humanos (Suntharalingam *et al.*, *N Engl. J Med.* 2006 Sep 7; 355 (10): 1018-28).

65 Después de las primeras dos a tres inyecciones 5 mg del anticuerpo monoclonal, OKT3, la mayoría de los pacientes desarrollar un síndrome de liberación de citoquinas con niveles elevados de factor alfa de necrosis tumoral, interleuquina-2, e interferón gamma que aparece a las 1-2 horas en la circulación de los receptores de trasplante de

riñón. (Abramowicz *et al.*, Transplantation. 1989 Apr; 47 (4): 606-8). Esto da como resultado una estrecha ventana terapéutica que limita la utilidad de este anticuerpo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

5 El tratamiento con una dosis total de 5-10 mg de TGN1412 (0,1 mg de anti-CD28 por kilogramo de peso corporal) conduce a una respuesta inflamatoria sistémica con eficiencia multiorgánica a los 90 minutos después de recibir una sola dosis intravenosa del TGN 1412 (Suntharalingam *et al.*, N Engl. J Med. 2006 Sep 7; 355 (10): 1018-28).

10 Por lo general se está de acuerdo con que los linfocitos T CD4 desempeñan un papel fundamental en el inicio y en el mantenimiento de la autoinmunidad. Por consiguiente, se ha propuesto el uso de los mAb con respecto a moléculas de la superficie de linfocitos T CD4, y en particular los mAb anti-CD4, como agentes inmunosupresores. Aunque numerosos estudios clínicos confirmaron el interés potencial de este enfoque, también plantean varias cuestiones a abordar para preparar mAb anti-CD4 más adecuados para su uso en la práctica clínica de rutina.

15 Se han propuesto varios mecanismos de acción diferentes para los mAb CD4 que incluyen: (1) antagonismo de interacciones CD4-MHC II que dan como resultado la inhibición de la activación de linfocitos T, (2) modulación del receptor CD4 como se determina mediante una disminución de la expresión de la superficie celular de CD4, (3) señalización parcial a través del receptor CD4 en ausencia de reticulación de receptor de linfocitos T que puede suprimir la activación de linfocitos T posterior y desencadenar la muerte apoptótica de los linfocitos T CD4, (4) citotoxicidad dependiente de complemento mediada por Fc (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que conduce a supresión de linfocitos T CD4, y (5) estimulación de linfocitos T reguladores.

20 La citotoxicidad dependiente de complemento mediada por Fc (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que conduce a suspensión de linfocitos T CD4 es el mecanismo principal observado y se demuestra especialmente para anticuerpos de la subclase IgG1. Solamente unos pocos anticuerpos CD4 se han atribuido a los otros mecanismos como TRX-1, TNX-355, IDEC-151, OKTcdr4A con solamente TRX-1 siendo una IgG1 (Schulze-Koops *et al.*, J Rheumatol. 25 (11): 2065-76 (1998); Mason *et al.*, J Rheumatol. 29 (2): 220-9 (2002); Choy *et al.*, Rheumatology 39 (10): 1139-46 (2000); Herzyk *et al.*, Infect Immun. 69 (2): 1032-43 (2001); Kon *et al.*, Eur Respir J. 18 (1): 45-52 (2001); Mourad *et al.*, Transplantation 65 (5): 632-41 (1998); Skov *et al.*, Arch Dermatol. 139 (11): 1433-9 (2003); Jabado *et al.*, J Immunol. 158 (1): 94-103 (1997)).

30 La supresión de linfocitos T CD4⁺ dependiente de la dosis a dosis "elevadas" (múltiples ciclos con dosificaciones > 100 mg) y secuestro transitorio (supresión de corta duración) a dosis "más bajas" (múltiples ciclos con dosificaciones > 10 mg), se observa con varios anticuerpos CD4 (Mason *et al.*, J. Rheumatol. 29 (2): 220-229 (2002); Kon *et al.*, Eur. Respir J. 18 (1): 45-52 (2001)) y HuMax-CD4 (Skov *et al.*, Arch Dermatol. 139 (11): 1433-1439 (2003), Choy *et al.*, Rheumatology 41 (10): 1142-8 (2002)). A pesar de su actividad de supresión, los mAb con respecto a CD4 fracasaron en la provisión de beneficio clínico y eficacia coherente en enfermedades autoinmunes investigadas por ejemplo artritis reumatoide (Strand *et al.*, Nature Reviews 6: 75-92 (2007)). Además, por lo general la supresión de los linfocitos T CD4⁺ se considera un escenario, que podría causar inmunosupresión grave.

40 El anticuerpo B-F5 (CD4anti-humano de IgG1 murina) se sometió a ensayo en diferentes enfermedades autoinmunes.

45 Un pequeño número de pacientes con psoriasis grave se trató con el anticuerpo B-F5 murino y se describieron algunos efectos positivos (Robinet *et al.*, Eur J Dermatol 1996; 6: 141-6, y Robinet *et al.*, J Am Acad Dermatol 1997; 36: 582-8).

En pacientes con artritis reumatoide, los resultados observados en un ensayo controlado con placebo con una dosis diaria de B-F5 no indicaban una mejora significativa (Wendling *et al.* J Rheumatol ;25 (8): 1457-61,1998).

50 En pacientes con esclerosis múltiple (MS), se observaron algunos efectos positivos después de un tratamiento de 10 días en pacientes con formas con recaída-remisión, algunos de los cuales todavía están libres de recaída el 6º mes después de la terapia (Racadot *et al.*, J Autoimmun, 6 (6): 771-86, 1993). Rumbach *et al.* (Mutt Scler; 1 (4): 207-12, 1996) observaron algunos efectos similares.

55 En la enfermedad de Crohn grave, no se observó mejora significativa de pacientes que recibían B-F5 durante 7 días consecutivos (Canva-Delcambre *et al.*, Aliment Pharmacol Ther 10 (5): 721-7, 1996).

60 Para prevenir el rechazo a aloinjerto, se informó que la biodisponibilidad de B-F5 no era suficiente para permitir su uso para profilaxis de rechazo a aloinjerto (Dantal *et al.* Transplantation, 27; 62 (10): 1502-6, 1996).

A partir de lo mencionado anteriormente, parece que una primera cuestión a resolver es la necesidad del uso de dosis elevadas de mAb para obtener una mejora clínica. Esto puede resultar, entre otros, de la escasa accesibilidad de los linfocitos al mAb en los tejidos diana. El uso de dosis más elevadas puede dar como resultado una acción excesiva en los linfocitos sanguíneos, luciendo efectos secundarios no deseados.

65 Otro inconveniente de la terapia con anticuerpos monoclonales en seres humanos es que estos anticuerpos por lo

general se obtienen a partir de células de ratón, y provocan respuestas anti-ratón en receptores humanos. Esto no solamente da como resultado una eficacia menor del tratamiento incluso superior para cualquier tratamiento futuro con anticuerpos monoclonales de ratón, sino también un aumento del riesgo de anafilaxis.

5 Este inconveniente, en principio, se puede evitar con el uso de anticuerpos humanizados, obtenidos mediante injerto de las regiones que determinan la complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que determinan la especificidad de la unión al antígeno, en las regiones marco (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. El objetivo de la humanización es obtener un anticuerpo recombinante que tenga las mismas propiedades de unión al antígeno que las del anticuerpo monoclonal de ratón a partir del que se derivaron las secuencias de CDR, y mucho
10 meno inmunogénico en seres humanos.

En algunos casos, la sustitución de las CDR a partir del anticuerpo de ratón para las CDR humanas en marcos humanos es suficiente para transferir las propiedades de unión al antígeno (incluyendo no solamente la especificidad, sino también la afinidad por el antígeno). Sin embargo, en muchos anticuerpos con algunos restos de FR son importantes para unión al antígeno, porque se ponen en contacto directamente con el antígeno en el complejo de anticuerpo-antígeno, o por qué influyen en la conformación de las CDR y por lo tanto en su actuación de unión al antígeno.
15

Por lo tanto, en la mayoría de los casos, también es necesario sustituir uno o varios restos del marco a partir del anticuerpo de ratón para los restos de FR correspondientes humanos. Dado que el número de restos sustituidos debe ser tan pequeño como sea posible para prevenir reacciones anti-ratón, la cuestión es cómo determinar qué resto(s) de aminoácido son fundamentales para retener las propiedades de unión al antígeno. Se han propuesto diversos métodos para predecir los sitios de sustitución más apropiados. Aunque proporcionan principios generales que pueden ser de cierta ayuda en las primeras etapas de la humanización, el resultado final varía de un anticuerpo a otro. Por lo tanto, para un anticuerpo dado, es muy difícil predecir qué sustituciones proporcionarán el resultado deseado.
20
25

Anteriormente se ha intentado realizar la humanización del B-F5 de ratón, y se ha conseguido éxito en la producción de B-F5 humanizado (denominado hB-F5 en lo sucesivo en el presente documento) que tiene propiedades de unión a CD4 similares a las del B-F5 de ratón precursor.
30

Por lo tanto, en el documento WO 2004/083247, se ha encontrado que el anticuerpo BT061 humanizado (B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) es útil para tratar enfermedades autoinmunes, tales como psoriasis y artritis reumatoide. Esta solicitud de patentes divulga composiciones para administración parenteral, formuladas para permitir la administración de una dosis de 0,1-10 mg, preferentemente de 1-5 mg. Los regímenes de dosificación previstos son una dosis intravenosa de 1 mg al día y una dosis de 5 mg cada dos días para pacientes con artritis reumatoide durante un periodo de 10 días. Por lo tanto, la mayor dosis divulgada es de 5 mg de una vez y de 25 mg durante el transcurso de 10 días.
35

El estudio también fue descrito por Wijdenes *et al.*, en un resumen y un póster presentado en la conferencia EULAR, junio de 2005. Se divulgó el tratamiento de 11 pacientes que padecían artritis reumatoide. Los pacientes se trataron con 5 infusiones intravenosas de 5 mg BT061 cada dos días con tratamiento simultáneo con 150 mg Diclofenaco.
40

No se divulga que el anticuerpo descrito en este estudio sea adecuado para su uso en dosis más elevadas, y todavía es deseable encontrar tratamientos a dosis más elevadas para tratar a número de pacientes más elevado.
45

Habiendo contemplado la técnica anterior mencionada anteriormente, un objetivo de la presente invención es tratar a pacientes que tengan una enfermedad autoinmune que todavía no ha respondido de forma satisfactoria a los tratamientos existentes. En particular, un objetivo de la presente invención es encontrar tratamientos autoinmunes que se puedan aplicar en dosis elevadas a los pacientes, con el fin de mejorar la respuesta al tratamiento para los pacientes que en la actualidad no responden.
50

De forma sorprendente, los experimentos realizados por los inventores revelaron que el anticuerpo BT061 de IgG1, al contrario que los otros mAb de CD4, una vez unidos a CD4 de células diana, ni induce ADCC, ni CDC ni apoptosis.
55

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 20 mg a 100 mg, donde la dosis se debe administrar de forma semanal, y donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:
60

- dominio V de cadena H:

65

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYQLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

5

La invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 8 a 60 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto, donde la dosis se debe administrar de forma semanal, y donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

10

- dominio V de cadena H:

15

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYQLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1) ¶

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

20

Además adicionalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 0,2 a 1,5 mg/kg, donde la dosis se debe administrar de forma semanal, and donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

25

- dominio V de cadena H:

30

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYQLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1) ¶

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

35

Además, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺ para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

40

- dominio V de cadena H:

EEQLVESGGGLVKGKGLRSLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSNEYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYVYLMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1) ¶

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYVYQKPGQPPKLLIYLASILESG
 5 VPDFRFGSGSGTDFLTITSSLAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 2),

y donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de: (i) de 20 mg a 100 mg; (ii) de 8 a 60 mg/m de área de superficie corporal del sujeto, o (iii) de 0,2 a 1,5 mg/kg, donde la dosis se debe administrar de forma semanal.

A partir de las dosificaciones mencionadas anteriormente se observará que los inventores han encontrado que, de forma sorprendente con el anticuerpo BT061 humanizado (B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) no modulaba ni inducía sustancialmente la liberación de citoquinas proinflamatorias en comparación con otros anticuerpos que interactúan con linfocitos T, por ejemplo anticuerpos anti-CD3. Además, el anticuerpo no causa supresión de linfocitos CD4⁺ sustancial a largo plazo.

La concentración del anticuerpo no se ve limitada especialmente, con la condición de que esté presente en una concentración que es elevada en comparación con concentraciones conocidas. Sin embargo, preferentemente, la concentración del anticuerpo es de 10 (o superior a 10) a 150 mg/ml, de 15 a 150 mg/ml, de 15 a 100 mg/ml, de 15 (o superior a 15) a 75 mg/ml, o de 20 a 60 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del anticuerpo es (aproximadamente) una cualquiera de 10 mg/ml, 12,5 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

El volumen de dosificación aplicado a un sujeto usando la composición no se ve limitado especialmente, con la condición de que administre una dosificación general elevada en comparación con dosificaciones ya se conocen, y por lo tanto es adecuado para el tratamiento de individuos que se pueden beneficiar de dosis elevadas tales como, pero no limitados a, varios casos con una larga historia de la enfermedad y respuesta insuficiente a terapias actuales. En particular, la concentración de anticuerpos dentro de los volúmenes de dosificación se puede variar para proporcionar las dosis requeridas, que se describen en la presente solicitud.

El volumen de dosificación variará dependiendo del método de administración. Cuando la composición se debe administrar mediante inyección subcutánea, el volumen de dosificación puede estar entre 0,1 y 3 ml, preferentemente entre 0,5 y 1,5 ml, y por lo general aproximadamente 1 ml.

Sin embargo, en algunas realizaciones, la composición se puede proporcionar en forma concentrada y diluir hasta la concentración requerida para los individuos en cuestión. Preferentemente, en estas situaciones, la composición se proporciona en volúmenes relativamente pequeños de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 ml. En realizaciones alternativas, la composición se proporciona en la concentración y volumen de dosificación requeridos descritos anteriormente (es decir, listo para administración). En una realización específica, las composiciones farmacéuticas para administración subcutánea se proporcionan en una forma lista para administración de modo que se pueden administrar fácilmente por personal no médico.

Como ya se ha mencionado, anteriormente, no se sabía que algunos agentes capaces para de tratar enfermedades autoinmunes se podían administrar en las dosificaciones elevadas que se prevén con la presente invención. Aunque las dosis conocidas de agentes capaces de tratar enfermedades autoinmunes son eficaces en algunos individuos o tipos de enfermedad, la comprensión de que se puede tolerar en dosis más elevadas ha abierto la vía de tratamiento más eficaz de algunas enfermedades autoinmunes y clases de pacientes.

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

La Figura 1 muestra el efecto de BT061 en la síntesis de citoquinas de cultivos de sangre completa de 3 donantes. Los cultivos se estimularon en experimentos separados con 4 tipos de activadores diferentes: CD3 = anticuerpos anti-CD3; LPS lipopolisacárido; PHA = fitohemaglutinina + anticuerpos anti-CD28; SEB = enterotoxina B estafilocócica + anticuerpos anti-CD28. Se determinaron determinadas citoquina es para medir los efectos en diversas subpoblaciones de leucocitos: células Treg (CD3: TGF- β , IL-10); monocitos/macrófagos (LPS: IL-10, TNF α , IL-1 β); células Th2 (PHA: IL-4, IL-5, IL-13); células Th1 (SEB: IL-2, IFN γ);

La Figura 2 muestra el efecto de BT061 en cultivos de sangre completa humana (donantes con artritis reumatoide) en la síntesis de citoquinas desencadenada por diferentes estimulantes;

La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la región V_H de B-F5 de ratón (SEQ ID No: 5);

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la región V_k de B-F5 de ratón (SEQ ID No: 6);

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 3) de un fragmento del plásmido que codifica la región V_H of BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está subrayada y la correspondiente secuencia de polipéptidos (SEQ ID No: 17) está indicada debajo de la secuencia de nucleótidos;

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 4) de un fragmento del plásmido que codifica las regiones V_k de BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está subrayada y la correspondiente secuencia de polipéptidos (SEQ ID No: 2) está indicada debajo de la secuencia de nucleótidos;

Las Figuras 7A y 7B respectivamente muestran la liberación de TNF α e IL-6 observada en un ensayo clínico con BT061 (una sola infusión intravenosa o inyección subcutánea) en voluntarios sanos en comparación con los niveles informados con los anticuerpos monoclonales anti-CD3. Los niveles de dosis y tiempo de recuperación se incluyen en las figuras. Los resultados para TRX4 indicados en las Figuras como "2)" se informan en Keymeulen *et al.*, 2005 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes patients. Los resultados para Teplizumab indicados en las Figuras como "3)" se informa en Herold *et al.*, 2002 N. Engl. J. Med. Type I Diabetes patients. Los valores normales indicados en las Figuras con "4)" se informa en Straub *et al.*, 2007, Athr. & Rheumat. "*" representa una sola dosis, "***)" representa una dosis acumulativa inyectada hasta que se alcanzaba la concentración máxima.

La Figura 8 muestra niveles en plasma de IL-2 e IFN- γ después de administración de una sola dosis intravenosa o subcutánea de BT061 en voluntarios sanos. ULN = límite superior de la normalidad; LLN = límite inferior de la normalidad.

La Figura 9 muestra una cinética de los recuentos de linfocitos CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una sola dosis intravenosa de BT061. Se muestran los valores medios de 3 pacientes por grupo de dosis. Las líneas punteadas indican el límite superior de la normalidad (ULN) y el límite inferior de la normalidad (LLN).

La Figura 10 muestra una cinética de los recuentos de linfocitos CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una dosis subcutánea individual de BT061. Se muestran los valores medios de 3 pacientes por grupo de dosis. Las líneas punteadas indican el límite superior de la normalidad (ULN) y el límite inferior de la normalidad (LLN).

La Figura 11, partes A a H, proporciona gráficos que muestran datos de los ensayos clínicos de pacientes con psoriasis del grupo de dosis I como se describe en el Ejemplo 7, donde los pacientes se tratan con una inyección intravenosa de 0,5 mg de BT061 o un placebo. Las partes A a H de la Figura 8 proporcionan gráficos de las puntuaciones de PASI de los pacientes 1 a 8 del grupo de dosis I, respectivamente.

La Figura 12, partes A a H, proporciona gráficos que muestran datos de los ensayos clínicos de pacientes con psoriasis del grupo de dosis II como se describe en el Ejemplo 7, donde los pacientes se tratan con una inyección intravenosa de 2,5 mg de BT061 o un placebo. Las partes A a H de la Figura 9 proporcionan gráficos de las puntuaciones de PASI de los pacientes 1 a 8 del grupo de dosis II, respectivamente.

La Figura 13, partes A y B proporcionan fotografías del ensayo clínico de pacientes con psoriasis como se describe en el Ejemplo 7. Las fotografías son del mismo paciente que era un miembro del grupo de dosis II. La fotografía mostrada en la parte A se tomó antes del tratamiento. La fotografía mostrada en la parte B se tomó 28 días después del tratamiento.

La Figura 14 proporciona resultados del ensayo clínico de pacientes con artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 8. La figura muestra un gráfico de barras del porcentaje de pacientes de los grupos de dosis que reciben 1,25 mg, 6,25 mg, 12,5 mg y 25 mg de BT061 por vía subcutánea que consiguen al menos una respuesta de ACR20. Seis pacientes en cada grupo recibieron la dosis de anticuerpo mientras que dos pacientes recibieron un placebo.

Las Figuras 15A y 15B proporcionan resultados del ensayo clínico de pacientes con artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 15A muestra un gráfico de barras del número de articulaciones sensibles para pacientes del grupo de dosis que reciben 25 mg de BT061 por vía subcutánea. La Figura 15B muestra un gráfico de barras del número de articulaciones hinchadas en pacientes del mismo grupo de dosis. Seis pacientes de cada grupo recibieron la dosis de anticuerpo mientras que dos recibieron un placebo.

Las Figuras 16A y 16B proporcionan resultados del ensayo clínico de pacientes con artritis reumatoide como se

describe en el Ejemplo 8. Las Figuras muestran los cambios de los parámetros individuales (en %) para un individuo que responde (Figura 16A) y un individuo que no responde (Figura 16B) del grupo de dosis de 25 mg por vía subcutánea. En las Figuras "EG del Pac" y "EG del Méd" se hace referencia a la evaluación global del paciente y la evaluación global del médico, respectivamente. La expresión "EP del dolor" se refiere a la evaluación del dolor del paciente.

Las Figuras 17A y 17B proporcionan resultados adicionales del ensayo clínico de pacientes con artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 8. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis de 1,25 mg por vía subcutánea (Figura 17A) y del grupo de dosis de 6,25 mg por vía subcutánea (Figura 17B).

Las Figuras 18A y 18B proporcionan resultados adicionales del ensayo clínico de pacientes con artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 8. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis de 50 mg por vía subcutánea (Figura 18A) y del grupo de dosis de 6,25 mg por vía intravenosa (Figura 18B).

La Figura 19 muestra el alineamiento de las secuencias de polipéptidos de V_K de B-F5 murino (SEQ ID No: 8), FK-001 (SEQ ID Nos: 9, 10, 11 y 12), L4L (SEQ ID No: 18), y L4M (SEQ ID No: 2) en el diseño de la forma humanizada de B-F5 (es decir, BT061).

La Figura 20 muestra el alineamiento de las secuencias de polipéptidos de V_H de B-F5 murino (SEQ ID No: 7), M26 (SEQ ID Nos: 13, 14, 15 y 16), H37L (SEQ ID No: 1), y H37V (SEQ ID No: 17) en el diseño de la forma humanizada de B-F5.

La descripción proporcionará ahora más detalles.

Los agentes que son adecuados para uso en la presente descripción son aquellos que son capaces de activar linfocitos T reguladores de $CD4^+CD25^+$. El agente puede ser un polipéptido, una proteína o un anticuerpo. Cuando el agente es un anticuerpo, este puede ser un anticuerpo monoclonal. Preferentemente con el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD4 monoclonal. El anticuerpo también puede ser preferentemente un anticuerpo IgG1 y puede ser un anticuerpo IgG1 no modificado.

En un aspecto preferente con el agente no causa un aumento sustancial en el nivel de citoquinas proinflamatorias en el plasma de sangre del sujeto después de la administración en comparación con anticuerpos anti-CD3. En particular, los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6 y/o IL-2 después de la administración del agente no aumentan sustancialmente en comparación con los niveles en plasma medidos en sujetos sanos (véase la Tabla A1). De forma específica, si el ULN para una citoquina específica proporcionada en la Tabla A1 se toma como X, entonces dentro de 96 horas después de la administración del agente se puede producir un aumento de X inferior a 20 veces. Preferentemente, puede haber un aumento de X inferior a 10 veces. Más preferentemente, estos niveles se producen durante el periodo de 10 minutos después del inicio de la administración hasta 96 horas después de la finalización de la administración.

En pacientes autoinmunes es posible que los niveles de citoquinas antes de la administración del agente ya sean más elevados que los observados en sujetos sanos (ULN proporcionado en la Tabla A1) debido, por ejemplo, a un estado de activación modificado de células inmunes en comparación con el estado de activación de las células en sujetos sanos. En esos casos, la concentración de una citoquina específica directamente antes de la administración del agente se toma como X y dentro de las 96 horas después de la administración del agente se puede producir un aumento de X inferior a 20 veces. Preferentemente, se puede producir un aumento de X inferior a 10 veces. Más preferentemente, estos niveles se producen durante el periodo de 10 minutos después del inicio de la administración hasta 96 horas después de la finalización de la administración.

Tabla A1: Niveles de citoquinas medidos en plasma de voluntarios sanos. El ULN (límite superior de la normalidad) se calcula basándose en valores medios medidos en 39 sujetos individuales + 2 x desviación estándar.

Citoquina	ULN (pg/ml)
IL-2	19,4
IL-6	4,4
TNF-alfa	2,8
IFN-gamma	3,8

En un aspecto adicional preferente, el agente no causa una disminución sustancial de larga duración en el recuento celular de linfocitos $CD4^+$ en el plasma de sangre del sujeto. De forma específica, dentro del periodo de 72 a 96 horas después de la administración, el recuento celular de linfocitos $CD4^+$ en el plasma de sangre del sujeto puede ser superior a 250 células/ μ l (o al menos 250 células/ μ l).

Preferentemente, los efectos de la citoquina y los linfocitos CD4⁺ descritos anteriormente se observan en al menos un 80 % de los pacientes tratados.

Para evitar el impacto negativo en el sistema inmune, por ejemplo una disminución en el recuento de células linfocíticas o inducción de liberación de citoquinas, en la clínica se sabe como usar anticuerpos (especialmente anticuerpos que interactúan con linfocitos T) de la subclase IgG2, IgG3 o IgG4 porque los anticuerpos de la subclase IgG1 presentan interacciones con el receptor Fc más elevadas. En la técnica también se sabe cómo modificar anticuerpos (especialmente anticuerpos que interactúan con linfocitos T) mediante mutación, desglicosilación, glicosilación o glicoingeniería de Fc para reducir interacciones del receptor Fc.

En los experimentos descritos en el presente documento con los inventores han encontrado que la anulación y modificaciones de anticuerpos de la subclase IgG1 no necesarios para el agente de la presente invención. En particular, los datos presentados en la presente solicitud de patente indican que la gente no presenta una supresión de linfocitos CD4⁺ sustancial ni de larga duración ni inducen liberación de citoquinas sustancial en comparación con los anticuerpos anti-CD3.

Por consiguiente, en un aspecto preferente, el agente es un anticuerpo IgG1 sin modificar, es decir un anticuerpo que no incluye una mutación de Fc, y que no ha sido objeto de desglicosilación, glicosilación ni glicoingeniería para reducir interacciones del receptor Fc, o un fragmento o un derivado del mismo.

Los anticuerpos que son más adecuados para uso en la presente descripción son anticuerpos anti-CD4 humanizados, o fragmentos o derivados de los mismos, que son capaces de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺. Algunos ejemplos de anticuerpos que son capaces de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺ se analizan en Becker *et al.*, (European Journal of Immunology (2007), Vol. 37: páginas 1217-1223).

Por lo general, el anticuerpo usado en la descripción comprende adicionalmente una región constante humana (Fc). Esta región constante sé preseleccionar entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Algunas regiones constantes preferentes se seleccionan entre dominios constantes de IgG, en particular IgG1.

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

En un aspecto particularmente preferente de la presente descripción, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o fragmento o derivado del mismo derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón. Un ejemplo de un anticuerpo de este tipo es el anticuerpo BT061. El anticuerpo BT061, fragmentos y derivados del mismo.

El anticuerpo BT061 (hB-F5) humanizado se deriva de mAb B-F5 de ratón, y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

- dominio V de cadena H: EEQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^CAASGFS^SDCRMYWLR^QA
PGKGLEWIGVIS^KSENYGANYAESVRGRFTISR^DSKNTVYLQ^MNSL^KTE^DTAVY YCSAS YYRYDVGAWFAY-
WGQGLTV^SSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ
KPGQPPKLLIYLA^SILESGVPDRFSGSGSGTDFTLT^SSSLQAEDVAVYYCQHSREL^PWT
FG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

Algunos derivados de este anticuerpo también son adecuados para uso en la presente descripción. Algunos derivados incluyen aquellos que tienen dominios V definidos por las secuencias de polipéptidos que tienen al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, lo más preferentemente al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID No: 2.

Los anticuerpos particularmente preferentes son los que comprenden las regiones que determinan la complementariedad (CDR) del mAb B-F5 de ratón, y retienen la capacidad de hB-F5 para activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺. La ubicación de las CDR dentro de los dominios V_H y V_K se muestra en las Figuras 19 y 20. Tales anticuerpos pueden tener opcionalmente variaciones en la secuencia de las CDR que no influyen sustancialmente en la especificidad y/o afinidad de unión.

Por lo general, el anticuerpo hB-F5 usado adicionalmente comprende una región constante humana (Fc). Como se ha indicado anteriormente con esta región constante se puede seleccionar entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Algunas regiones constantes preferentes se seleccionan entre dominios constantes de IgG, en particular IgG1.

5 La presente descripción también incluye cualquier fragmento de un anticuerpo BT061 que comprende las regiones V del mismo. Este comprende en particular Fab, Fab', F(ab)₂, Fv y fragmentos de scFv.

10 Un polinucleótido que codifica el dominio V de la cadena H o de la cadena L de un anticuerpo BT061 se puede fusionar con un polinucleótido que codifica la región constante de una cadena H o L humana, con la finalidad de expresar las cadenas H y L completas obtenidas de esta manera; también se puede añadir una secuencia que codifica un péptido de señal que permite que la secreción de la proteína.

15 La descripción también hace uso de casetes de expresión donde un polinucleótido, como se ha descrito anteriormente, se une a secuencias de control apropiadas permitiendo la regulación de su transcripción y traducción en una célula hospedadora elegida, y vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o un casete de expresión de la descripción.

20 Estas construcciones de ADN recombinante se pueden obtener e introducir en células hospedadoras con las técnicas bien conocidas de ADN recombinante y de ingeniería genética.

La descripción también hace uso de una célula hospedadora, transformada con un polinucleótido de la descripción.

25 Algunas células hospedadoras útiles dentro del marco de la presente descripción pueden ser células procariotas o eucariotas. Entre las células eucariotas adecuadas, se podrá mencionar, a modo de ejemplo, células de plantas, 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.

30 La construcción de lectores de expresión usados en la descripción, y la transformación de células hospedadora se puede realizar con las técnicas convencionales de biología molecular.

35 El anticuerpo BT061 (hB-F5) usado en la invención se puede obtener mediante el cultivo de una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho anticuerpo, en condiciones adecuadas para la expresión del mismo, y mediante la recuperación de dicho anticuerpo del cultivo de la célula hospedadora.

Construcción de B-F5 humanizado

Diseño de regiones V_H y V_K de humanizado B-F5

40 Las secuencias de ADN que codifican las regiones V_H y V_K de B-F5 de ratón se muestran respectivamente en la Figura 3 y en la Figura 4 y con los identificadores de secuencia SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. Las V_H y V_K humanas donde se injertan las CDR de ratón se seleccionaron mediante búsqueda en base de datos para V_H humano más parecido a las V_H y V_K de B-F5 de ratón. La región V_H de un anticuerpo humano (M26; Número de Registro A36006) tenía la homología más elevada con la V_H de B-F5. La región V_K de otro anticuerpo humano (FK-001; NAKATANI *et al.*, *Biotechnology*, 7 (1989), 805-810) tenía la homología más elevada con la V_K de B-F5.

50 Dos tipos de V_K que se diferenciaban entre ellas por que el resto 4 era Leucina o Metionina se construyeron y se diseñaron y se denominaron L4L y L4M. Dos tipos de V_H que se diferenciaban entre ellas por que el resto del aminoácido 37 era Leucina o Valina se construyeron y se diseñaron como H37L y H37V. El alineamiento de las secuencias polipeptídicas de B-F5, FK-001, L4L, y L4M se muestran en la Figura 19. El alineamiento de las secuencias polipeptídicas de B-F5, M26, H37L, y H37V se muestra en la Figura 20. Los restos de FR informados anteriormente porque eran importantes para el empaquetamiento de las CDR (Chotia *et al.*, *Nature* 342 (1989), 877; Foote *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 224 (1992), 487) se presentan en caja.

55 Mediante la combinación de estas V_H y V_K, se diseñaron 4 versiones de regiones V.

Expresión de B-F5 humanizado

60 Las etapas posteriores para producción de B-F5 humanizado fueron las mismas que las divulgadas en la Patente de Estados Unidos n.º 5.886.152 para B-B10 humanizado.

65 En resumen, los plásmidos de expresión para la cadena H (región humanizada de V_H fusionada a la región constante de una cadena γ -1 humana (TAKAHASHI *et al.*, *Cell*, 29 (1982), 671-679)) y la cadena L (región humanizada de V_H fusionada con la región constante de la cadena K de FK-001) de B-F5 humanizado se construyeron por separado. En estos plásmidos, la expresión del B-F5 humanizado se realiza mediante el

5 promotor/potenciador del gen de la IgM monoclonal humana, FK-001. La Figura 5 y 6 respectivamente muestran los fragmentos de los plásmidos que codifican las regiones V_H y V_K de BF-5 humanizado. Las secuencias que codifican la región V están subrayadas y las secuencias polipeptídicas correspondientes se indican debajo de la secuencia de nucleótidos. Ambos plásmidos y pSV2neo se introdujeron de forma simultánea en Sp2/0 de mieloma de ratón (ATCC CRL-1581) usando Lipofectin[®]. Se seleccionaron transfectomas que producen IgG humana mediante ELISA, usando un anticuerpo de IgG anti-humana (cadena y) y un anticuerpo de cadena Ig K anti-humano.

Caracterización de las diferentes versiones de B-F5 humanizado

10 *Cálculo de la actividad de unión de CD4*

15 Los sobrenadantes del cultivo de transfectomas que producen las cuatro versiones de hB-F5 se recogieron, y se concentraron. Los diferentes anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía por afinidad usando proteína A Sepharose y se evaluaron para su actividad de unión a CD4 midiendo, sus actividades inhibitorias por medio de ELISA competitivo con respecto a la unión del mB-F5 biotinilado a CD4 soluble revestido en placas de microtitulación. El tiempo de incubación es de 2 horas a 37 °C y durante una noche a 4 °C.

20 Las actividades de unión relativas de hB-F5s (la actividad de unión de mB-F5 se tomó como un 100 %) se muestran en la Tabla A que sigue a continuación:

Tabla A

Anticuerpo	Temp (°C)	Actividad de unión relativa (% de mB-F5)
H37L/L4L	4	80
	37	30
H37L/L4M	4	80
	37	30
H37V/L4L	4	10-20
	37	10
H37V/L4M	4	10-20
	37	10

25 A partir de los resultados mostrados en la Tabla A, parece que el resto 37 de la Leucina, es fundamental para mantener la actividad de unión a CD4 de hB-F5 porque la *actividad* de unión a CD4 se reduce varias veces mediante conversión de ³⁷Leu en ³⁷Val. Por el contrario, se encuentra que el resto 4 de V_K no es demasiado importante para la actividad de unión a CD4. Dado que la diferencia estructural entre ³⁷Leu y ³⁷Val de V_H no se demuestra claramente mediante modelado molecular, no se esperaba la superioridad de H37L con respecto a H37V en la actividad de unión a CD4.

30 Para evaluación se eligieron H37L/L4L y H37L/L4M.

Investigación de las actividades biológicas in vitro de B-F5 humanizado

35 Las actividades biológicas *in vitro* del B-F5 de ratón y de los B-F5 humanizados (H37L/L4M IgG1 y H37L/L4L IgG 1) se evaluaron. Los B-F5 humanizados de tipo IgG2 (H37L/L4M IgG2 y H37L/L4L IgG2) también se sometieron a ensayo.

40 Las actividades biológicas *in vitro* de mB-F5 y los cuatro tipos de hB-F5 se evaluaron usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Las PBMC se activaron con ConA (2,5 pg/ml, 3 días) o PPD (10 pg/ml, 4 días) en presencia de murino o los hB-F5, y se controlaron para sus respuestas proliferativas mediante incorporación de 3H-timidina.

45 El murino y los hB-F5s podían inhibir de forma moderada la proliferación inducida por ConA, pero las actividades variaban de anticuerpo a anticuerpo y/o de donante a donante. También, murino y los hB-F5s eran capaces de inhibir la proliferación de PBMC específica de Ag inducida por PPD.

50 El tipo IgG1 de hB-F5 inhibía la proliferación inducida por PPD de forma más eficaz (una inhibición tan elevada como un 70 %) que mB-F5. Parecía que el tipo IgG1 era más eficaz que el tipo IgG2 de que la actividad inhibitoria era casi la misma que la de mB-F5. Para el tipo IgG1, H37L/L4M era más eficaz que H37L/L4L. El tipo IgG2 de H37L/L4M y H37L/L4L tenía casi las mismas actividades inhibitorias. En resumen, las actividades inhibitorias de los B-F5s con respecto a la proliferación de PBMC inducida por PPD fue la que sigue a continuación: H37L/L4M IgG1 > H37L/L4L IgG1 > H37L/L4M IgG2 = H37L/L4L IgG2 = mB-F5.

Considerando la eficacia de la actividad biológica *in vitro* y el menor número de aminoácidos de ratón, H37L/L4M IgG1 se eligió para evaluación adicional, y es este anticuerpo el que se denomina BT061 y se usa para demostrar la presente invención en los Ejemplos proporcionados en la presente solicitud.

5 Composiciones y usos

Como se ha mencionado, la composición farmacéutica y medicamentos usados en la presente descripción, son capaces preferentemente de tratar una enfermedad autoinmune en pacientes que se benefician de dosis más elevadas. Tales pacientes incluyen, pero no se limitan a, casos graves con una larga historia de la enfermedad.

10 En un aspecto, la presente descripción también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado o fragmento o derivado del mismo en la preparación de un medicamento eficaz frente a una enfermedad autoinmune, donde el anticuerpo humanizado es capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, y donde el medicamento comprende el anticuerpo en una concentración de 10 a 150 mg/ml, preferentemente de 15 a 75 mg/ml, lo más preferentemente de 20 a 60 mg/ml.

15 La descripción también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado o fragmento o derivado del mismo en la preparación de un medicamento eficaz frente a una enfermedad autoinmune, donde el anticuerpo humanizado es capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, y donde el medicamento se administra a un sujeto en una sola dosis o una pluralidad de dosis en una cantidad del anticuerpo de 10 a 200 mg por dosis.

20 La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto en una dosis del agente de 10 mg a 100 mg, de 10 mg a 80 mg, de 15 mg a 80 mg, de 20 mg a 75 mg, preferentemente más de 20 mg a 60 mg y lo más preferentemente de 25 mg a 60 mg.

25 En un aspecto de la descripción con el sujeto debe recibir una pluralidad de dosis. En estas situaciones, es adecuado que la dosificación durante un periodo de 10 días sea superior a 25 mg pero inferior o igual a 200 mg, más preferentemente entre 28 mg y 100 mg, y lo más preferentemente entre 30 mg y 100 mg. Además, la dosificación durante un periodo de 5 días es preferentemente superior a 15 mg pero inferior o igual a 100 mg, más preferentemente entre 18 mg y 100 mg y lo más preferentemente entre 20 mg y 100 mg. En este aspecto de la invención, es particularmente preferente que las dosificaciones se administren por vía subcutánea.

30 La dosis también se puede calcular sobre la base del área de superficie corporal (BSA) del sujeto. El área de superficie corporal (BSA) se puede calcular de acuerdo con cualquier método conocido. Algunos ejemplos de métodos de cálculo de BSA son los que siguen a continuación:

35
$$\text{Fórmula de Mosteller: } (BSA \text{ (m}^2\text{)}) = ([\text{Altura (cm)} \times \text{Peso (kg)}] / 3600)^{1/2}$$
 (Mosteller RD: Simplified Calculation of Body Surface Area. N Engl J Med 1987 Oct 22; 317 (17): 1098).

$$\text{Fórmula de DuBois y DuBois: } BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0,20247 \times \text{Altura (m)}^{0,725} \times \text{Peso (kg)}^{0,425}$$
 (DuBois D; DuBois EF: A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Int Med 1916 17: 863-71).

$$\text{Fórmula de Haycock: } BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0,024265 \times \text{Altura (cm)}^{0,3964} \times \text{Peso (kg)}^{0,5378}$$
 (Haycock G.B., Schwartz G.J., Wisotsky D.H. Geometric method for measuring body surface area: A height weight formula validated in infants, children and adults. The Journal of Pediatrics 1978 93: 1:62-66).

$$\text{Fórmula de Gehan y George: } BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0,0235 \times \text{Altura (cm)}^{0,42246} \times \text{Peso (kg)}^{0,51456}$$
 (Gehan EA, George SL, Estimation of human body surface area from height and weight. Cancer Chemother Rep 1970 54: 225-35).
 50
$$\text{Fórmula de Boyd formula: } BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0,0003207 \times \text{Altura(cm)}^{0,3} \times \text{Peso (gramos)}^{(0,7285 - (0,0188 \times \text{LOG(gramos)})}$$

De acuerdo con la descripción, la dosis del agente para el sujeto es de 5 a 60 mg/m² de área de superficie corporal del paciente, preferentemente de 6 a 50 mg/m², y lo más preferentemente de 8 a 40 mg/m².

55 Además, la dosis se puede calcular basándose en el peso corporal del sujeto. De acuerdo con la descripción, la dosis del agente para el sujeto es de 0,1 a 2 mg/kg, preferentemente de 0,15 a 1,5 mg/kg, y lo más preferentemente de 0,2 a 1 mg/kg.

60 En estos aspectos de la descripción donde la dosis se basa en el área de superficie corporal o el peso corporal del sujeto, es preferente que las dosis durante un periodo de 10 días estén entre 10 mg/m² y 120 mg/m², más preferentemente entre 16 mg/m² y 120 mg/m², o entre 0,2 mg/kg y 4 mg/kg, más preferentemente entre 0,4 mg/kg y 4 mg/kg. Es particularmente preferente que las dosificaciones se administran por vía subcutánea.

65 En la invención, la pluralidad de dosis se administran de forma semanal.

La duración del tratamiento no está especialmente limitada, y por lo general, en el tratamiento de enfermedades

autoinmunes, el tratamiento evoluciona de forma indefinida, o hasta que los síntomas se reducen hasta un nivel gestionable por el paciente. Por lo general, la dosis se administra al sujeto durante al menos 1 mes.

5 La descripción también proporciona un kit para un uso como se ha definido anteriormente, donde el kit comprende una pluralidad de dosificaciones de medicamento como se ha definido anteriormente para administración simultánea, secuenciado separada a un sujeto.

10 También se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune, método que comprende la administración de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente a un sujeto.

15 También se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune, método que comprende la administración de un medicamento a un sujeto, donde el medicamento comprende un agente capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, y donde el medicamento se administra al sujeto en una cantidad como se ha descrito anteriormente.

20 Es preferente que el agente sea un anticuerpo anti-CD4 humanizado o fragmento o derivado del mismo derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón.

25 Como se ha mencionado, la composición farmacéutica y medicamentos usados en la presente descripción, son preferentemente capaces de tratar una enfermedad autoinmune en pacientes que se benefician de dosis más elevadas. Tales pacientes incluyen, pero no se limitan a, casos graves con una historia larga de la enfermedad.

30 Preferentemente, la enfermedad autoinmune se selecciona entre psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, lupus sistémico eritematoso, colitis ulcerosa, dermatitis atópica, miocarditis y enfermedades relacionadas con trasplantes tales como injerto contra hospedador o reacciones de hospedador contra injerto, o problemas generales de tolerancia a órganos.

35 En un aspecto de la invención particularmente preferente, las composiciones farmacéuticas son para tratar la enfermedad autoinmune psoriasis. En particular, tales composiciones farmacéuticas se deben administrar por vía subcutánea en las dosificaciones especificadas en el presente documento.

La psoriasis es un trastorno que causa lesiones psoriáticas o placas en la piel del afectado. El Área de Psoriasis y la puntuación del Índice de Gravedad (PASI) se usan normalmente para evaluar y registrar el nivel de psoriasis presentado por los afectados. La puntuación de PASI implica la evaluación de eritema (E), infiltración (I), y descamación (D), e implicación del área de superficie corporal (A) con respecto a 4 regiones corporales (cabeza (h), tronco (t), extremidades superiores (u) e inferiores (l)). La Tabla B que sigue a continuación muestra cómo funciona el sistema de puntuación .

TABLA B - Sistema de puntuación de PASI

Grado de gravedad (por región corporal)	Valor dado	Superficie implicada (por región corporal)	Valor dado
Sin síntomas	0	< 10 %	1
Ligero	1	10-29 %	2
Moderado	2	30-49 %	3
Notable	3	50-69 %	4
Muy notable	4	70-89 %	5
		90-100 %	6

40 Dado que la cabeza, extremidades superiores, tronco y extremidades inferiores corresponden a aproximadamente un 10, 20, 30, y un 40 % del área de superficie corporal, respectivamente, la puntuación de PASI se calcula con la fórmula:

45
$$PASI = 0,1(E_h + I_h + D_h)A_h + 0,2(E_u + I_u + D_u)A_u + 0,3(E_t + I_t + D_t)A_t + 0,4 (E_l + I_l + D_l)A_l$$

La puntuación de PASI varía de 0-72. Una puntuación de 0 significa que no hay psoriasis, mientras que una puntuación de 72 representa la psoriasis más grave.

50 En una realización preferente de este aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención es capaz de tratar la psoriasis proporcionando una mejoría de al menos un 40 %, y preferentemente al menos un 50 %, en la puntuación de PASI del paciente. Preferentemente, el sujeto tiene una puntuación de PASI de al menos 10 antes del

tratamiento. Estos efectos se pueden observar al menos 56 días después de la administración, más preferentemente al menos 75 días después de la administración. En particular, estos efectos se pueden observar en al menos un 80 % de los pacientes tratados.

- 5 En un aspecto más de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son para el tratamiento de artritis reumatoide.

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que causa inflamación crónica de las articulaciones y tejidos circundantes, y también puede afectar a otros tejidos y órganos corporales.

- 10 La mejoría en la artritis reumatoide presentada por un paciente tratado normalmente se evalúa usando el conjunto básico de parámetros del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Felson *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 1995, 38 (6), 727-735). Este sistema define un valor de ACR 20 como una mejoría de un 20 % en recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas y una mejoría de un 20 % en 3 de las 5 medidas del conjunto básico de ACR:
15 evaluaciones globales del paciente y del médico, dolor, discapacidad, y un reactivo de fase aguda, tal como proteína C-reactiva (CRP).

En particular, las composiciones farmacéuticas para tratar artritis reumatoide se deben administrar por vía subcutánea en las dosificaciones especificadas en el presente documento.

- 20 El tratamiento de la artritis actual incluye fármacos de primera línea para controlar el dolor y la inflamación clasificados como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, naproxeno, etc. El tratamiento secundario de la artritis incluye corticosteroides (por ejemplo, prednisona y dexametasona),
25 fármacos antirreumáticos de acción lenta (FARAL) o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), por ejemplo, metotrexato, penicilamina, ciclofosfamida, sales de oro, azotipoprina, leflunomida, etc.

Los corticosteroides, las versiones sintéticas de la hormona cortisona del organismo, se usan para inhibir la evolución de RA (por ejemplo, prednisona y dexametasona).

- 30 También se ha desarrollado otro grupo de fármacos denominados modificadores la respuesta biológica (BRM) para tratamiento de RA incluyendo antagonistas para TNF-alfa (adalimumab, infliximab, etanercept) que funcionan a través de unión a su receptor o uniéndose directamente a la proteína de TNF-alfa.

- 35 En una realización de este aspecto de la invención, las composiciones se deben administrar en combinación con fármacos usados de forma simultánea para tratar la artritis reumatoide. En particular, las composiciones se deben administrar con uno de los fármacos mencionados anteriormente, preferentemente metotrexato.

Algunos fármacos conocidos, tales como metotrexato, y la composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar de forma simultánea, de forma secuencial o por separado.

- 40 La invención se describirá ahora adicionalmente en relación a las siguientes realizaciones específicas.

Ejemplos

- 45 EJEMPLO 1 - *Investigación de las capacidades de inmunomodulación de BT061 con respecto a la proliferación de linfocitos T*

Método

- 50 Se prepararon cultivos de sangre completa con sangre periférica recién extraída. En resumen, usando agujas de 19G, se extrajo sangre de tres voluntarios sanos que se recogió en jeringas heparinizadas. La sangre se pipeteó en placas de cultivo de 96 pocillos no más tarde de 60 min después de la donación.

- 55 El anticuerpo usado en la invención (BT061, lote 40588, o lote 70A0013B) se añadió a los cultivos antes de la estimulación de los leucocitos a 5 concentraciones diferentes (véase "Sustancias de ensayo" a continuación). Se permitió que las células interactuaran con el anticuerpo durante 90 min a 37 °C, CO₂ al 5 % en atmósfera humidificada, y a continuación se añadieron cuatro estimulantes diferentes a cultivos separados:

- 60 (a) anticuerpos anti-CD3 (R&D Systems; 50 ng/ml)
(b) fitohemaglutinina (PHA, Biochrom KG; 3 pa/ml) junto con anticuerpos anti-CD28 (Becton-Dickinson; 1 µg/ml);
(c) lipopolisacárido (LPS, subtipo 055:B15 de Sigma Aldrich; 1 µg/ml);
(d) SE-B (Bernhard-Nocht-Institut; 25 ng/ml) junto con anticuerpos anti-CD28 (Becton-Dickinson; 1 µg/ml).

- 65 Todos los cultivos de sangre completa se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % (atmósfera humidificada). A continuación, los sobrenadantes del cultivo se recogieron para la determinación de los criterios de valoración de citoquinas, excepto para cultivos estimulados con PHA/antiCD28, que se incubaron durante 42 horas para obtener

una estimulación suficiente de las células Th2.

Los resultados se exponen en la Figura 1.

5 Resultados

BT061 no presentaba un efecto significativo en las actividades principales de los monocitos/macrófagos ni en actividades de Th1 así como de Th2 en cultivos de sangre completa de voluntarios sanos. Había un efecto dependiente de la concentración en células Treg (demostrado como un aumento de la liberación de TGF-beta).

En particular, los resultados confirman que hay:

- Ninguna modulación de la citoquina inflamatoria IL-2 a concentraciones de hasta 50 µg/ml que corresponde a la aplicación de la dosis elevada de hasta 150 mg en pacientes
- Ninguna inducción de la citoquina inflamatoria IFN-gamma a concentraciones de hasta 50 µg/ml que corresponde a la aplicación de la dosis elevada de hasta 150 mg en pacientes
- Ninguna modulación de las citoquinas Th1/Th2 a concentraciones de hasta 50 µg/ml que corresponde a la aplicación de la dosis elevada en pacientes
- Solamente una regulación positiva de IL-6 muy esporádica con un aumento mínimo, cuyas implicaciones se analizan de forma controvertida
- Aumento de la liberación de TGF-beta (células Treg)
- Ningún efecto significativo en las actividades reguladoras principales de monocitos/macrófagos ni en las actividades de Th1 y Th2.

EJEMPLO 2 - *Ensayo de BT061 para su influencia en PBMC humanas cultivadas cebadas para una respuesta anti-toxoide del tétanos y ensayo de citoquina*

Método

Ensayo de proliferación

Las PBMC aisladas recién preparadas se cultivaron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de 200 µl/pocillo (4×10^5 células/pocillo). El artículo del ensayo (AK BT061 Anti CD4) se usó en las concentraciones de 20 µg/ml, 4 µg/ml y 0,8 µg/ml (adicionalmente 40 µg/ml dentro del ensayo previo); el toxoide del tétanos se usó en concentraciones de 25 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml. Para el control negativo, se tomó el medio de cultivo celular. Todos los cultivos se prepararon por triplicado.

Para la estimulación de ConA, se usó una concentración de 2,5 µg/ml y un volumen de 200 µl/pocillo. La PBMC se ajustó a una densidad de 1×10^6 /ml y se distribuyó en un volumen de 100 µl por pocillo.

Al final del periodo de cultivo, la proliferación celular se detectó mediante la adición de 0,4 µCi de ^3H -timidina por pocillos durante dieciséis horas. Al final del periodo de cultivo, las células se separaron de la superficie usando una solución de EDTA y se cosecharon en filtros de fibra de vidrio usando un cosechador de células Scatron. La cantidad de radiactividad incorporada en el ADN en cada pocillo se midió en un contador de centelleo y que es proporcional al número de células en proliferación, que a su vez es una función del número de leucocitos que se estimularon para entrar en la fase S del ciclo celular. Los parámetros de lectura fueron los recuentos por minuto (cpm) y el índice de estimulación (SI) para cada concentración definida como $\text{cpm}_{\text{compuesto}} / \text{cpm}_{\text{blanco}}$.

Ensayos con citoquinas

Todas las citoquinas se cuantificaron en los sobrenadantes del cultivo usando kits de ELISA comerciales, de acuerdo con las respectivas instrucciones del fabricante. Los reactivos usados se exponen en la Tabla 1 que sigue a continuación:

Tabla 1

sustancia	fuentes	código	lote
Conjunto de OptEIA de IFN-γ Humano	BD Biosciences	555142	MF31099
Conjunto de ELISA de IL-1 Humano	Bender	BMS243/2MST	n.d.
Conjunto de OptEIA de IL-4 Humano	BD Biosciences	555194	MF10142
Conjunto de OptEIA de IL-5 Humano	BD Biosciences	555202	MF31662
Conjunto de OptEIA de IL-6 Humano	BD Biosciences	555220	MF25815
Conjunto de OptEIA de IL-10 Humano	BD Biosciences	555157	MF24968

ES 2 569 217 T3

sustancia	fuelle	código	lote
Conjunto de OptEIA de TGF-β Humano	BD Biosciences	559119	47704
Conjunto de OptEIA de TNF-α Humano	BD Biosciences	555212	MF31447

* material adicional, requerido para ELISA el de Interleuquina-1

5 Los niveles de interleuquina (IL)-1 en sobrenadantes del cultivo se determinaron usando el kit de ensayo del Conjunto A de ELISA de IL-1 humano (Bender) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El intervalo del ensayo, determinado previamente con el patrón suministrado con el kit, se especificó de 1,3 a 130 pg/ml para muestras sin diluir.

10 Los niveles de IL-4, 5, 6 y 10 en sobrenadantes del cultivo así como factor de crecimiento transformante (TGF) β1 y factor de necrosis tumoral (TNF) α se determinaron usando el tipo de ensayo OptEIA (BD biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El intervalo del ensayo, determinado previamente con los patrones suministrados con los kits se especificó de 3,8 a 330 pg/ml para IFN-γ, de 6,3 a 616 pg/ml (para IL-4, 5, 10 y TNF), pidiendo muestras sin diluir y de 7,6 a 660 pg/ml para IL-6 usando diluciones de las muestras dos veces.

15 Dos (para cultivos de monocitos) u ocho (para cultivos de PBMC) determinaciones de citoquina con ELISA, cada una a partir de microcultivos independientes se incluyeron en el cálculo de la media y de la desviación estándar. Los títulos por encima del rango superior del ensayo (por ejemplo, 616 pg/ml en el caso de TNF) se ajustaron a este valor para el cálculo. El intervalo inferior del ensayo se restó de cada valor medio antes del cálculo.

Resultados

20 BT061 (también denominado B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) es capaz de suprimir la proliferación de linfocitos T específica del toxoide del tétanos de una manera dependiente de la dosis; no se produjo efecto en el número total de linfocitos T. Se ha demostrado la supresión general de la liberación de citoquinas.

25 La Tabla 2 que sigue a continuación muestran la influencia del mAb BT061 anti CD4 en un ensayo de proliferación de linfocitos T específico del toxoide del tétanos, medido por triplicado.

30 Se presentan la media y SD de la incorporación de ³H-Tdr, medido por triplicado así como el índice de estimulación (SI, definido como $\text{cpm}_{\text{compuesto}} / \text{cpm}_{\text{nil}}$) para cada concentración y el nivel de significancia en el ensayo de t de dos aspectos para muestras no relacionadas con respecto al control de medio (n.s.: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Tabla 2

anti CD4 (BT061)	Toxoide del Tétanos			
	25 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	nil
20 µg/ml				
Media (cpm)	5123	2426	2589	456
SD (cpm)	597	989	1069	363
Media (SI)	11,23	5,32	5,67	1,00
SD (SI)	10,24	6,40	6,85	1,59
ensayo de t (compuesto con respecto a nil)				
p =	0,000 ***	0,032 *	0,031 *	
4 µg/ml				
Media (cpm)	6591	5005	2957	358
SD (cpm)	468	518	1333	57
Media (SI)	18,39	13,97	8,25	1,00
SD (SI)	4,21	3,65	5,02	0,32
ensayo de t (compuesto con respecto a nil)				
p =	0,000 ***	0,000 ***	0,028 *	
0,8 µg/ml				
Media (cpm)	8787	6748	3902	414
SD (cpm)	1886	763	218	12
Media (SI)	21,24	16,31	9,43	1,00
SD (SI)	5,18	2,32	0,80	0,06
ensayo de t (compuesto con respecto a nil)				
P =	0,002	0,000	0,000	
nil				
Media (cpm)	13783	10244	6970	650
SD (cpm)	1826	758	1351	95

ES 2 569 217 T3

anti CD4 (BT061)	Toxoide del Tétanos			
Media (SI)	21,22	15,77	10,73	1,00
SD (SI)	5,91	3,47	3,65	0,29
ensayo de t (compuesto con respecto a nil)				
p =	0,000 ***	0,000 ***	0,001 **	
Viab-ctr	ConA	nil		
Media (cpm)	94473	404		
SD (cpm)	4200	239		
Media (SI)	233,94	1,00		
SD (SI)	148,86	1,18		
ensayo de t (compuesto con respecto a nil)				
p =	0,000 ***			

Tabla 3
 Esta tabla muestra la influencia del mAb BT061 anti CD 4 en la producción de citoquinas de cultivos de PBMC estimulados con toxoide del tétanos. Se proporcionan media y SD de ocho micro cultivos individuales

BT061 µg/ml	Tox. Tet. µg/ml	IL-1 pg/ml		IL-4 pg/ml		IL-5 pg/ml		IL-6 pg/ml		IL-10 pg/ml		IFN γ pg/ml		TGFβ1 pg/ml		TNF α pg/ml	
		media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
20	25	0,0	0,0	0,0	0,0	26,3	10,1	141,8	16,9	22,9	4,5	0,9	1,6	35,5	46,1	2,2	3,1
4	25	0,0	0,0	0,0	0,0	53,0	20,4	143,3	40,3	20,9	5,3	3,3	3,6	15,9	23,8	2,1	2,2
0,8	25	0,0	0,0	0,0	0,0	83,7	41,8	144,2	15,2	21,4	4,1	17,9	24,1	14,3	27,1	5,5	4,0
0	25	0,1	0,2	0,2	0,6	150,1	59,5	133,3	13,5	27,2	5,9	41,0	34,8	12,4	27,6	8,5	5,5
25	0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	124,8	16,9	8,7	2,5	0,0	0,0	8,8	18,4	0,0	0,0
0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	123,7	14,5	6,7	1,9	0,0	0,0	5,4	13,1	0,0	0,0

Tabla 4

Esta tabla muestra la influencia del mAb BT061 anti CD4 en la producción de cultivos de monocitos estimulados con citoquinas inflamatorias LPS. Se proporcionan media y SD de dos micro cultivos individuales.

BT061 µg/ml	IL-1 pg/ml		IL-6 pg/ml		TNF α pg/ml							
	LPS 1 µg/ml	nil	LPS 1 µg/ml	nil	LPS 1 µg/ml	nil						
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD				
20,0	40	14,7	00		253	2,4	121	12,2	609	0,0	0,3	0,4
4,0	39	8,1	00		256	14,9	135	8,9	597	12,7	0,0	0
0,8	34	14,8	0,2	0,3	257	16,6	128	5,9	605	5,7	0,0	0
0,0	56	2,2	00		233	16,6	117	14,1	600	3,2	0,6	0,8

Los datos en las Tablas 2-4 demuestran lo siguiente:

- 5 • Se ha demostrado una supresión dependiente de la dosis de la proliferación de linfocitos T inducida por toxoide del tétanos (respuesta de reclutamiento) incluso a dosis elevadas de BT061, lo que muestra que BT061 no anula todas las respuestas inmunes. Las dosis usada se aplican a una aplicación de dosis elevada correspondiente de hasta 60 mg en pacientes.
- 10 • Supresión general de liberación de citoquinas (reducción de IFN-gamma, IL-5 y TNF-alfa dependiente de la dosis, sin cambios en IL-1, IL-4, IL-6, IL-10) y sin influir en el equilibrio de Th1/Th2.
- Un aumento de la liberación de TGF-beta.

EJEMPLO 3 - Un ensayo de citometría de flujo para ADCC (Citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpo) inducida por BT061 (mAb anti CD4)

Las células diana HuT 78 se etiquetaron con BT061 (hB-F5) y se incubaron con células PBMC como efectores. Las células muertas se pudieron detectar debido a la absorción en el ADN del colorante yoduro de propidio después de un periodo de incubación de 30 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Concentración [µg/ml]	Intensidad de fluorescencia media de Tecelac/ATG (control positivo)	Intensidad de fluorescencia media de control negativo	Muerte celular específica (ADCC) [%]
75	31,78	11,96	19,82
37,05	25,09	12,70	12,39
18,75	22,25	10,59	11,66
9,38	14,95	10,63	4,32
Concentración [µg/ml]	Intensidad de fluorescencia media de hB-F5	Intensidad de fluorescencia media de control negativo	Muerte celular específica (ADCC) [%]
70,85	10,96	13,41	-2,45
35,43	11,06	14,05	-2,99
17,71	11,68	12,16	-0,48
8,86	10,54	10,23	0,31

Los datos de la tabla demuestran que no se produjo inducción de ADCC con BT061 (hB-F5) incluso concentraciones elevadas.

25 EJEMPLO 4 - Apoptosis

En un ensayo de citometría de flujo para Apoptosis inducida por BT061 (mAb anti CD4), las PBMC de sangre completa se incubaron con BT061 o el control positivo.

30 Después de un periodo de incubación de 7 días, la detección de células apoptóticas se realizó mediante tinción de células apoptóticas con Anexina-V-Fluoresceína. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Experimentos de estimulación de 7 d	Estímulo	
	Control positivo (ATG/Tecelac)	BT061
Concentración del anticuerpo [$\mu\text{g/ml}$]	Aumento de la proporción de células apoptóticas [%]	
400	0,8	-6,9
200	13,6	-6,4
100	19,5	-0,7
50	17,3	-0,4
25	18,3	-0,5
12,50	8,2	-0,1

Los datos demuestran que no se produjo inducción de apoptosis incluso a concentraciones elevadas de BT061.

5 EJEMPLO 5 - Unión de complemento

En un ensayo de citometría de flujo para unión del factor de complemento, las C1qPBMC se aislaron y se incubaron con BT061 (mAb anti CD4), seguido de un periodo de incubación con C1q recombinante purificado.

10 ATG (Tecelac) sirvió como el control positivo .

La detección se realizó con un anticuerpo de detección etiquetado con FITC con respecto a C1q. Los resultados se muestran en la Tabla 7 que sigue a continuación.

15

Tabla 7

Concentración del anticuerpo [$\mu\text{g/ml}$]	mAb BT061 anti CD4	Control Positivo
	Intensidad media de fluorescencia	
150	199	782
75,0	200	766
37,5	205	732
18,8	217	672
9,4	210	541
4,7	198	491
2,3	199	371
1,2	193	302

Los datos muestran que no se puede observar unión de complemento, incluso a concentraciones elevadas.

20

EJEMPLO 6 - Seguridad y tolerabilidad el aumento de las dosis de BT061

Se realizó un estudio para controlar la seguridad y la tolerabilidad de BT061 usando aumento de dosis del anticuerpo en voluntarios masculinos y femeninos sanos entre las edades de ≥ 18 a ≤ 75 años.

25

Treinta voluntarios recibieron BT061 mediante administración intravenosa en 10 grupos de dosificación, con 3 voluntarios por grupo. Además, 15 voluntarios recibieron BT061 mediante administración subcutánea en 5 grupos de dosificación también con 3 voluntarios por grupo. La administración de BT061 por vía intravenosa se ilustra en la Tabla 8 que sigue a continuación:

TABLA 8 - Dosis intravenosa de BT061

Administración de BT061			
Dosis total de mab BT061	Volumen de BT061 - 12,5 mg	Volumen de BT061 - 25 mg	Volumen de BT061 - 50 mg
3,5 μg	0,28 μl		
20 μg	1,6 μl	-	-
100 μg	8 μl	-	-
500 μg	40 μl	-	-

Administración de BT061			
Dosis total de mab BT061	Volumen de BT061 - 12,5 mg	Volumen de BT061 - 25 mg	Volumen de BT061 - 50 mg
2,5 mg	0,2 ml	-	-
5 mg	0,4 ml	-	-
10 mg	0,8 ml	-	-
20 mg	-	0,8 ml	-
40 mg	-	-	0,8 ml
60 mg	0,8 ml	-	1 ml

Cada dosis se diluye con inyección de cloruro sódico al 0,9 % hasta un volumen total de 20 ml. La dosis se administra como una infusión intravenosa continua durante 2 horas.

5 La administración de BT061 por vía subcutánea se ilustra en la Tabla 9 que sigue a continuación:

TABLA 9 - Dosis subcutánea de BT061

Administración de BT061			
Dosis total de mab BT061	Volumen de BT061 - 12,5 mg	Volumen de BT061 - 25 mg	Volumen de BT061 - 50 mg
5 mg	0,4 ml	-	-
10 mg	0,8 ml	-	-
20 mg	-	0,8 ml	-
40 mg	-	-	0,8 ml
60 mg	-	-	1 ml + 0,2 ml

Cada dosis se inyecta como una sola inyección de bolo.

10 Los voluntarios se evaluaron durante un periodo de 3 meses después de la inyección.

Para aplicación subcutánea, se tomaron muestras de plasma antes de la administración y a las 3, 6, 12, 24, 36, 48, 56, 72, 88, 96, 120, 144 y 168 horas después de la administración y en el día 75.

15 Para aplicación intravenosa, se tomaron muestras de plasma antes de la administración y a los 30 minutos, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas después de la administración.

20 Las muestras de plasma se analizaron usando metodología de ELISA convencional para establecer niveles de citoquinas. Las citoquinas relevantes analizadas incluían: IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2.

Las muestras de plasma también se analizaron usando métodos convencionales de citometría de flujo para medir el número de linfocitos CD4⁺.

25 *Resultados*

Se encontró que las dosis intravenosas y subcutáneas a 60 mg por lo general se toleraron bien.

Niveles de citoquina

30 La inducción de la liberación de citoquina es una complicación inmediata común que se produce con el uso de anticuerpos terapéuticos que interactúan con linfocitos T, tales como ATG, OKT3, CAMPATH-1H y mAb anti-CD3 humanizados (TRX4, Visilizumab y Teplizumab). Los síntomas incluyen principalmente fiebre moderada, dolores de cabeza y manifestaciones gastrointestinales autolimitantes. Los efectos secundarios correlacionados con la inducción de citoquinas después de la administración del anticuerpo requieren la aplicación de fármacos adicionales
35 tales como el antihistamínico clorhidrato de difenhidramina y/o el agente antiinflamatorio ibuprofeno.

40 Con el uso de OKT3 (muromonab-CD3), un anticuerpo monoclonal terapéutico específico de CD3 murino, incluso se produjeron muertes informadas, y graves efectos secundarios que limitar el uso clínico de este anticuerpo principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

Aunque algunos anticuerpos monoclonales específicos para CD3 que no se unen a FcR humanizado que se usan en la actualidad en instalaciones clínicas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Teplizumab y TRX4) presentan reducción de los efectos secundarios inducidos por la activación de linfocitos T y/o por la activación del receptor Fc que expresa células después de la primera dosis, en comparación con anticuerpos específicos para CD3 que se unen a FcR tales como OKT3, todavía se observa un cierto grado de activación de linfocitos T y todavía se observa la activación del receptor Fc que expresa células que conduce a la liberación de citoquinas conectadas por lo general con efectos secundarios dependientes de citoquina.

En el presente estudio se encontró, de forma sorprendente, que la inducción de citoquina observada en voluntarios sanos después de aplicación de BT061 intravenosa o subcutánea era baja y transitoria en comparación con los anticuerpos anti-CD3. Por lo general, la inducción de citoquina aumenta con el aumento de la dosificación. Sin embargo, incluso las dosis más elevadas de 40 a 60 mg de citoquina, la inducción es mucho menor que la observada con otros anticuerpos monoclonales que interactúan con linfocitos T (Figura 7A y B).

Las concentraciones máximas medias para las citoquinas observadas en cualquier punto temporal en 96 horas después de la administración usando las dosis más elevadas (de 40 mg a 60 mg de BT061) se muestran en las Figuras 7 y 8.

La concentración máxima media para cada citoquina se calcula como sigue a continuación: la media de las concentraciones de citoquina más elevadas observadas después de administración del anticuerpo.

Las Figuras 7A y B muestran la liberación de TNF α e IL-6 observada en voluntarios sanos después de administración intravenosa o subcutánea de BT061 en comparación con las liberadas después de administración de los anticuerpos monoclonales anti-CD3, Teplizumab y TRX4. Los valores normales de estas citoquinas se tomaron de Straub *et al.*, (2007, *Arthr. & Rheumat.*). La Figura 8 muestra los niveles en plasma de IL-2 e IFN- γ después de administración por vía intravenosa o subcutánea de BT061. Los niveles máximos medios se calcularon a partir del grupo de dosis de 40 y 60 mg medido a los 4 días después de la inyección del anticuerpo. El límite superior de la normalidad (ULN) se calcula basándose en los niveles de citoquina medidos en 39 sujetos sanos, donde ULN = valor medio + 2 x desviación estándar.

En comparación con Teplizumab y TRX4 (resultados tomados de Herold *et al.*, 2002, *New Engl. J. Med.*, y Keymeulen *et al.*, 2005 *New Engl. J. Med.*, respectivamente) BT061 inducía solamente liberación de citoquinas mínima y transitoria. Los niveles de TNF- α e IL-6 aumentaron ligeramente. La Figura 7 muestra que los valores máximos medios de niveles de citoquinas IL-6 y TNF α detectados en plasma después de la aplicación de BT061 (40 y 60 mg) eran menores que los observados después del tratamiento con los anticuerpos terapéuticos, Teplizumab y TRX4, específicos para CD3.

Además, al contrario que los mAb anti-CD3, BT061 no condujo a aumentos sustancialmente elevados de los niveles de IFN- γ e IL-2 (Figura 8) tal como se informa para la aplicación de TRX4 (Keymeulen *et al.* 2005).

Linfocitos CD4⁺

Además, el ensayo también incluía un estudio de los números de linfocitos CD4-positivos en muestras de plasma recogidas.

Los resultados de la administración intravenosa se muestran a continuación en las Tablas 9, 10 y 11. La Tabla 12 muestra los resultados del ensayo con administración subcutánea. Los resultados se muestran de forma gráfica en las Figuras 9 y 10.

TABLA 9 Recuentos de linfocitos CD4+ en voluntarios sanos individuales después de administración intravenosa de 3,5 µg a 2,5 mg de BT061

TIEMPO	DOSIS														
	3,5 µg	3,5 µg	3,5 µg	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg	100 µg	100 µg	100 µg	500 µg	500 µg	500 µg	2,5 mg	2,5 mg
Dosis previa	998	878	1025	955	1209	666	1164	800	543	759	493	1240	891	782	
3 h	1098	746	1020	708	1121	642	452	791	319	777	566	1058	392	461	
6 h	922	710	1063	746	1091	590	363	627	314	805	381	1115	487	512	
12 h	898	1183	942	1016	1667	1055	465	1065	477	955	643	1505	669	881	
24 h	868	825	769	699	1043	517	399	606	347	687	439	1017	521	701	
36 h	948	1035	1148	861	1549	836	559	1016	485	869	688	1542	976	1207	
48 h	798	542	834	566	1119	711	384	644	413	730	509	1108	574	815	
72 h	798	626	766	622	942	575	400	749	503	696	484	969	537	689	
96 h	469	715	838	583	978	531	475	698	400	800	390	1026	499	785	
120 h	736	643	843	604	942	472	401	650	511	830	488	1168	501	782	
144 h	663	593	766	635	1200	510	372	573	432	705	394	953	518	745	
168 h	753	576	695	616	1012	505	348	646	426	740	475	1073	568	773	
día 14	716	615	625	696	867	645	400	771	451	713	600	1398	663	883	
día 21	941	378	707	637	971	633	391	805	404	651	533	1241	530	758	
día 28	821	569	840	652	863	649	497	775	503	752	445	1109	590	914	
día 42	922	442	784	676	1044	700	569	758	455	700	617	1120	770	901	
día 56	573	597	828	839	871	553	489	607	441	674	616	1311	634	1017	
día 75	1821	512	692	659	1058	553	466	735	459	645	522	1026	731	1032	
día 90															
Recuento celular mínimo (72 h hasta el día 75)	469	378	625	583	863	472	348	573	400	645	390	953	499	689	
Reducción Máxima de linfocitos CD4+ (%)	53,0	56,9	39,0	39,0	28,6	29,1	70,1	28,4	26,3	15,0	20,9	23,1	44,0	11,9	

TABLA 10 Recuentos de linfocitos CD4⁺ en voluntarios sanos individuales después de administración intravenosa de 2,5 mg a 20 mg de BT061

TIEMPO	DOSIS							
	2,5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	10 mg	10 mg	10 mg	20 mg
Dosis previa	1080	1116	623	1160	840	835	1281	700
3 h	488	313	108	111	104	143	132	63
6 h	514	445	164	246	122	82	120	110
12 h	699	763	346	573	297	285	366	199
24 h	726	617	282	539	470	496	772	351
36 h	985	1102	505	721	414	985	1417	677
48 h	738	807	390	687	388	794	942	493
72 h	711	736	419	700	440	830	919	504
96 h	680	791	395	806	516	641	918	538
120 h	649	669	438	750	543	674	1002	558
144 h	662	723	407	676	448	549	942	579
168 h	579	777	309	652	473	525	876	510
día 14	726	692	354	475	357	701	908	484
día 21	601	811	480	514	481	654	978	618
día 28	874	681	339	602	414	755	887	496
día 42	923	843	300	694	507	614	889	639
día 56	847		450	571	551	805	1006	420
día 75	1239		365	627	685	853	1080	537
día 90		721						
Recuento celular mínimo (72 h hasta el día 75)	579	669	300	475	357	525	876	420
Reducción Máxima de linfocitos CD4 ⁺ (%)	46,9	40,1	51,8	59,1	57,5	37,1	31,6	40,0

En particular, la Figura 9 muestra los recuentos de linfocitos CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con la dosis intravenosa individual de BT061. Los puntos de datos representan los valores medios de los 3 pacientes en cada grupo de dosis. Las líneas punteadas indican el límite superior de la normalidad (ULN) y el límite inferior de la normalidad (LLN). El ULN y el LLN (valor medio + (o -) la desviación estándar) se calcularon, basándose en recuentos celulares de voluntarios sanos, como 443 linfocitos CD4 por ml (límite inferior de la normalidad; LLN) y 1324 linfocitos CD4 por ml (límite superior de la normalidad; ULN).

La Figura 10 muestra los recuentos de linfocitos CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con la dosis subcutánea individual de BT061. Al igual que con la Figura 9, los puntos de datos representan los valores medios de los 3 pacientes en cada grupo de dosis. Las líneas punteadas indican el límite superior de la normalidad (ULN) y el límite inferior de la normalidad (LLN).

TABLA 11 Recuentos de linfocitos CD4⁺ en voluntarios sanos individuales después de administración intravenosa de 20 mg a 60 mg de BT061

TIEMPO	DOSIS							
	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
Dosis previa	843	1233	1152	789	976	900	989	2539
3 h	69	186	72	137	48	63	55	71
	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
6 h	83	245	87	147	69	81	78	109
12 h	214	469	262	221	212	360	276	182
24 h	266	490	208	222	292	315	285	313

ES 2 569 217 T3

TIEMPO	DOSIS							
	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
36 h	562	1019	489	475		707	561	569
48 h	359	792	460	455	703	413	500	565
72 h	392	909	591	545	625	709	688	806
96 h	468	755	567	545	733	717	737	774
120 h	391	795	578	517	636	718	685	646
144 h	347	897	548	523	760	714	732	606
168 h	331	853	630	577	720	656	822	662
día 14	334	899	683	495	675	851	546	423
día 21	396	1077	744	487	711	627	639	867
día 28	579	1030	637	458	582	466	757	1376
día 42	346	847	439	472	619	1179	814	1607
día 56	337	947	556	557	570	686	686	1298
día 75	597	824	986	440	813	648	748	1199
día 90								
Recuento celular mínimo (72 h hasta el día 75)	331	755	439	440	570	466	546	423
Reducción Máxima de linfocitos CD4⁺ (%)	60,7	38,8	61,9	44,2	41,6	48,2	44,8	83,3

TABLA 12 Recuentos de linfocitos CD4* en voluntarios sanos individuales después de aplicación subcutánea de BI061

TIEMPO	DOSIFICACION																		
	5 mg	5mg	5 mg	10 mg	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg				
Dosis previa	1053	553	663	962	697	891	863	692	621	689	946	840	1114	719	1345				
24 h	858	402	707	640	623	615	537	535	500	177	326	379	580	470	333				
36 h	1131	916	946	1232	955	1019	762	666	944	268	463	870	503	527	487				
48 h	625	526	550	610	757	537	628	599	587	354	586	686	739	735	551				
72 h	814	661	580	589	709	610	700	587	596	299	719	734	860	813	539				
96 h	799	582	694	666	732	579	643	665	589	283	605	653	852	743	608				
120 h	823	566	712	653	673	659	642	528	633	323	835	629	873	639	555				
144 h	890	543	809	744	767	784	603	620	627	239	626	568	801	924	591				
168 h	894	450	437	686	655	516	620	550	581	262	515	569	1010	843	820				
día 10	951	606	690	1213	724	928	683	616	778	354	715	809	757	1123	836				
día 14	719	647	948	969	724	859	843	642	1033	307	705	541	1198	1359	527				
día 21	859	552	750	655	708	685	904	605	752	293	1097	630	1074	901	750				
día 28	894	546	758	778	653	766	757	680	768	298	861	667		880	578				
día 42	854	461	1009	1235	805	785	775	469	634	308	678	709	568	1149	854				
día 56	806	560	958	977	665	753	801	589	531	342	541	948	1126	945	505				
día 75	852	592	772	1268	679	906	714	688	551	340	551	659							
Recuento celular mínimo (72 h hasta el día 75)	719	450	437	589	653	516	603	469	531	239	515	541	568	639	505				
Reducción Máxima de linfocitos CD4* (%)	31,7	18,6	34,1	38,8	6,3	42,1	30,1	32,2	14,5	65,3	45,6	35,6	49,0	11,1	62,5				

Muchos anticuerpos monoclonales específicos para CD4 conocidos en la técnica (tales como los que se revisan en Strand *et al.*, 2007) consiguen inmunosupresión a través de supresión de linfocitos CD4 positivos. El inconveniente de estos anticuerpos es que los individuos tratados llegan a estar inmunocomprometidos, y son susceptibles a otras infecciones.

5 Por el contrario con este estudio mostraba que BT061 inducía supresión masiva de larga duración de células CD4-positivas. Sin embargo, un declive transitorio de linfocitos CD4-positivos se observó con una recuperación a valores normales en la sangre periférica a las 72 h después de la administración del anticuerpo.

10 En el punto temporal de 72 h después de la aplicación de BT061, los recuentos de linfocitos CD4 en cuatro voluntarios de los grupos de dosis intravenosa presentaba niveles de linfocitos CD4 que eran más bajos que estos valores normales como sigue a continuación: 1 voluntarios de la dosis intravenosa de 100 µg: 400 linfocitos CD4 por µl; 1 voluntarios del grupo de 5 mg: 419 linfocitos CD4 por µl; 1 voluntario del grupo de 10 mg: 440 linfocitos CD4 por µl; y 1 voluntario del grupo de 20 mg: 392 linfocitos CD4 por µl.

15 Sin embargo, estos valores serán solamente ligeramente menores que los valores normales. Los recuentos de linfocitos CD4 en los 26 voluntarios restantes de los grupos de dosis intravenosa estaban dentro de los valores normales a las 72 horas después de la administración de BT061.

20 En los grupos de dosis subcutánea, después de 72 h, solamente uno de 15 voluntarios presentaban valores de recuentos de linfocitos CD4 por debajo de lo normal.

25 En conclusión, al contrario a la supresión de los mAb específicos para CD4, incluso a dosis elevadas, BT061 solamente inducía un declive transitorio de linfocitos CD4-positivos seguido de una recuperación general. A partir del declive transitorio y la recuperación general rápida a valores normales, se concluye que se ha producido una redistribución transitoria de los linfocitos CD4-positivos, en lugar de supresión de estas células.

EJEMPLO 7 - *Ensayos clínicos de BT061 en pacientes con psoriasis crónica de moderada a grave*

30 La capacidad de hB-F5 BT061 para tratar una enfermedad autoinmune se está sometiendo al ensayo en 56 pacientes que padecen psoriasis crónica de moderada a grave. El ensayo comprende un estudio de aumento de las dosis individuales para evaluar la seguridad y la eficacia de hB-F5.

Las condiciones del ensayo son las que siguen a continuación:

35 Los 56 pacientes se dividen en siete grupos de dosis, comprendiendo cada grupo ocho individuos. Cinco grupos de dosis (grupos de dosis I a V) recibirán el anticuerpo o placebo mediante administración intravenosa y dos grupos de dosis (grupos de dosis VI y VII) recibirán el anticuerpo o placebo mediante administración subcutánea. Dos pacientes de cada grupo de dosis reciben un placebo, mientras que los seis pacientes restantes de cada grupo de dosis reciben una dosis de BT061. En el grupo de dosis I, los seis pacientes reciben 0,5 mg de BT061 por vía intravenosa. En los grupos de dosis II a V, los seis pacientes reciben 2,5 mg, 5 mg, 10 mg, o 20 mg de BT061, respectivamente. En los grupos de dosis VI y VII donde la administración es subcutánea, los seis pacientes reciben 12,5 mg o 25 mg de BT061, respectivamente.

45 Para administración intravenosa, el anticuerpo/placebo se va a infundir en la vena del antebrazo de acuerdo con procedimientos médicamente aceptados. En el presente caso, el volumen total se administra como una sola infusión intravenosa continua durante un periodo de 2 horas mediante un perfusor (Fresenius Pilot C, Fresenius AG, Alemania). Cada dosis del anticuerpo se diluye con una inyección de cloruro sódico al 0,9 % (B. Braun Melsungen AG, Alemania) hasta un volumen total de 20 ml.

50 Para administración subcutánea, el anticuerpo se debe administrar como una sola inyección subcutánea. El mismo procedimiento se aplica para el placebo.

55 El nivel de psoriasis presentado por cada paciente se registra usando el Área de Psoriasis y la puntuación del Índice de Gravedad (PASI). Como se ha descrito anteriormente, las puntuaciones de PASI más elevadas corresponden a un nivel más elevado de psoriasis. Los pacientes inscritos en el ensayo tienen una psoriasis crónica de moderada a grave, es decir, una puntuación de PASI de 10 o superior.

60 La puntuación de PASI del paciente se evalúa antes del ensayo para proporcionar un valor de "medida inicial" el día 0, y de forma repetida durante el ensayo los días 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56 y 75.

Grupo de Dosis I

65 Seis pacientes del grupo de dosis I recibieron una son la aplicación intravenosa de 0,5 mg de BT061, mientras que dos pacientes del grupo de dosis I recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (BSA) para cada paciente se muestran en la Tabla 13. El área de superficie corporal se calculó de acuerdo con la

fórmula de Mosteller que se describe en el presente documento.

Las puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis I se muestran en la Tabla 13 junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación de PASI a partir de la medida inicial.

5

Grupo de Dosis II

Seis pacientes del grupo de dosis II recibieron una sola inyección intravenosa de 2,5 mg de BT061 mientras que los pacientes del grupo de dosis II recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (BSA) para cada paciente se muestran en la Tabla 14.

10

Las puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis II se muestran en la Tabla 14 junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación de PASI a partir de la medida inicial.

15 *Grupo de Dosis III*

Seis pacientes del grupo de dosis III recibieron una sola inyección intravenosa de 5,0 mg de BT061 mientras que los pacientes del grupo de dosis III recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (BSA) para cada paciente se muestran en la Tabla 14B.

20

Las puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis III se muestran en la Tabla 14B junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación de PASI a partir de la medida inicial.

25 *Grupo de Dosis IV*

Seis pacientes del grupo de dosis IV recibieron una sola inyección intravenosa de 10,0 mg de BT061 mientras que los pacientes del grupo de dosis IV recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (BSA) para los pacientes se muestra en la Tabla 14C.

25

30 Las puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis IV se muestran en la Tabla 14C junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación de PASI a partir de la medida inicial.

TABLA 13 - Puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis I (0,5 mg de dosis intravenosa) durante el transcurso del ensayo

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [$\mu\text{g}/\text{kg}/$ [mg/m^2]	5,2 / 0,23	5,9 / 0,25	4,6 / 0,22	5,3 / 0,24	4,8 / 0,22	8,5 / 0,31	4,7 / 0,21	7,0 / 0,28
Puntuación de PASI (cambio relativo / mejoría con respecto a la medida inicial)								
Medida inicial	12,2	13,5	12,1	14,0	12,1	12,6	12,1	15,2
Día 5	12,0 (2 %)	12,1 (10 %)	9,1 (25 %)	12,2 (13 %)	10,9 (10 %)	11,8 (6 %)	9,4 (22 %)	10,2 (33 %)
Día 7	12,0 (0 %)	10,7 (21 %)	7,7 (36 %)	11,6 (17 %)	11,2 (7 %)	10,7 (15 %)	9,3 (23 %)	9,0 (41 %)
Día 14	11,8 (3 %)	9,5 (30 %)	5,7 (53 %)	9,6 (31 %)	8,7 (28 %)	10,4 (17 %)	7,8 (36 %)	7,2 (53 %)
Día 21	11,6 (5 %)	10,0 (26 %)	5,1 (58 %)	7,2 (49 %)	8,0 (34 %)	8,0 (37 %)	6,0 (50 %)	6,5 (57 %)
Día 28	-	10,4 (23 %)	4,8 (60 %)	8,4 (40 %)	8,2 (32 %)	6,5 (48 %)	6,4 (47 %)	6,4 (58 %)
Día 42	11,4 (7 %)	11,2 (17 %)	5,1 (58 %)	8,4 (40 %)	7,9 (35 %)	6,1 (52 %)	5,5 (55 %)	5,5 (55 %)
Día 56	11,4 (7 %)	10,1 (25 %)	4,2 (65 %)	9,2 (34 %)	7,9 (35 %)	5,7 (55 %)	5,3 (56 %)	5,3 (56 %)
Día 75	11,6 (5 %)	7,7 (43 %)	5,1 (58 %)	9,8 (30 %)	9,6 (21 %)	5,1 (60 %)	5,4 (55 %)	7,8 (49 %)

35

TABLA 14A - Puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis II (2,5 mg de dosis intravenosa) durante el transcurso del ensayo

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [µg/kg]/ [mg/m ²]	27,8 / 1,20	31,6 / 1,30	31,8 / 1,28	23,6 / 1,08	28,4 / 1,19	39,4 / 1,49	26,5 / 1,17	28,4 / 1,19

Puntuación de PASI (cambio relativo / mejoría con respecto a la medida inicial)

Medida inicial	17,1	13,8	10,9	18,6	15,0	12,6	13,9	13,5
Día 5	14,5 (15 %)	15,5 (+12 %)	6,8 (38 %)	17,6 (5)	12,1 (19 %)	12,6 (0 %)	19,5 (+40 %)	15,6 (+16 %)
Día 7	12,3 (28 %)	13,6 (1 %)	5,2 (52 %)	19,7 (+6 %)	14,0 (7 %)	13,0 (+3 %)	17,0 (+22 %)	14,8 (+10 %)
Día 14	10,8 (37 %)	15,5 (+12 %)	3,9 (64 %)	11,1 (40 %)	11,8 (21 %)	16,6 (+32 %)	11,4 (18 %)	8,0 (41 %)
Día 21	9,7 (43 %)	12,2 (12 %)	3,9 (64 %)	13,7 (26 %)	12,4 (17 %)	11,4 (10 %)	7,9 (43 %)	7,1 (47 %)
Día 28	8,6 (50 %)	9,4 (32 %)	1,5 (86 %)	7,6 (59 %)	12,2 (19 %)	12,8 (+2 %)	8,2 (41 %)	6,5 (52 %)
Día 42	8,8 (49 %)	8,5 (38 %)	1,3 (88 %)	10,2 (45 %)	12,2 (19 %)	11,0 (13 %)	7,8 (44 %)	9,0 (33 %)
Día 56	6,3 (63 %)	8,3 (40 %)	1,3 (88 %)	-	14,2 (5 %)	9,7 (23 %)	8,2 (41 %)	7,8 (42 %)
Día 75	6,0 (65 %)	5,6 (59 %)	1,9 (83 %)	9,2 (51 %)	14,7 (2 %)	10,4 (17 %)	10,2 (27 %)	8,1 (40 %)

TABLA 14B - Puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis III (5,0 mg de dosis intravenosa) durante el transcurso del ensayo

5

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [µg/kg]/ [mg/m ²]	70,4 / 2,73	57,5 / 2,40	43,9 /	59,5 /	52,4 /	56,8 /	71,4 /	66,2 /

Puntuación de PASI (cambio relativo / mejoría con respecto a la medida inicial)

Medida inicial	15,8	14,1	17,4	12,4	17,3	12,4	13,5	10,4
Día 5	13,0 (18 %)	27,2 (+93 %)	17,7 (+2 %)	12,0 (3 %)	16,8 (3 %)	10,6 (15 %)	-	-
Día 7	14,3 (9 %)	18,9 (+34 %)	15,6 (10 %)	11,1 (10 %)	17,6 (+2 %)	11,4 (8 %)	11,0 (19 %)	8,2 (21 %)
Día 14	13,5 (15 %)	30,3 (+115 %)	14,0 (20 %)	9,3 (25 %)	14,4 (17 %)	13,0 (+5 %)	9,4 (30 %)	7,6 (27 %)
Día 21	10,1 (36 %)	23,1 (+64 %)	14,4 (17 %)	9,2 (26 %)	14,7 (15 %)	11,6 (6 %)	9,4 (30 %)	-
Día 28	9,6 (39 %)	23,1 (+64 %)	13,4 (23 %)	10,2 (18 %)	13,8 (20 %)	11,2 (10 %)	8,3 (39 %)	8,6 (17 %)
Día 42	9,2 (42 %)	20,1 (+43 %)	14,4 (17 %)	10,2 (18 %)	13,2 (24 %)	12,6 (+2 %)	8,3 (39 %)	-
Día 56	10,0 (37 %)	20,1 (+43 %)	15,8 (9 %)	-	13,2 (24 %)	10,6 (15 %)	9,6 (20 %)	-
Día 75	12,8 (19 %)	22,5 (+60 %)	16,0 (8 %)	9,0 (27 %)	13,2 (24 %)	13,2 (+6 %)	13,4 (1 %)	9,6 (8 %)

TABLA 14C - Puntuaciones de PASI para los pacientes en el grupo de dosis IV (10,0 mg de dosis intravenosa) durante el transcurso del ensayo

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [$\mu\text{g}/\text{kg}$]/ [mg/m^2]	173,0 /	142,9 /	102,8 /	115,6 /	119,6/	108,8/	75,9/	106,6/
Puntuación de PASI (cambio relativo / mejoría con respecto a la medida inicial)								
Medida inicial	14,6	11,0	21,6	22,0	19,0	11,6	14,0	12,4
Día 5	12,8 (12 %)	11,0 (0 %)	21,6 (0 %)	16,8 (24 %)	18,8 (1 %)	11,2 (3 %)	14,2 (+1 %)	11,4 (8 %)
Día 7	12,8 (12 %)	11,0 (0 %)	21,6 (0 %)	16,8 (24 %)	18,2 (4 %)	11,2 (3 %)	14,2 (+1 %)	8,4 (32 %)
Día 14	11,4 (22 %)	11,0 (0 %)	21,6 (0 %)	18,1 (18 %)	16,7 (12 %)			
Día 21	11,4 (22 %)	11,0 (0 %)	22,5 (+4 %)	19,0 (14 %)	17,3 (9 %)			
Día 28	11,4 (22 %)	8,9 (19 %)	22,0 (7 %)	17,7 (20 %)				
Día 42	11,0 (25 %)	9,4 (15 %)	22,6 (+5 %)	18,8 (15 %)				
Día 56	11,4 (22 %)	9,8 (11 %)						
Día 75								

5 Además, las puntuaciones de PASI con respecto al tiempo para pacientes individuales se muestran en forma de gráfico en las Figuras 11A a 11H y en las Figuras 12A a 12H. Los gráficos mostrados en las Figuras 11A a 11H representan puntuaciones de PASI para pacientes del grupo de dosis I, mientras que los gráficos mostrados en las Figuras 12A a 12H representan puntuaciones de PASI para pacientes del grupo de dosis II.

10 Como se puede observar a partir de los resultados mostrados en las Tablas 13 y 14, 75 % de todos los pacientes del grupo de dosis I y del grupo de dosis II muestran una clara mejoría de sus puntuaciones de PASI, es decir, al menos un 40 % de mejoría con respecto al valor de la medida inicial, después de una sola dosis. Se debería indicar que un 25 % de los pacientes en el grupo de dosis I y el grupo de dosis II recibieron un placebo.

15 De hecho, en ambos grupos de dosis, un 50 % de los pacientes mostraban al menos un 50 % de mejoría en sus puntuaciones de PASI, con un paciente del grupo de dosis II mostrando un 88 % de mejorar en la puntuación de PASI en el día 56, (es decir, el paciente 3 en la Tabla 14). Además, el efecto terapéutico es incluso más duradero a estas dosis bajas, con las mejoras aún observándose en muchos pacientes al final del ensayo, 75 días después de la administración.

20 Los pacientes en el grupo de dosis III también muestran una mejoría en su puntuación de PASI, con seis de ocho pacientes mostrando una mejoría superior a un 20 % y dos de seis mostrando una mejoría superior a un 30 % después del tratamiento. Sin embargo, la mejoría no era tan significativa como la observada en pacientes del grupo de dosis I y el grupo de dosis II que recibieron una dosis más baja del anticuerpo. También se observa una cierta eficacia en los pacientes del grupo de dosis IV. En los pacientes 1, 4, 5 y 8 en particular en este grupo de dosis (como se muestra en la Tabla 14C) muestran una clara mejoría en sus puntuaciones de PASI, aunque es limitado en comparación con los pacientes de los grupos de dosis I a III.

30 El número de pacientes que muestran una mejoría de al menos un 40 %, un 50 %, un 60 % y un 75 % en la puntuación de PASI se muestra en la Tabla 15.

TABLA 15 – Resumen de resultados de los Grupos de Dosis I a III

	Grupo de Dosis I* 0,5 mg de BT-061	Grupo de Dosis II* 2,5 mg de BT-061	Grupo de Dosis III* 5,0 mg de BT061
Mejoría \geq 40 %	6/8 pacientes	6/8 pacientes	1/8 pacientes
Mejoría \geq 50 %	4/8 pacientes	4/8 pacientes	0/8 pacientes
Mejoría \geq 60 %	1/8 pacientes	2/8 pacientes	0/8 pacientes

	Grupo de Dosis I* 0,5 mg de BT-061	Grupo de Dosis II* 2,5 mg de BT-061	Grupo de Dosis III* 5,0 mg de BT061
Mejoría ≥ 75 %	0/8 pacientes	1/8 pacientes	0,8 pacientes
* grupo por dosis: un 75 % de los pacientes recibieron BT061, un 25 % de los pacientes recibieron placebo			

Las Figuras 13A y 13B proporcionan evidencia fotográfica de la mejoría en el nivel de psoriasis antes y después del tratamiento. La Figura 13A muestra una zona de psoriasis en la piel de un paciente en el grupo de dosis II antes de su administración. La Figura 13B muestra la misma zona de psoriasis 28 días después de la administración. Las zonas de mejoría están marcadas en la Figura 13B con cajas de color negro.

A partir de estos resultados, se puede observar claramente que BT061 proporciona un tratamiento eficaz para la psoriasis crónica moderada y grave.

Los resultados de este estudio, en combinación con los que se han descrito anteriormente en el Ejemplo 6 que muestran que las dosis elevadas del anticuerpo de la invención por lo general se toleran bien en seres humanos, demuestra la capacidad de las composiciones farmacéuticas de la invención para proporcionar tratamiento eficaz de enfermedades autoinmunes a las dosis que se describen en el presente documento.

15 EJEMPLO 8 - *Ensayo clínico de BT061 en pacientes con artritis reumatoide*

La capacidad de BT061 para tratar la artritis reumatoide se está sometiendo ensayo en pacientes que padecen esta enfermedad. El ensayo comprende un estudio de múltiples dosis que implican a 96 pacientes, divididos en 12 grupos. En cada grupo, los pacientes reciben un placebo mientras que 6 pacientes reciben BT061. Los pacientes se dosifican una vez a la semana durante un periodo de 6 meses.

Los pacientes se dividen en los que reciben el anticuerpo por vía subcutánea en los que reciben el anticuerpo por vía intravenosa. Los grupos de dosis subcutánea son: 1,25 mg, 6,25 mg, 12,5 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg y 100 mg. Los grupos de dosis intravenosa son: 0,5 mg, 2 mg, 6,25 mg, 12,5 mg y 25 mg.

En el grupo de dosis subcutánea de 1,25 mg, los pacientes se numeran como 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108. En el grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg, los pacientes se numeran como 201-208. En el grupo de dosis subcutánea de 12,5 mg, los pacientes se numeran como 301-308. En el grupo de dosis subcutánea de 25 mg, los pacientes se numeran como 401-408. En el grupo de dosis subcutánea de 50 mg, los pacientes se numeran como 501-508. En el grupo de dosis intravenosa de 6,25 mg, los pacientes se numeran como 601-608.

El procedimiento de administración intravenosa y subcutánea fue el mismo que se ha descrito en el Ejemplo 7 para el ensayo de psoriasis.

El nivel de artritis reumatoide se registra de forma semanal mediante la evaluación de los parámetros de ACR y en particular estudiando el número de articulaciones sensibles e hinchadas y siguiendo los niveles de proteína C-reactiva (CRP) y la tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR). Estos parámetros se evalúan antes del ensayo para proporcionar un valor de la "medida inicial" en el día 0, y de forma repetida durante el periodo del ensayo y en lo sucesivo a los 8, 22 y 43 días después de acabar el periodo de administración (es decir, seguimiento (FU) el día 8, FU el día 22 y FU el día 43).

Las Tablas que siguen a continuación proporcionan los datos obtenidos a partir del ensayo. De forma específica, las Tablas 16 a 21 proporcionan el número de articulaciones e hinchadas durante el transcurso del ensayo.

Tabla 16 - Recuentos de articulación sensible e hinchada a partir del grupo de dosis subcutánea de 1,25 mg

Pacientes – Grupo de dosis SC de 1,25 mg	Articulaciones (n.º)	Visitas									
		Visita de Exploración	Día 1 Semana 1	Día 8 Semana 2	Día 15 Semana 3	Día 22 Semana 4	Día 29 Semana 5	Día 36 Semana 6	Seguimiento Día 43 Semana 7	Seguimiento Día 57 Semana 9	Seguimiento Día 78 Semana 12
101	sensible	34	34	32	-	-	-	-	-	-	0
	hinchada	10	10	18	-	-	-	-	-	-	0
102	sensible	25	26	22	16	16	24	24	30	28	29
	hinchada	12	13	9	10	9	15	12	9	18	15
103	sensible	11	12	12	9	8	7	7	30	28	3
	hinchada	7	8	8	6	6	6	6	9	18	2
104	sensible	17	10	4	3	20	17	9	5	5	0
	hinchada	8	6	0	0	0	8	2	0	0	0
105	sensible	24	23	22	23	35	32	35	32	34	33
	hinchada	14	14	14	17	18	18	19	19	20	20
106	sensible	20	21	20	13	8	9	13	12	11	11
	hinchada	9	12	9	10	5	5	6	5	5	7
107	sensible	14	14	11	10	16	14	14	14	11	11
	hinchada	8	9	8	8	5	5	5	6	6	6
108	sensible	11	12	10	10	7	4	8	8	2	13
	hinchada	10	11	7	11	10	9	11	7	6	8

Tabla 17 - Recuentos de articulación sensible e hinchada a partir del grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg

Pacientes – Grupo de dosis SC de 6,25 mg	Articulaciones (n.º)	Visitas									
		Visita de Exploración	Día 1 Semana 1	Día 8 Semana 2	Día 15 Semana 3	Día 22 Semana 4	Día 29 Semana 5	Día 36 Semana 6	Seguimiento Día 43 Semana 7	Seguimiento Día 57 Semana 9	Seguimiento Día 78 Semana 12
201	sensible	16	17	15	14	12	15	13	11	9	9
	hinchada	9	10	7	6	6	5	6	5	6	6
202	sensible	14	10	10	10	8	8	8	8	9	13
	hinchada	10	8	6	6	4	4	4	4	4	6
203	sensible	15	14	10	8	10	10	8	7	5	5
	hinchada	11	11	10	9	9	10	7	7	6	7
204	sensible	19	22	16	0	0	10	2	10	11	0
	hinchada	10	10	5	0	0	4	0	0	10	0
205	sensible	21	21	0	0	14	30	10	37	-	12
	hinchada	9	9	0	0	14	16	6	25	-	8
206	sensible	16	16	15	13	13	17	19	-	-	5
	hinchada	10	12	12	10	14	11	11	-	-	4
207	sensible	17	28	28	11	9	15	17	14	18	22
	hinchada	11	12	13	7	10	11	8	10	11	10
208	sensible	13	12	9	8	9	11	10	-	-	12
	hinchada	10	10	9	9	10	10	9	-	-	8

Tabla 18 - Recuentos de articulación sensible e hinchada a partir del grupo de dosis subcutánea de 12,5 mg

Pacientes – Grupo de dosis SC de 12,5 mg	Articulaciones (n.º)	Visitas										
		Visita de Exploración	Día 1 Semana 1	Día 8 Semana 2	Día 15 Semana 3	Día 22 Semana 4	Día 29 Semana 5	Día 36 Semana 6	Seguimiento Día 43 Semana 7	Seguimiento Día 57 Semana 9	Seguimiento Día 78 Semana 12	
301	sensible	18	18	16	16	16	16	16	16	20	14	14
	hinchada	8	8	8	8	8	8	8	8	6	6	6
302	sensible	36	36	34	35	31	-	-	-	-	-	30
	hinchada	20	20	19	19	17	-	-	-	-	-	18
303	sensible	20	19	19	16	15	14	16	18	-	-	19
	hinchada	10	11	12	13	13	14	13	14	-	-	14
304	sensible	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8
	hinchada	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4
305	sensible	16	16	14	14	13	13	13	12	10	10	10
	hinchada	8	8	8	8	6	6	6	6	4	4	4
306	sensible	27	27	18	18	12	23	28	-	-	-	29
	hinchada	14	14	20	11	16	13	17	-	-	-	24
307	sensible	25	23	23	17	17	17	17	15	13	11	11
	hinchada	8	8	8	8	8	8	8	6	6	4	4
308	sensible	20	20	18	8	8	8	8	8	8	4	4
	hinchada	12	12	8	6	6	5	6	6	6	6	4

Tabla 19 - Recuentos de articulación sensible e hinchada a partir del grupo de dosis subcutánea de 25 mg

Pacientes – Grupo de dosis SC de 25 mg	Articulaciones (n.º)	Visitas										
		Visita de Exploración	Día 1 Semana 1	Día 8 Semana 2	Día 15 Semana 3	Día 22 Semana 4	Día 29 Semana 5	Día 36 Semana 6	Seguimiento Día 43 Semana 7	Seguimiento Día 57 Semana 9	Seguimiento Día 78 Semana 12	
401	sensible	16	17	19	22	13	13	12	11	9	6	6
	hinchada	10	11	8	9	12	11	8	5	8	5	5
402	sensible	23	21	10	10	10	9	8	7	6	7	7
	hinchada	8	11	5	6	6	5	4	3	3	3	3
403	sensible	10	10	10	8	8	10	10	7	6	8	8
	hinchada	8	8	8	6	5	5	5	5	5	5	5
404	sensible	17	16	15	15	13	14	14	16			
	hinchada	9	11	10	6	7	7	7	7			
405	sensible	10	10	8	8	8	8	8	10	-	10	10
	hinchada	6	6	4	4	4	4	4	6	-	6	6
406	sensible	11	11	11	11	11	12	8	8	6	8	8
	hinchada	6	6	6	6	5	5	3	3	2	4	4
407	sensible	13	20	16	18	4	2	0	4	14		
	hinchada	7	10	6	8	0	0	0	0	8		
408	sensible	11	11	8	8	7	5	4	4	-	8	8
	hinchada	9	9	5	5	4	6	6	3	-	6	6

Tabla 20 - Recuentos de articulación sensible e hinchada a partir del grupo de dosis subcutánea de 50 mg

Pacientes – Grupo de dosis SC de 50 mg	Articulaciones (n.º)	Visitas									
		Visita de Exploración	Día 1 Semana 1	Día 8 Semana 2	Día 15 Semana 3	Día 22 Semana 4	Día 29 Semana 5	Día 36 Semana 6	Seguimiento Día 43 Semana 7	Seguimiento Día 57 Semana 9	Seguimiento Día 78 Semana 12
501	sensible	10	10	12	15	12	15	16	-	-	15
	hinchada	10	10	10	10	10	13	13	-	-	13
502	sensible	14	15	11	16	12	7	8			
	hinchada	5	9	10	10	7	4	5			
503	sensible	13	13	11	7	7	6	6	5	5	
	hinchada	8	8	8	6	6	3	3	2	3	
504	sensible	11	12	10	8	7	11	11	13		
	hinchada	8	8	8	6	7	7	7	8		
505	sensible	12	13	8	2	1					
	hinchada	7	7	5	0	0					
506	sensible	36	48	32							
	hinchada	8	8	4							
507	sensible										
	hinchada										
508	sensible										
	hinchada										

Tabla 21 - Recuentos de articulación sensible e hinchada a partir del grupo de dosis intravenosa de 6,25 mg

Pacientes – Grupo de dosis IV de 6,25 mg	Articulaciones (n.º)	Visitas									
		Visita de Exploración	Día 1 Semana 1	Día 8 Semana 2	Día 15 Semana 3	Día 22 Semana 4	Día 29 Semana 5	Día 36 Semana 6	Seguimiento Día 43 Semana 7	Seguimiento Día 57 Semana 9	Seguimiento Día 78 Semana 12
601	sensible	23	20	24	39	33	26	31			
	hinchada	13	15	15	25	26	20	21			
602	sensible	41	43	33	15	12	30	17	19	14	
	hinchada	13	12	8	10	10	6	5	5	7	
603	sensible	26	22	28	22	24	24				
	hinchada	10	4	8	4	4	6				
604	sensible	28	26	31	27	14	10	11	7	9	
	hinchada	8	8	8	10	6	2	2	3	1	
605	sensible	34	38	38	36						
	hinchada	22	18	22	20						
606	sensible	12	14								
	hinchada	8	9								
607	sensible	27	27								
	hinchada	17	19								
608	sensible										
	hinchada										

La Figura 14 muestra el porcentaje de pacientes de los grupos de dosis que recibieron 1,25 mg, 6,25 mg, 12,5 mg y 25 mg de BT061 por vía subcutánea que consiguen una mejoría de al menos un 20 % de los parámetros de ACR relevantes durante el transcurso del ensayo, y el porcentaje de pacientes que consiguen al menos una respuesta de ACR20 en la semana 7.

5 En particular, se puede observar que un 50 % de los pacientes en el grupo de dosis subcutánea de 25 mg (es decir 4 de los 8 pacientes donde 2 de los pacientes están recibiendo un placebo) consiguió una mejoría de al menos un 20 % de los parámetros de ACR relevantes en la semana 6. Estos números aumentaron a 5 de los 8 pacientes en la semana 7, es decir 5 de los 8 pacientes consiguieron al menos ACR20. Un paciente de este grupo de dosis
10 consiguió una mejoría de más de un 50 % de los parámetros de ACR relevantes en las semanas 5 y 6 (el conjunto de todos los datos no se muestra).

También se obtuvieron resultados positivos con pacientes en otros grupos de dosis. Un paciente en el grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg consiguió una mejoría de al menos un 50 % de los parámetros de ACR relevantes en la semana 4 mientras que otro consiguió una mejoría de al menos un 70 % de los parámetros de ACR relevantes en la semana 3 (el conjunto de todos los datos no se muestra).
15

Las Figuras 15A y 15B muestran resultados para el número de articulaciones sensibles e hinchadas presentadas por pacientes del grupo de dosis de BT061 por vía subcutánea de 25 mg durante un periodo de seis semanas. Varios
20 pacientes presentan una reducción del número de articulaciones sensibles e hinchadas durante un periodo del tratamiento. Los resultados para un paciente que responde y un paciente que no responde de este grupo de dosis se muestran en las Figuras 16A y 16B, respectivamente. El paciente que responde muestra una mejoría significativa del número de articulaciones sensibles e hinchadas y en los niveles de dolor.

25 Una reducción en los números de articulaciones sensibles e hinchadas también se observa en pacientes de los otros grupos de dosis. Las Figuras 17A, 17B, 18A y 18B muestran el número de articulaciones sensibles en los grupos de dosis de 1,25 mg por vía subcutánea, 6,25 mg por vía subcutánea, 50 mg por vía subcutánea y 6,25 mg por vía intravenosa respectivamente, durante el transcurso del ensayo en las semanas que siguen a partir de ese momento.

30 Estos resultados demuestran la eficacia del anticuerpo de la presente invención en el tratamiento de artritis reumatoide dentro de los intervalos de dosis descritos en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Biotest AG
<120> Agente para tratar enfermedades
<130> 313680.WO/JND/CJS
40 <160> 18
<170> PatentIn versión 3.3
45 <210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> dominio V de cadena H del anticuerpo hB-F5H37L humanizado
<400> 1

ES 2 569 217 T3

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

<210> 2

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio V de cadena K del anticuerpo hB-F5L4M humanizado

400> 2

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

ES 2 569 217 T3

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

5 <210> 3
 <211> 550
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Parte del plásmido que codifica el dominio V de cadena H del anticuerpo hB-F5 humanizado
 <400> 3

gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcattcttc tgcccgtgct gggcctccca 60
 tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg aggggtgttt 120
 cactttgctg tttccttttg tctccaggtg tcctgtcaga ggaacagctt gtggagtctg 180
 ggggaggctt ggtgaaaccg ggaggttctc tgaggctctc ctgtgcagcc tcgggtttca 240
 gtttcagtga ctgccggatg tactgggttc gccaggctcc agggaagggg ctggagtgga 300
 ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag tctgtgaggg 360
 gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggt ctattctgcag atgaacagct 420
 tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgcctc ctattatagg tacgacgtgg 480
 gggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca ggtaagaatg 540
 gccaagcttg 550

15 <210> 4
 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Parte del plásmido que codifica el dominio V de cadena K del anticuerpo hB-F5 humanizado
 <400> 4

ES 2 569 217 T3

ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta aatgacatat 60
 ttcaattata tctgagacag cgtgtataag tttatgtata atcattgtcc attcctgact 120

 acaggtgcct acggggacat cgtgatgacc cagtctccag actccctggc tgtgtctctg 180
 ggcgagaggg ccaccatcaa ctgcagggcc agcaaaagtg tcagtacatc tggctacagt 240
 tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgctcat ttaccttgca 300
 tccatcctag aatctggggc ccctgaccga ttcagtggca gcggtctggt gacagatttc 360
 actctcacca tcagcagcct gcaggctgaa gatgtggcag tttattactg tcagcacagt 420
 agggaacttc cgtggacggt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacy tgagtagaat 480
 ttaaatttta agcttctt 498

5 <210> 5
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

caggaatacc ttgtggagac cgggggagggc ttggtgagggc ctggaattc tctgaaactc 60
 tcctgtgtca cctcgggttt cagtttcagt gactgccgga tgtactggct tcgccagcct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca 180
 aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actatttcaa gagatgattc aaaaagcagt 240
 gtctatctgc agatgagcag attgagagag gaagacactg ccacttatta ttgtagtgcc 300
 tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc 360
 actgtctctg ca 372

10

 15 <210> 6
 <211> 383
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

gacattgtgc tgacacagtc tccttcttcc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac 120
 caacagatcc caggacagcc acccaaaactc ctcatctatc ttgcatccat cctagaatct 180
 ggggtccctg gcaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 360
 atcttcccac catccagtga gca 383

20

 25 <210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 569 217 T3

<400> 7

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

5 <210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 8

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

ES 2 569 217 T3

<210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 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
 10
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 10
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 20
 <210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 11
 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
 30
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 35
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 40
 <210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

ES 2 569 217 T3

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

5
<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

10

15
<210> 15
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

20

25
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30
<210> 17
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<223> dominio V de cadena H del anticuerpo hb-F5H37V humanizado

<400> 17

ES 2 569 217 T3

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
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

<210> 18

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio V de cadena K del anticuerpo hB-F5L4L humanizado

<400> 18

ES 2 569 217 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. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 20 mg a 100 mg, donde la dosis se debe administrar de forma semanal, y donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

10 - dominio V de cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

15 - dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
 2).

2. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado se debe administrar a un sujeto en una dosis de 20 mg a 80 mg, y preferentemente de 20 mg a 60 mg.

20 3. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado se debe administrar a un sujeto en una dosis de 20 mg, 25 mg, 60 mg, 75 mg, 80 mg o 100 mg.

25 4. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 8 a 60 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto, donde la dosis se debe administrar de forma semanal, y donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

30 - dominio V de cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

35 - dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
 2).

40 5. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4 donde la composición se debe administrar a un sujeto en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 8 a 50 mg/m², y preferentemente de 8 a 40 mg/m².

45 6. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺, donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 0,2 a 1,5 mg/kg, donde la dosis se debe administrar de forma semanal, y

donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

- dominio V de cadena H:

5

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
 2).

10

7. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 6 donde la composición se debe administrar a un sujeto en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 0,2 a 1 mg/kg, y preferentemente en una dosis de 1 mg/kg.

15

8. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente donde la enfermedad autoinmune se selecciona entre psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, lupus sistémico eritematoso y enfermedades relacionadas con trasplantes tales como injerto contra hospedador o problemas generales de tolerancia a órganos.

20

9. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente donde la composición se proporciona en un volumen de dosificación de 0,1 a 3 ml, preferentemente de 0,5 a 1,5 ml.

25

10. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8 donde la enfermedad autoinmune es psoriasis o artritis reumatoide.

30

11. Uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar linfocitos T reguladores de CD4⁺CD25⁺ para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio constante de IgG1 y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

- dominio V de cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
 ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

35

- dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
 2),

40

y donde la composición se debe administrar a un sujeto por vía subcutánea en una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de: (i) de 20 mg a 100 mg; (ii) de 8 a 60 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto, o (iii) de 0,2 a 1,5 mg/kg, donde la dosis se debe administrar de forma semanal.

45

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde:

- 5 (i) la enfermedad autoinmune se selecciona entre psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, lupus sistémico eritematoso y enfermedades relacionadas con trasplantes tales como injerto contra hospedador o problemas generales de tolerancia a órganos, y es preferentemente psoriasis o artritis reumatoide; y/o
- (ii) la composición se proporciona en un volumen de dosificación de 0,1 a 3 ml, preferentemente de 0,5 a 1,5 ml.

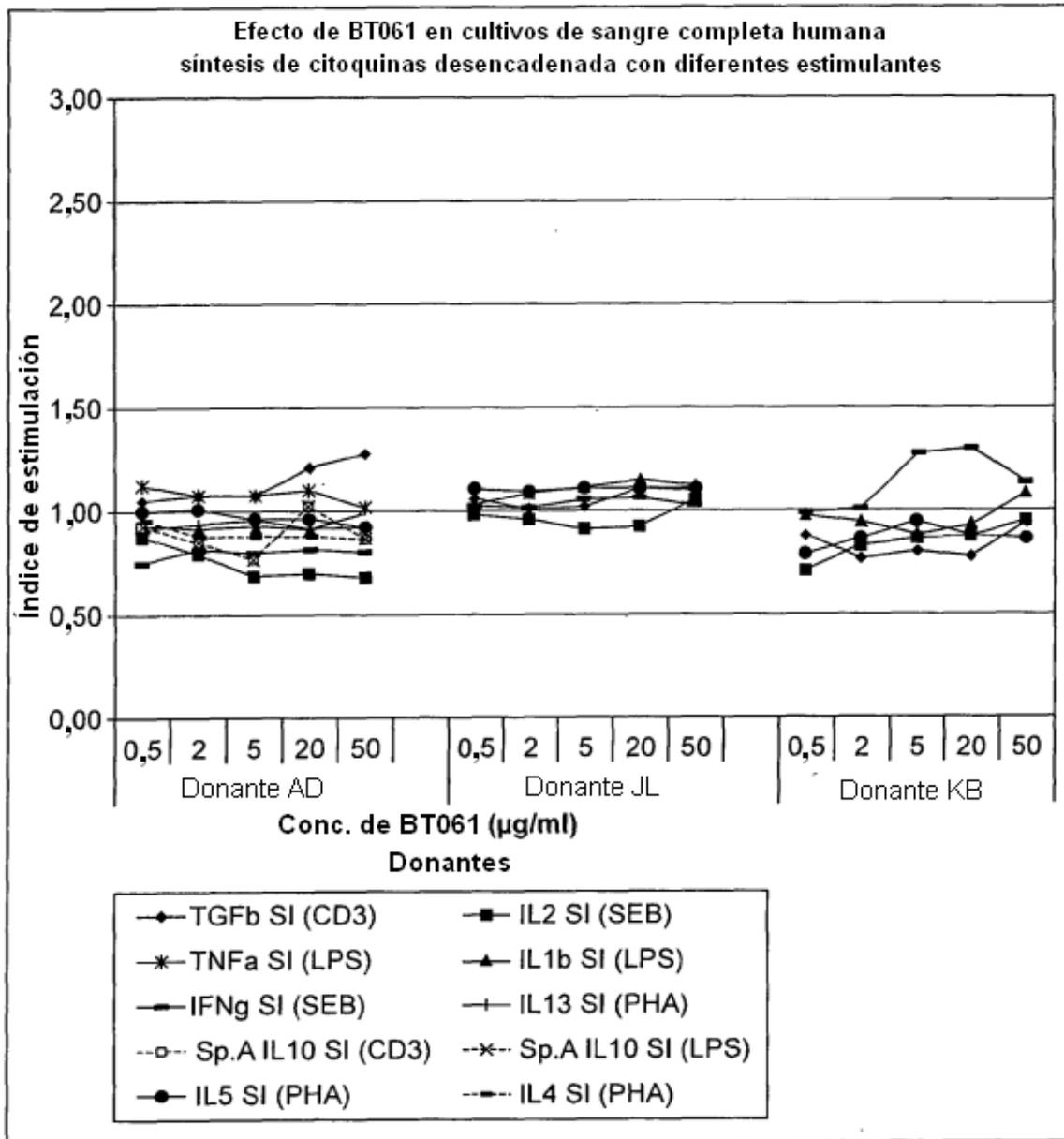


FIG. 1

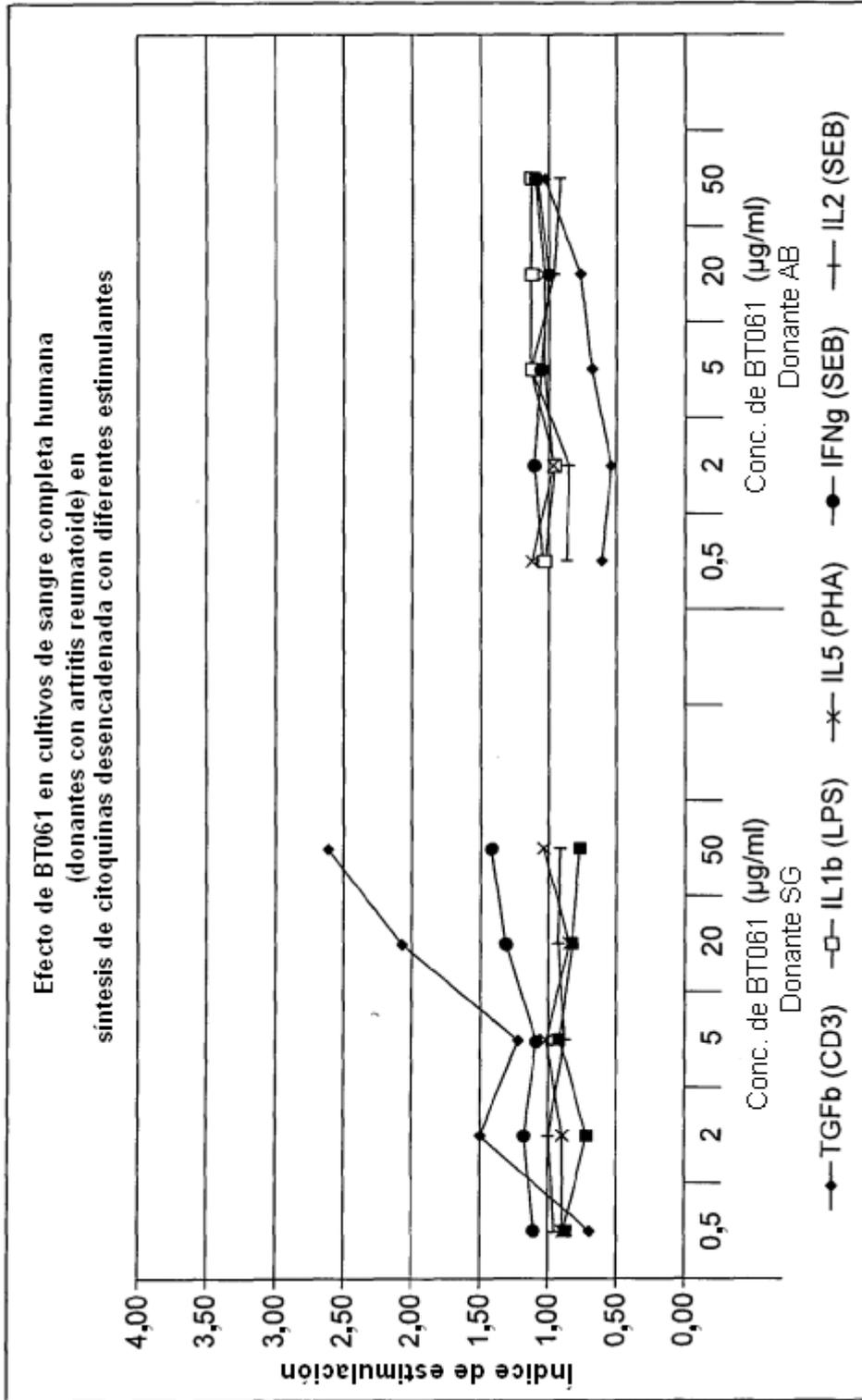


FIG. 2

mB-F5 V_H

CAG GAA TAC CTT GTG GAG ACC GGG GGA GGC TTG GTG AGG CCT GGA AAT TCT CTG AAA
CTC TCC TGT GTC ACC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG CTT CGC
CAG CCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT
TAT GGA GCA AAT TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT
TCA AAA AGC AGT GTC TAT CTG CAG ATG AGC AGA TTG AGA GAG GAA GAC ACT GCC ACT
TAT TAT TGT AGT GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG
GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA

FIGURA 3

mB-F5 V_K

GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT TCT TCC TTA GTT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC
ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT
TGG TAC CAA CAG ATC CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC ATC
CTA GAA TCT GGG GTC CCT GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC AGT
AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGG GCT GAT
GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CA

FIGURA 4

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 GGG 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 GGG 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

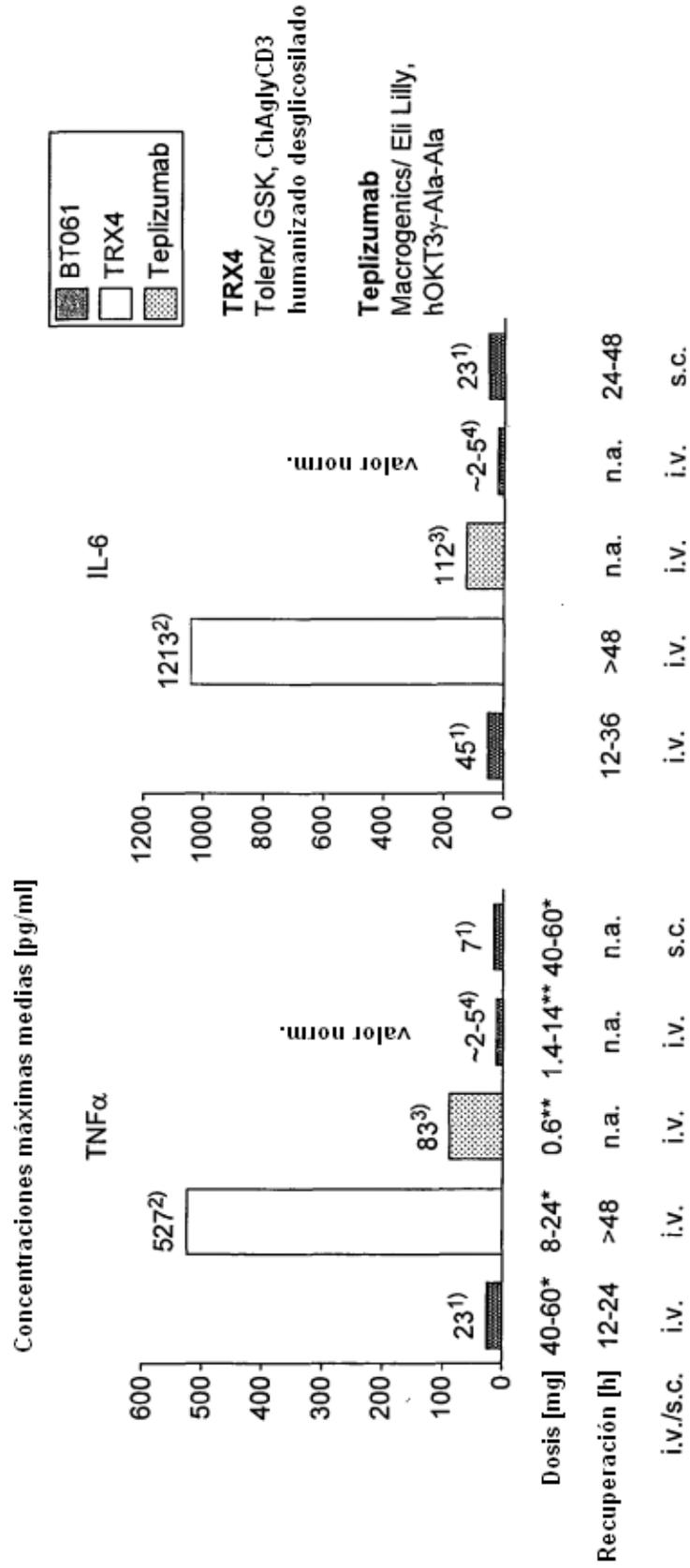


FIG. 7A

FIG. 7B

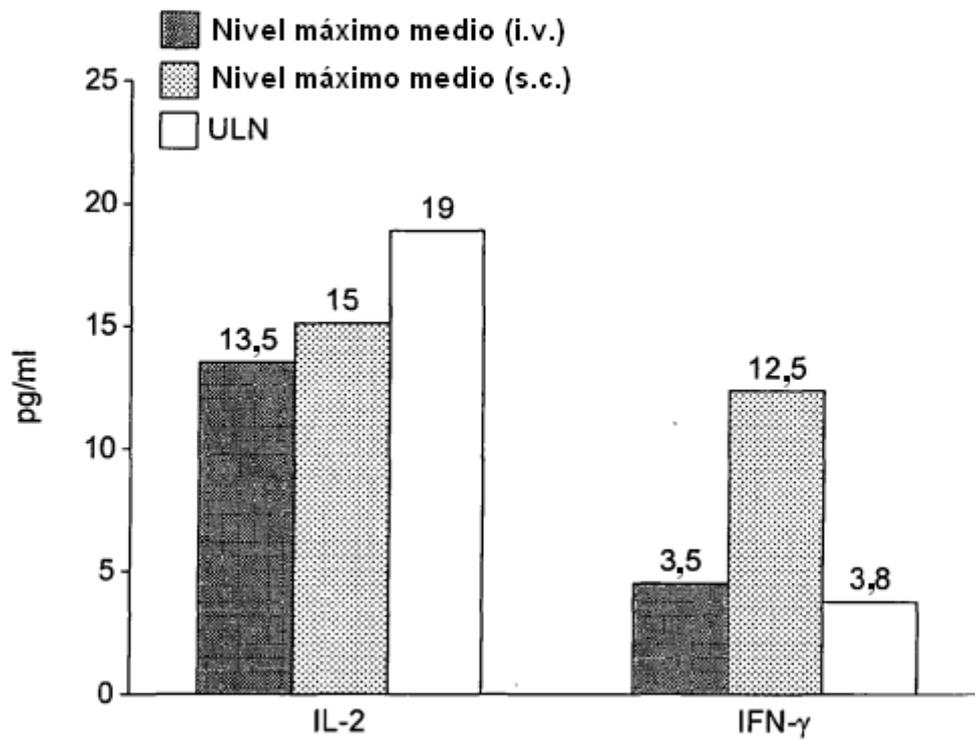


FIGURA 8

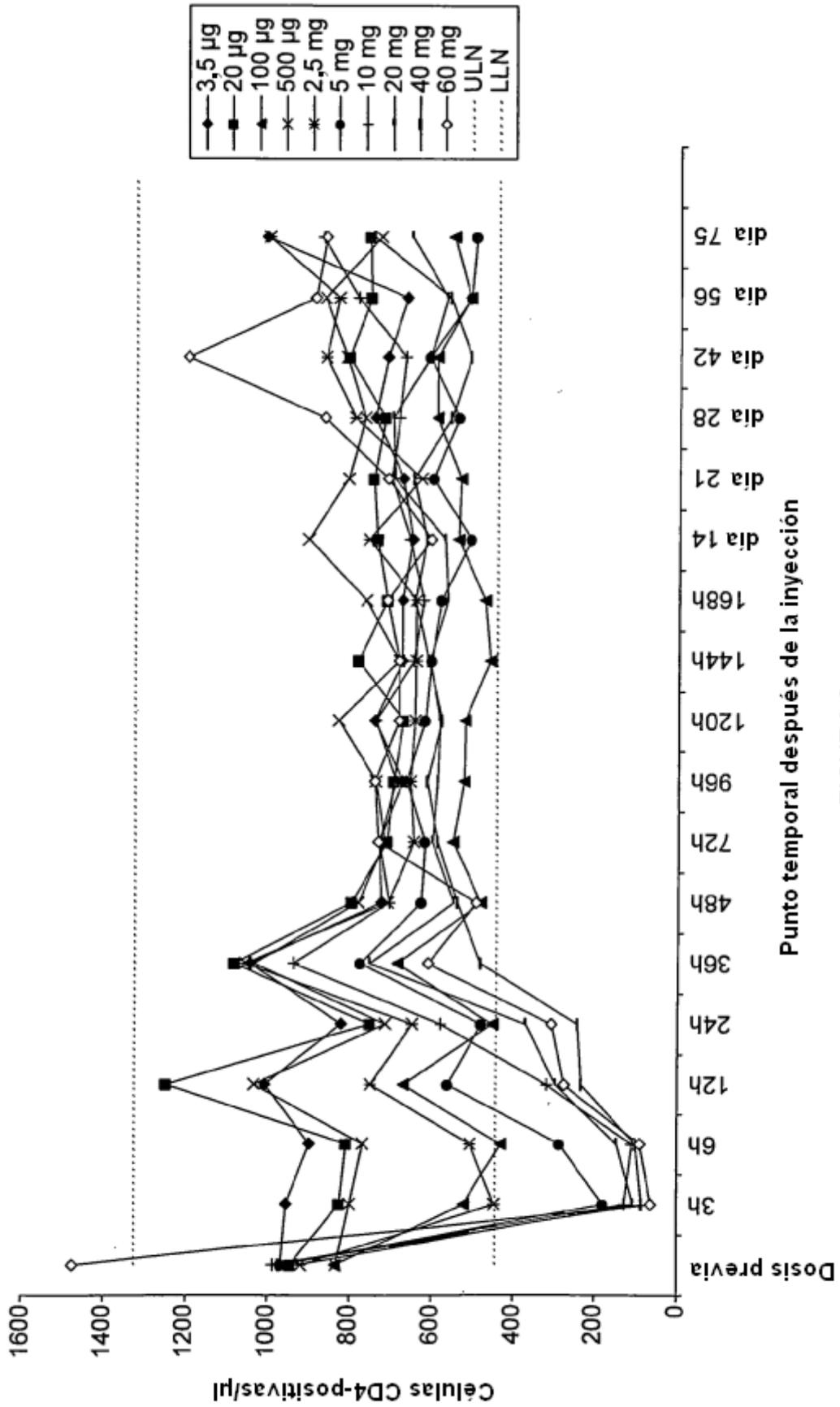


FIGURA 9

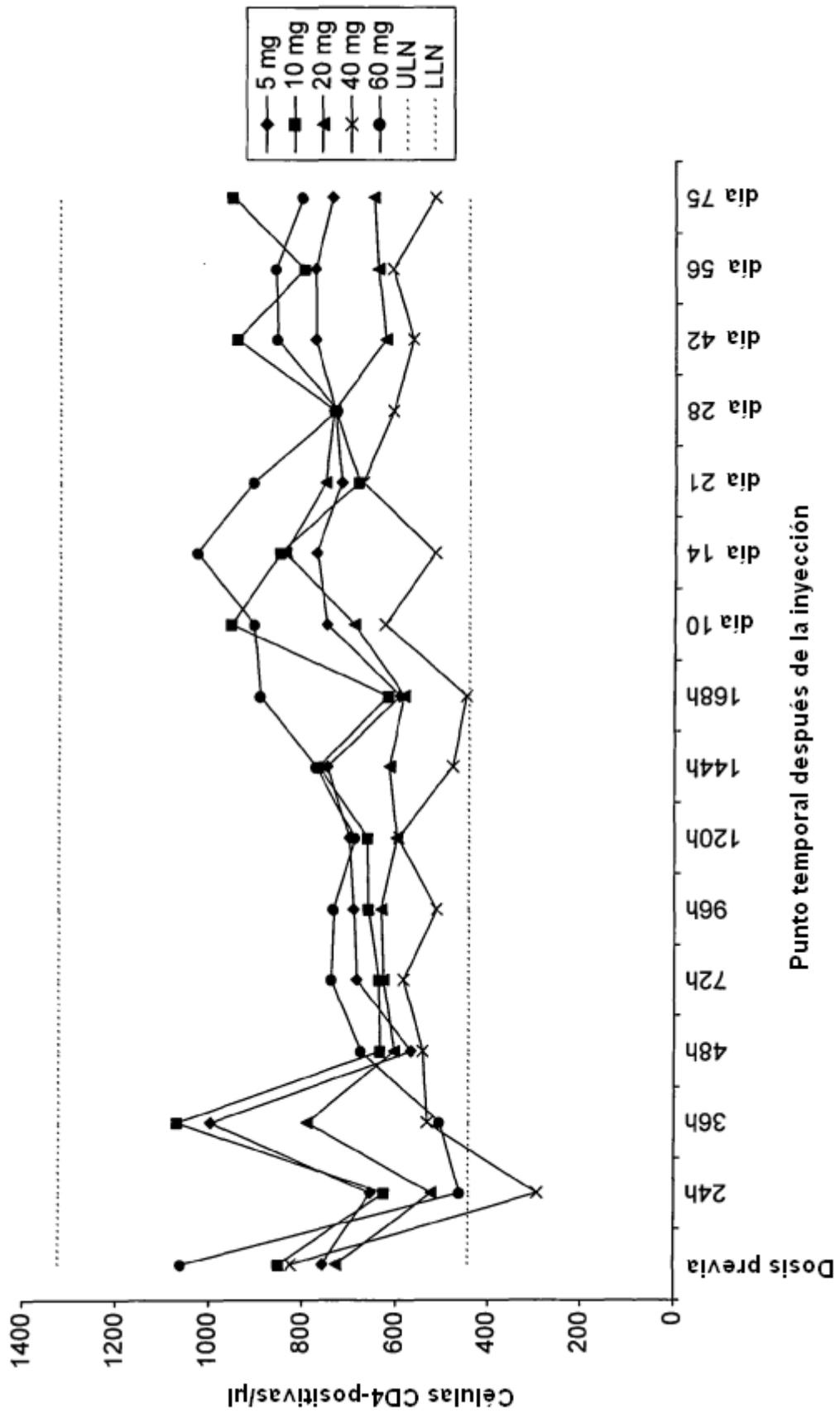


FIGURA 10

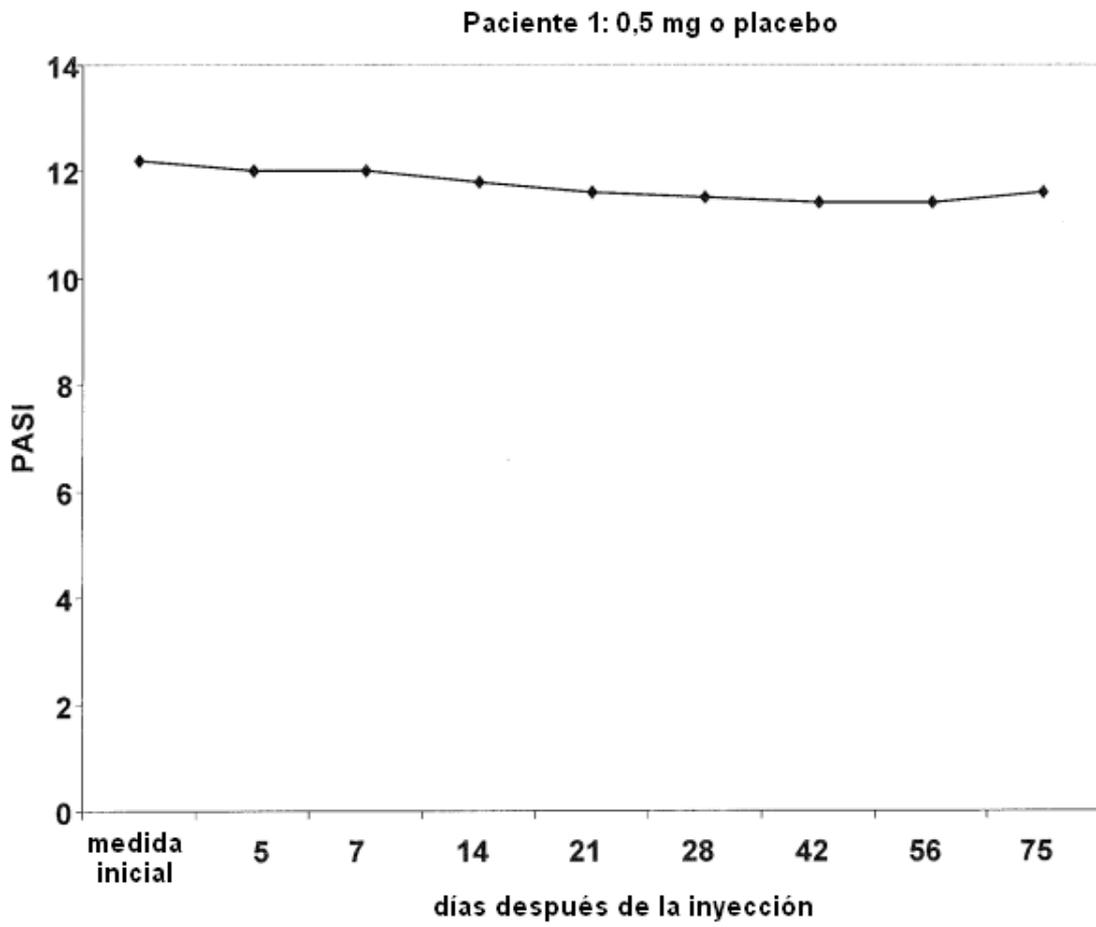


FIGURA 11A

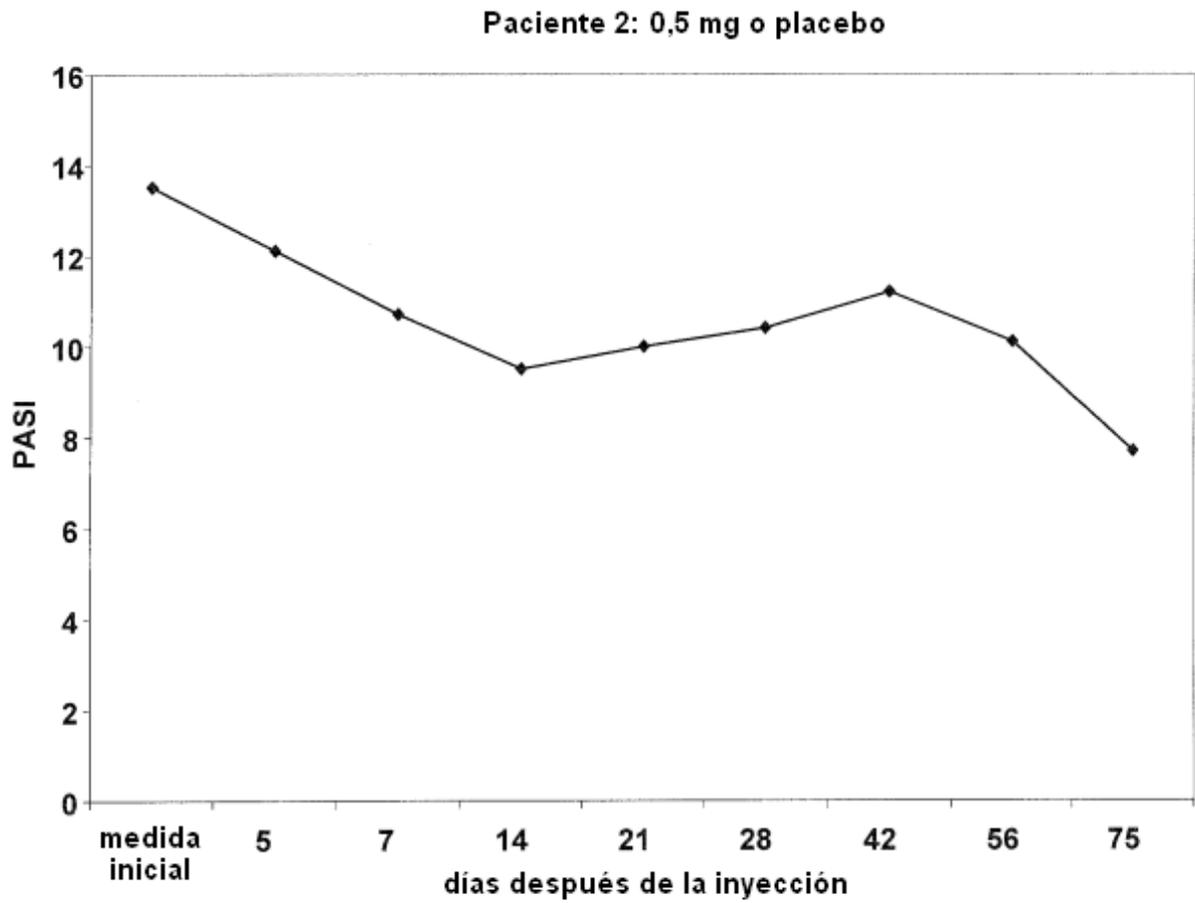


FIGURA 11B

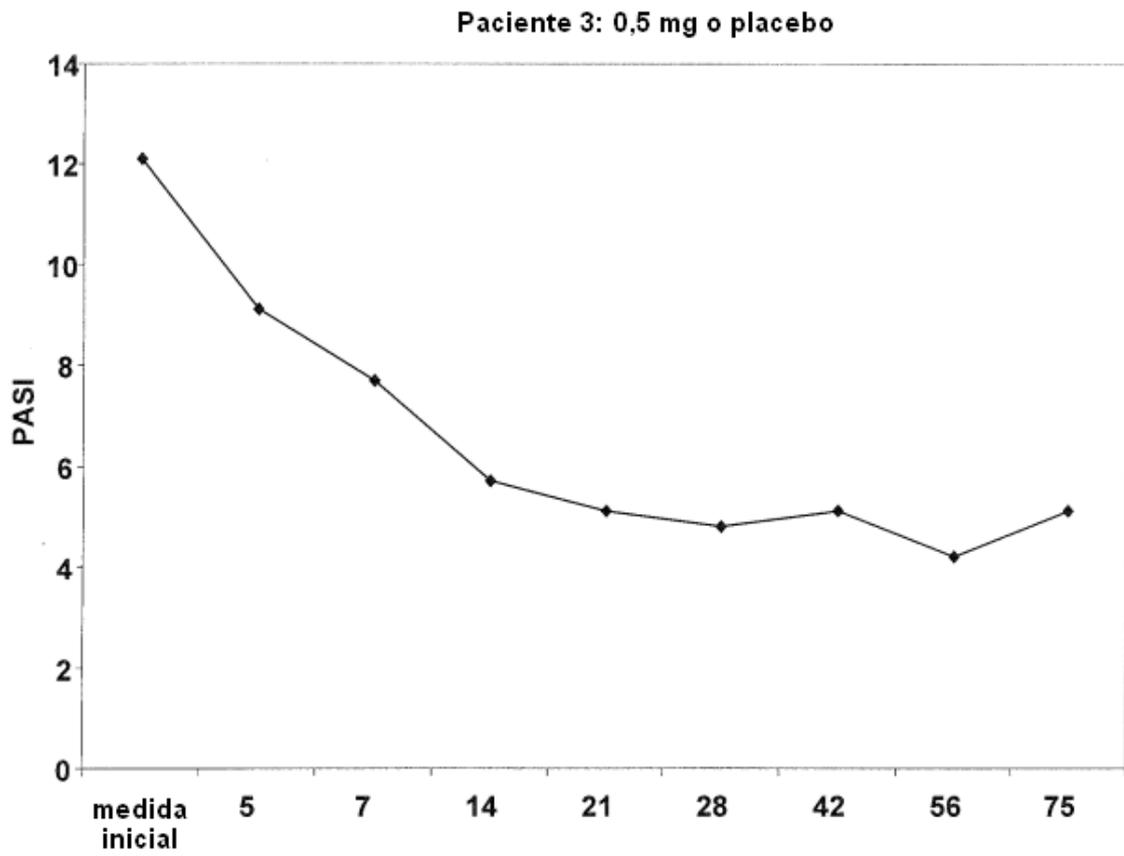


FIGURA 11C

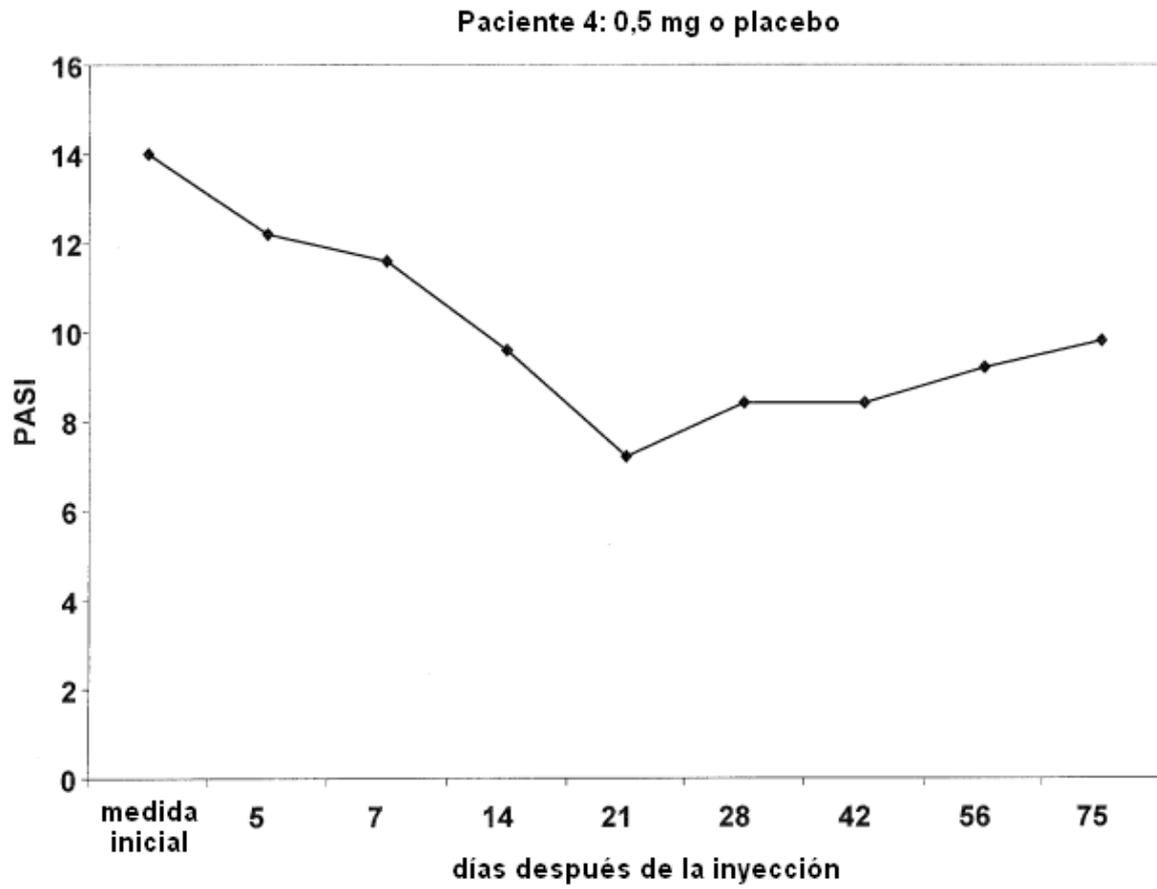


FIGURA 11D

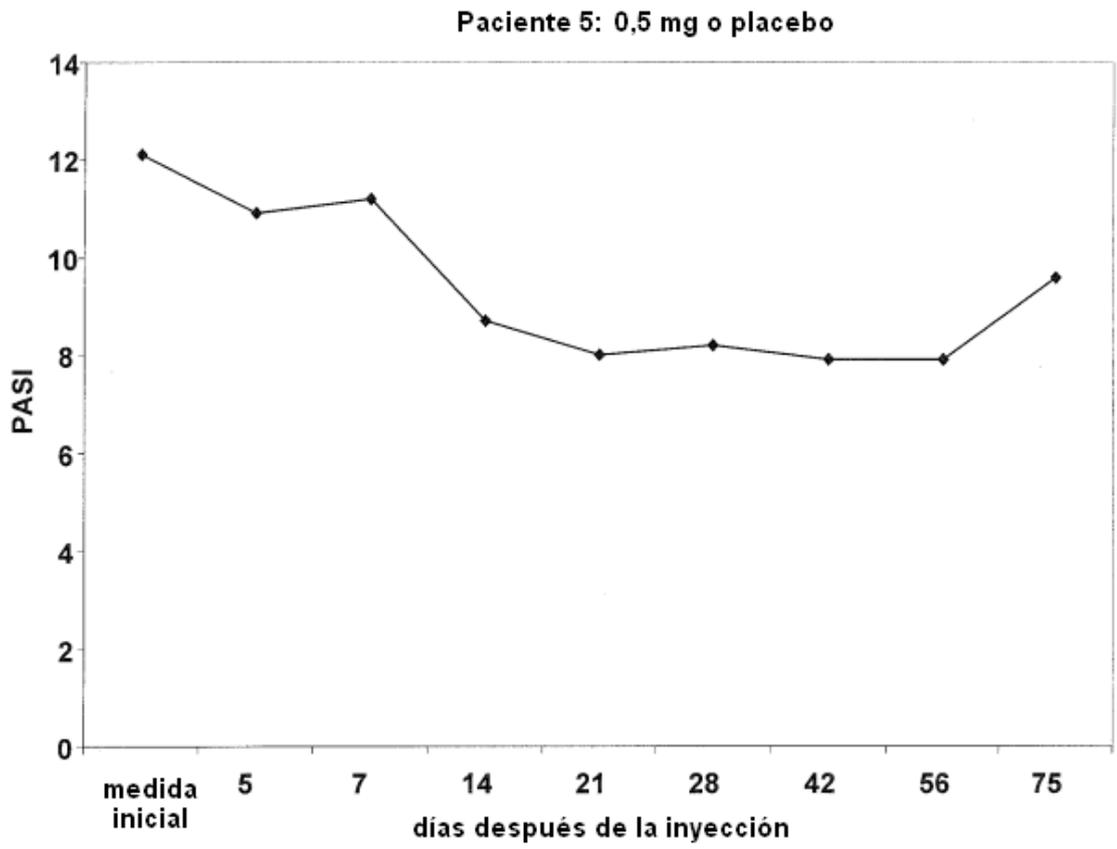


FIGURA 11E

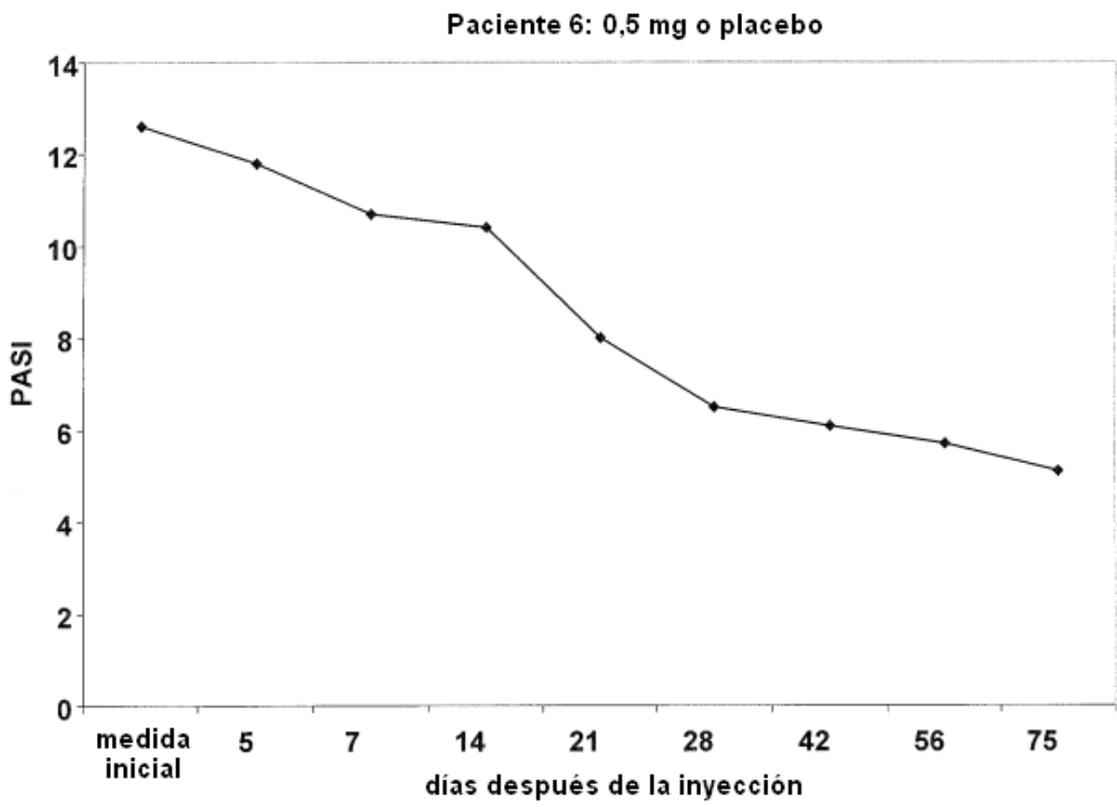


FIGURA 11F

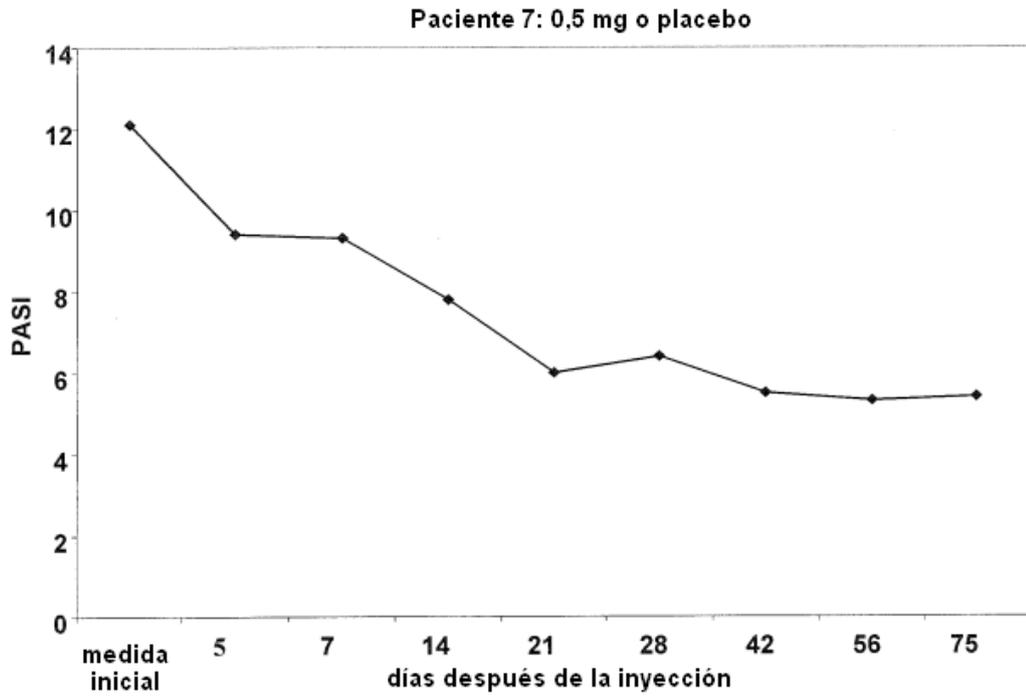


FIGURA 11G

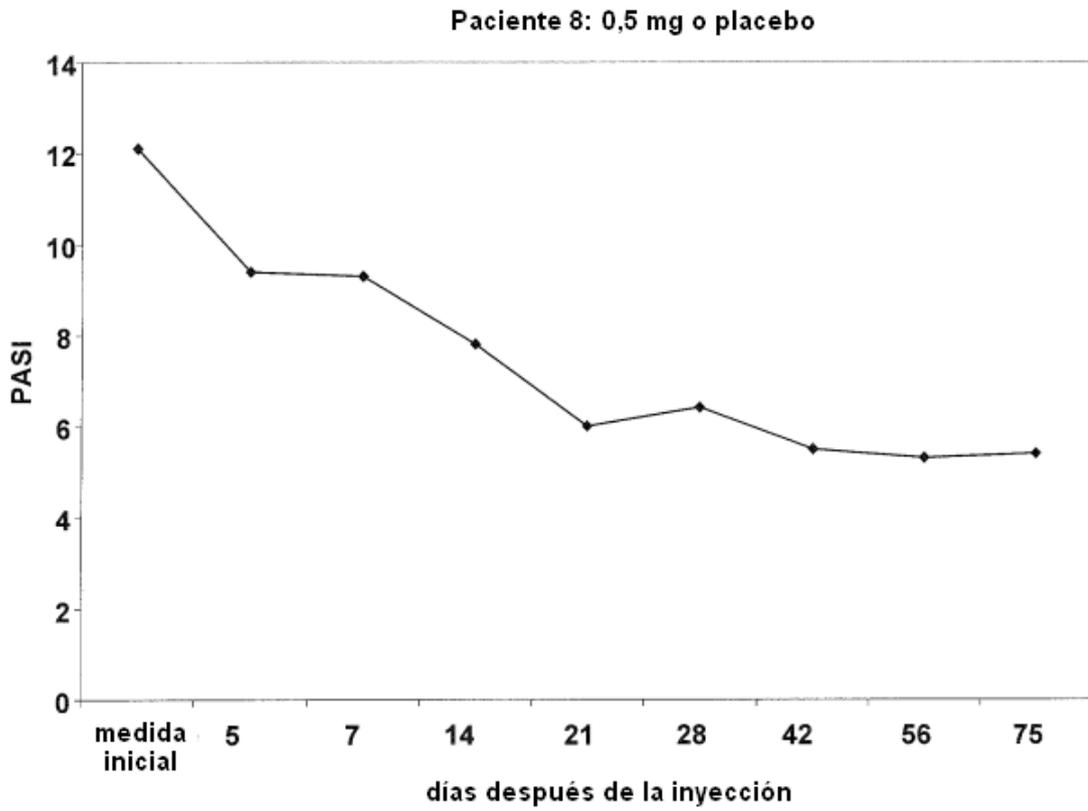


FIGURA 11H

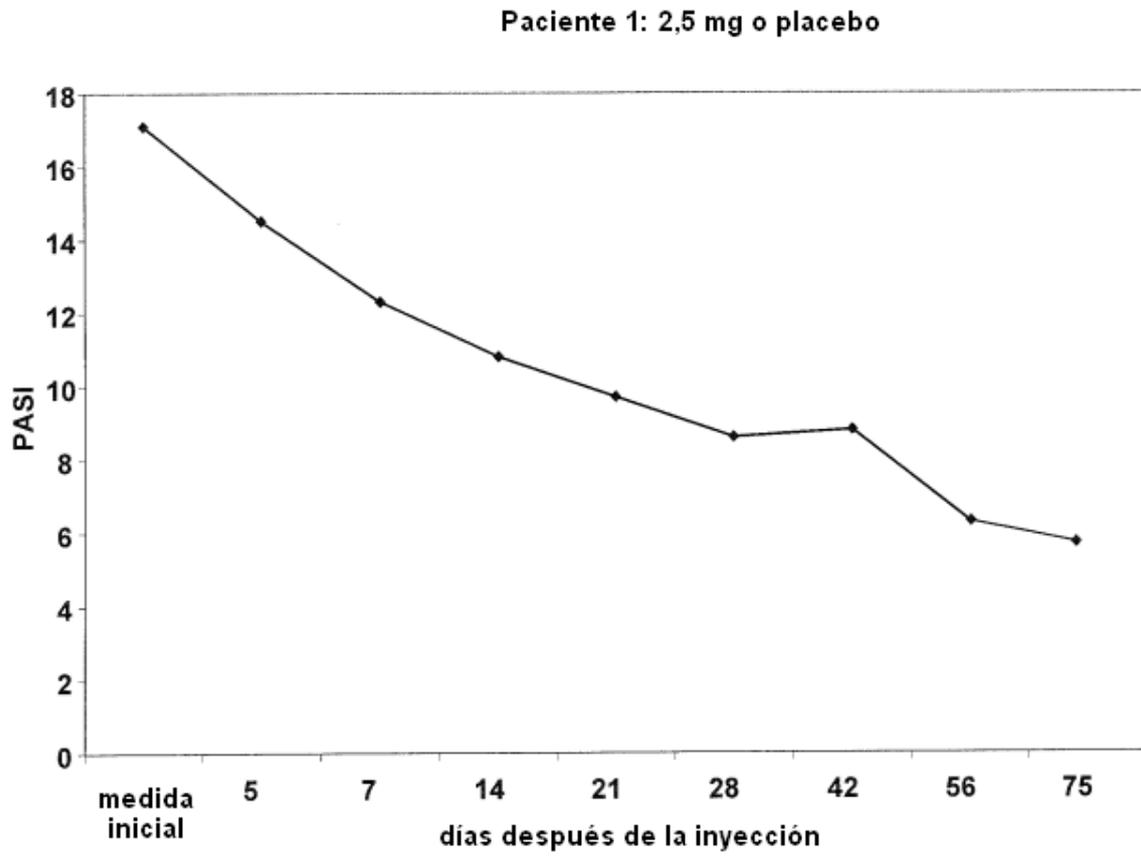


FIGURA 12A

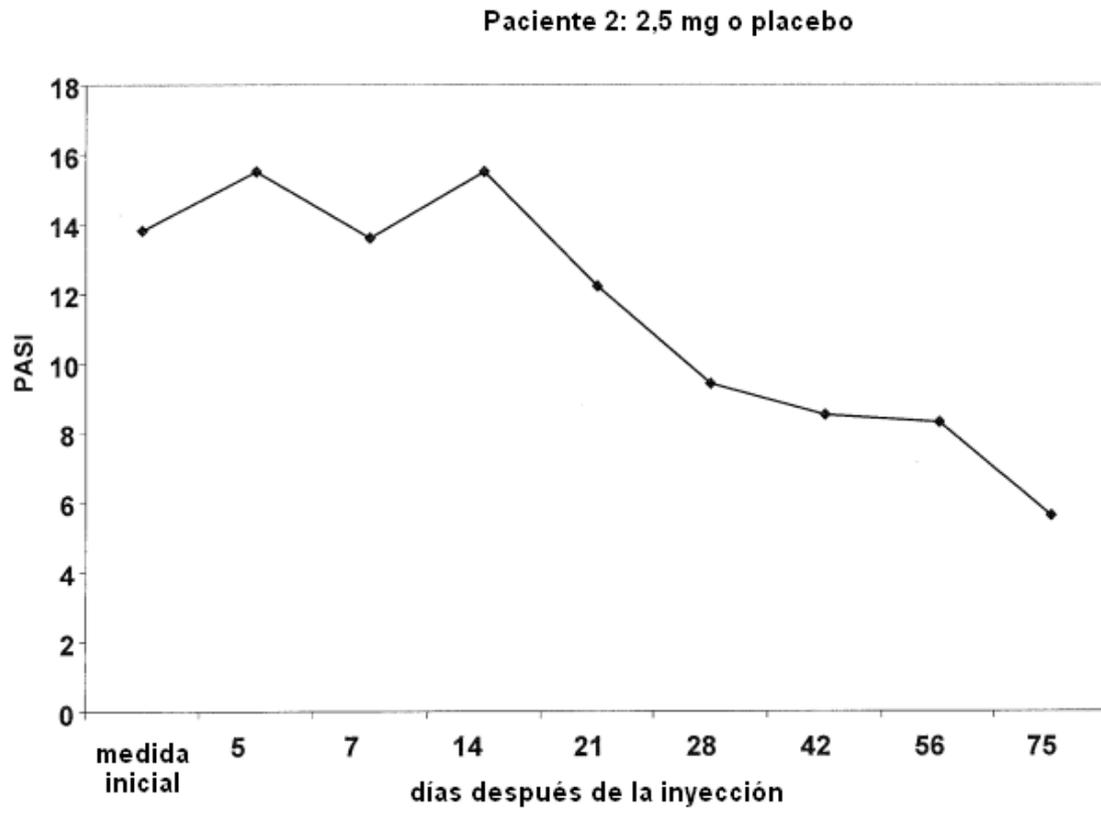


FIGURA 12B

Paciente 3: 2,5 mg o placebo

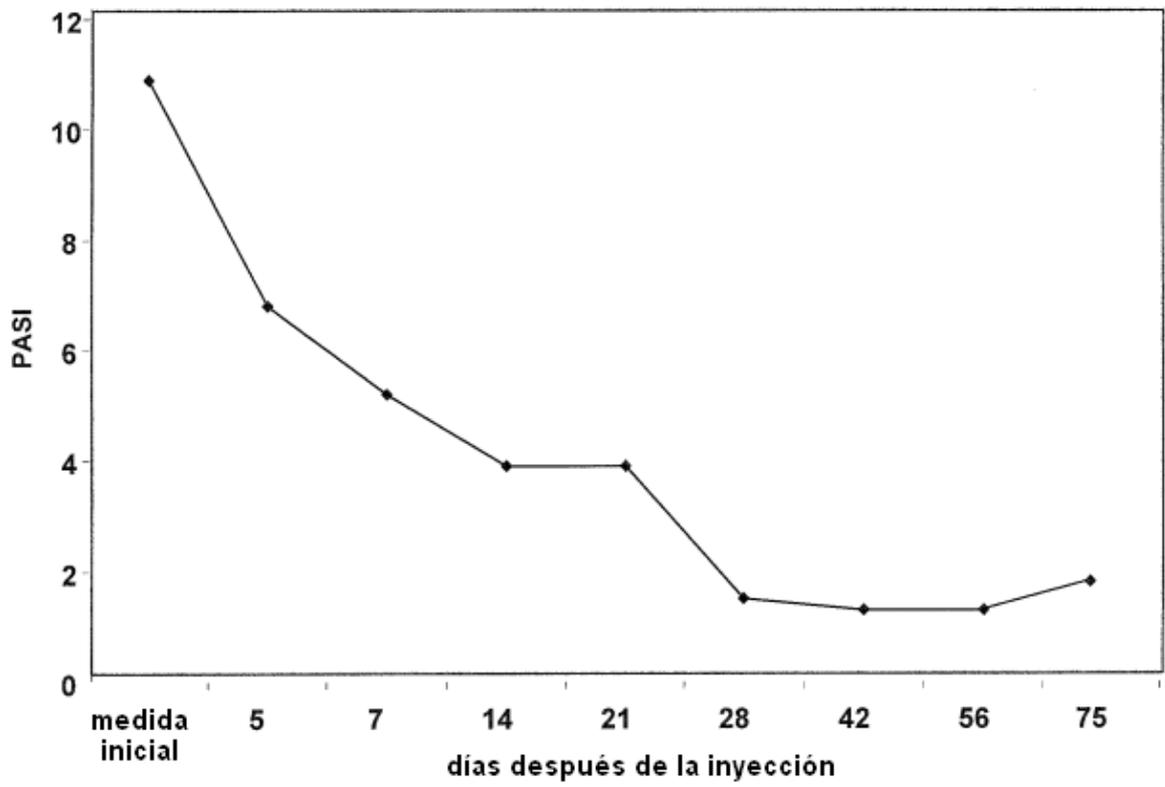


FIGURA 12C

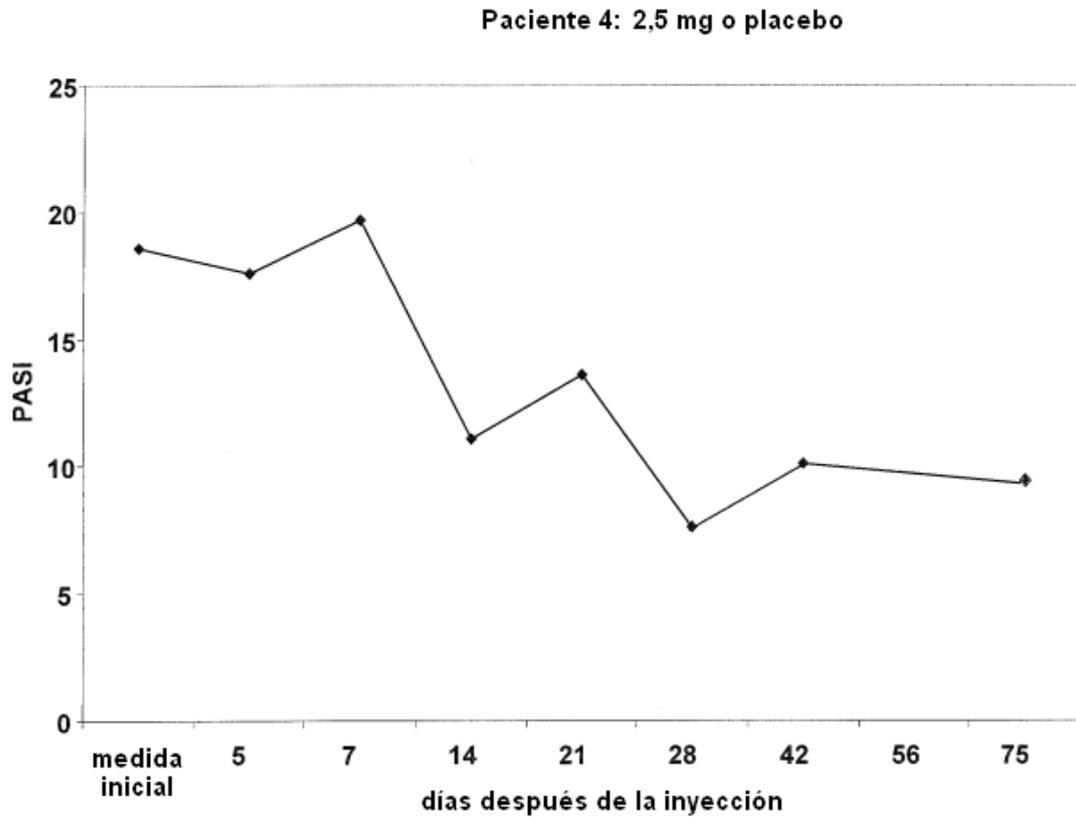


FIGURA 12D

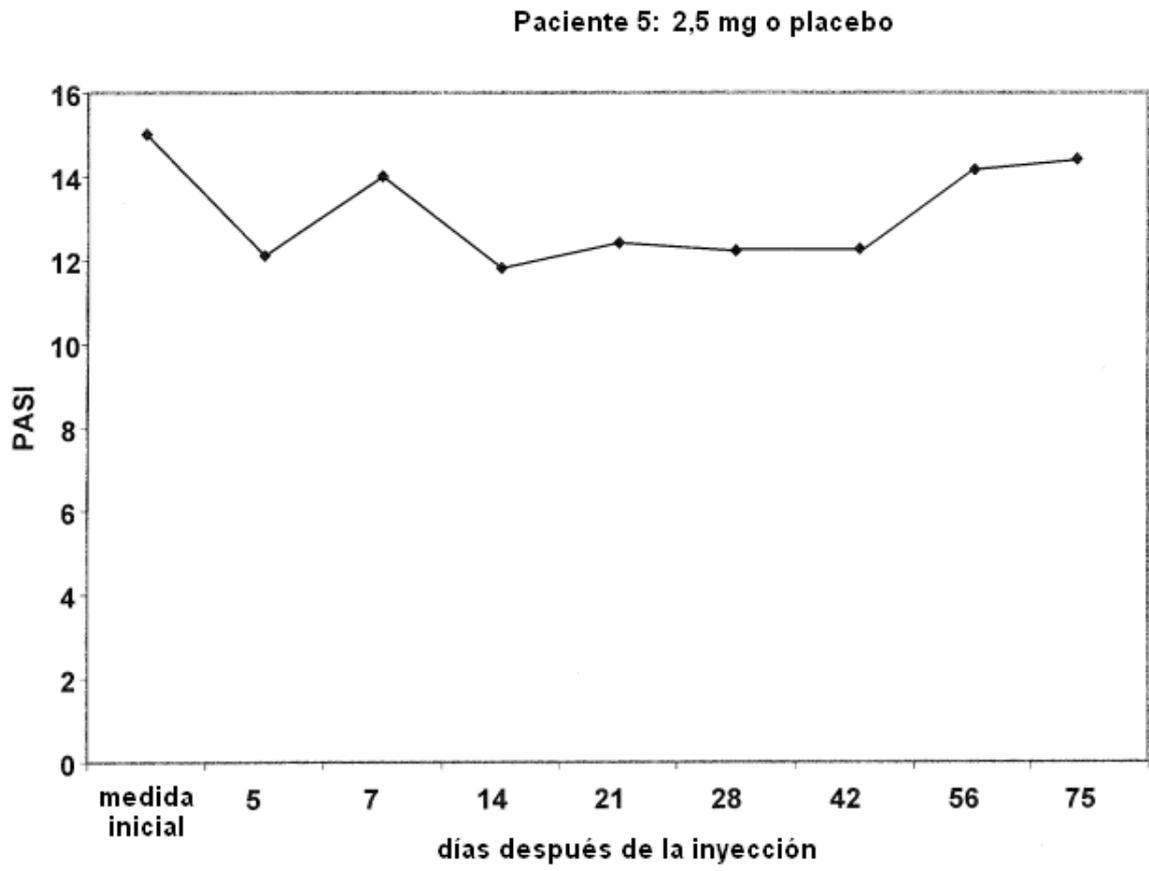


FIGURA 12E

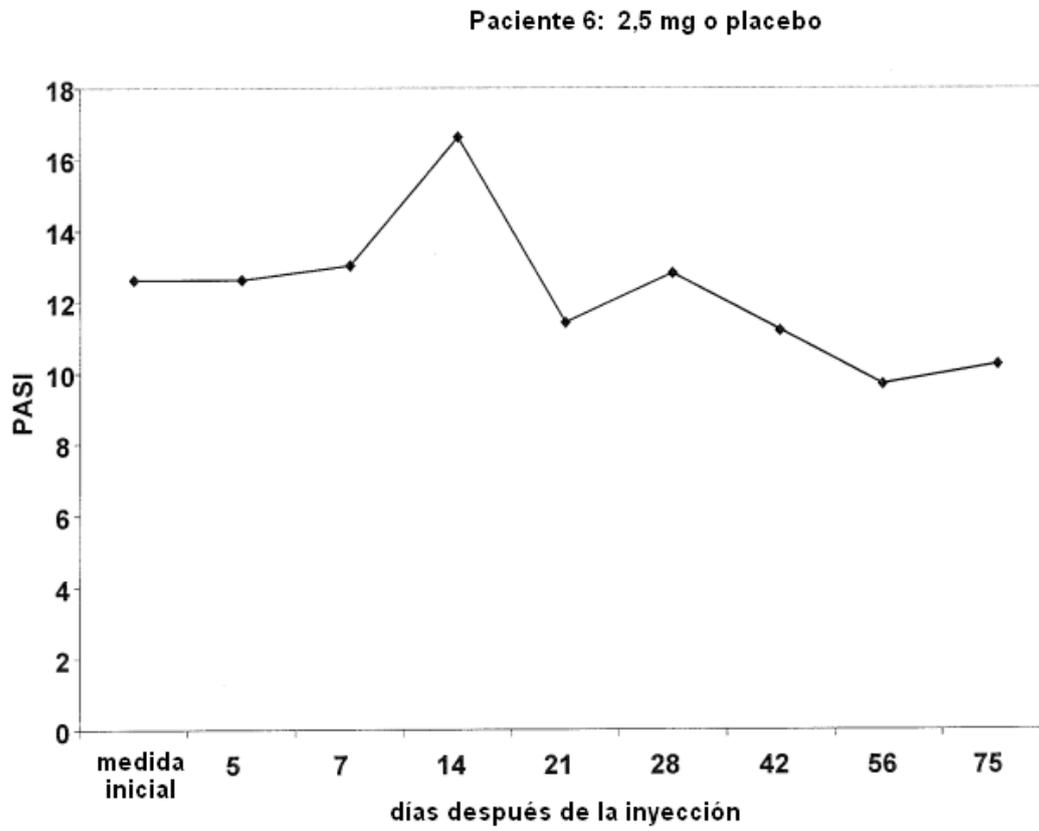


FIGURA 12F

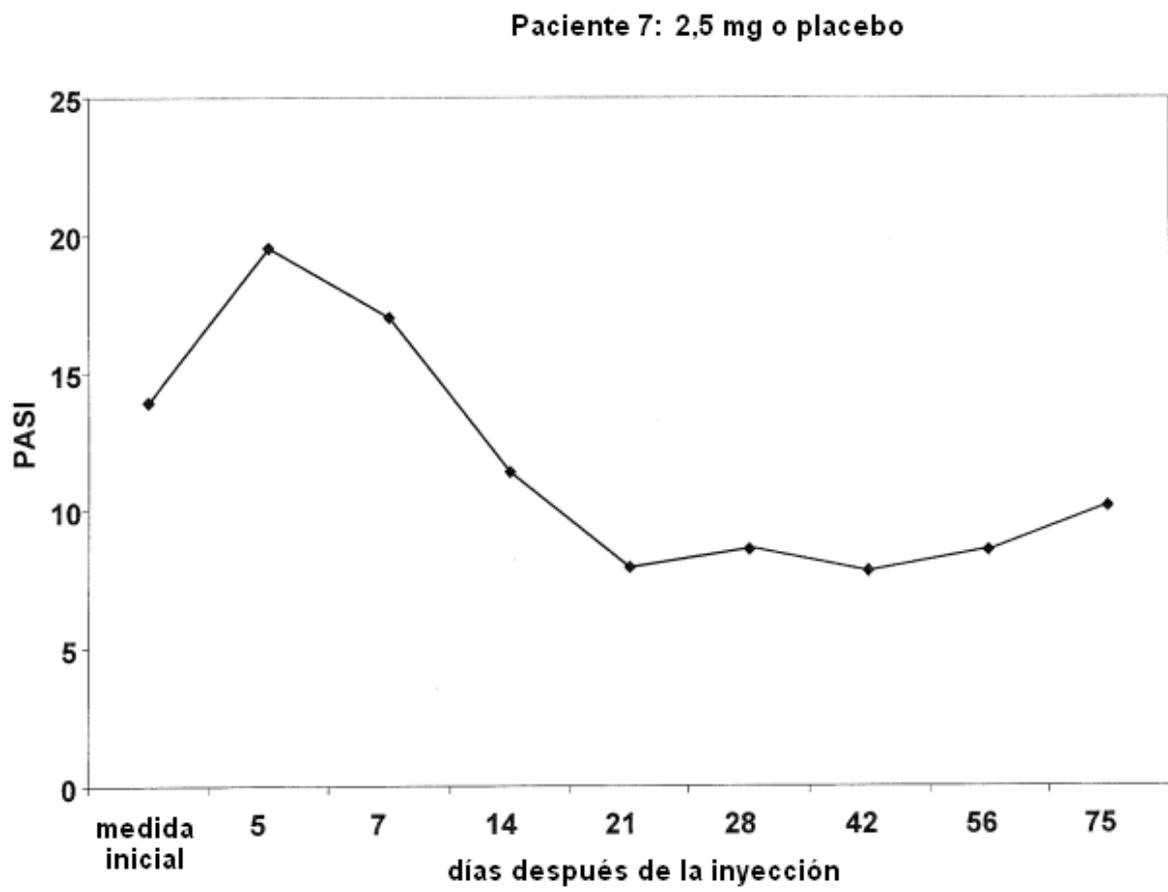


FIGURA 12G

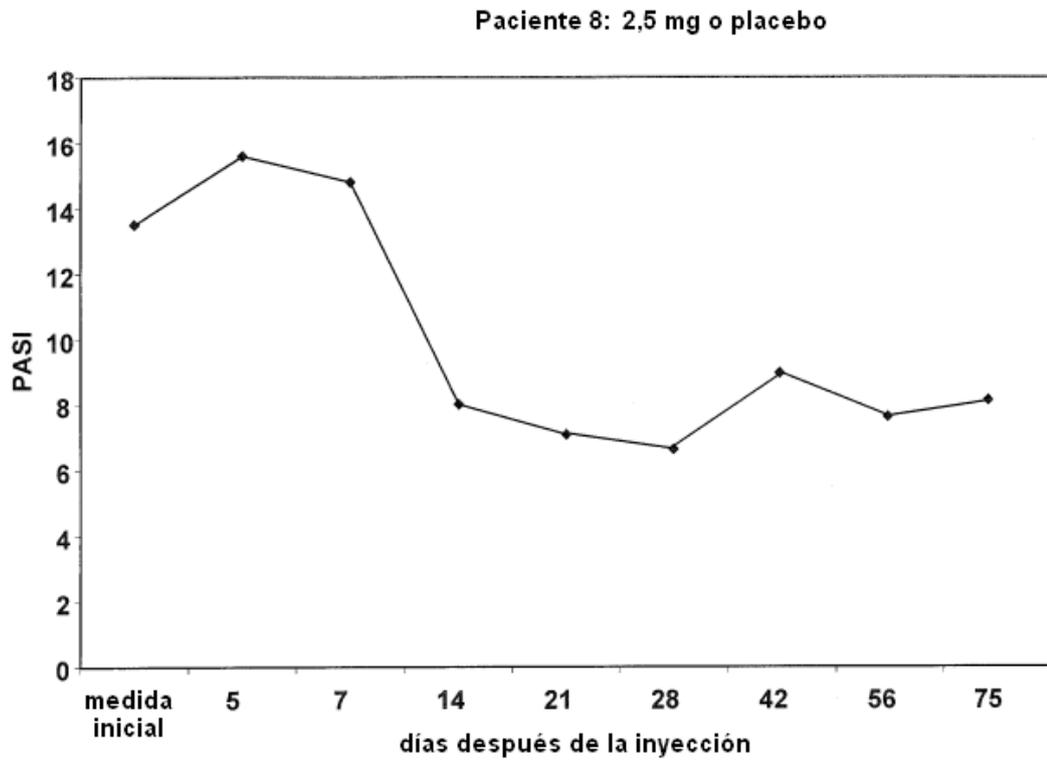
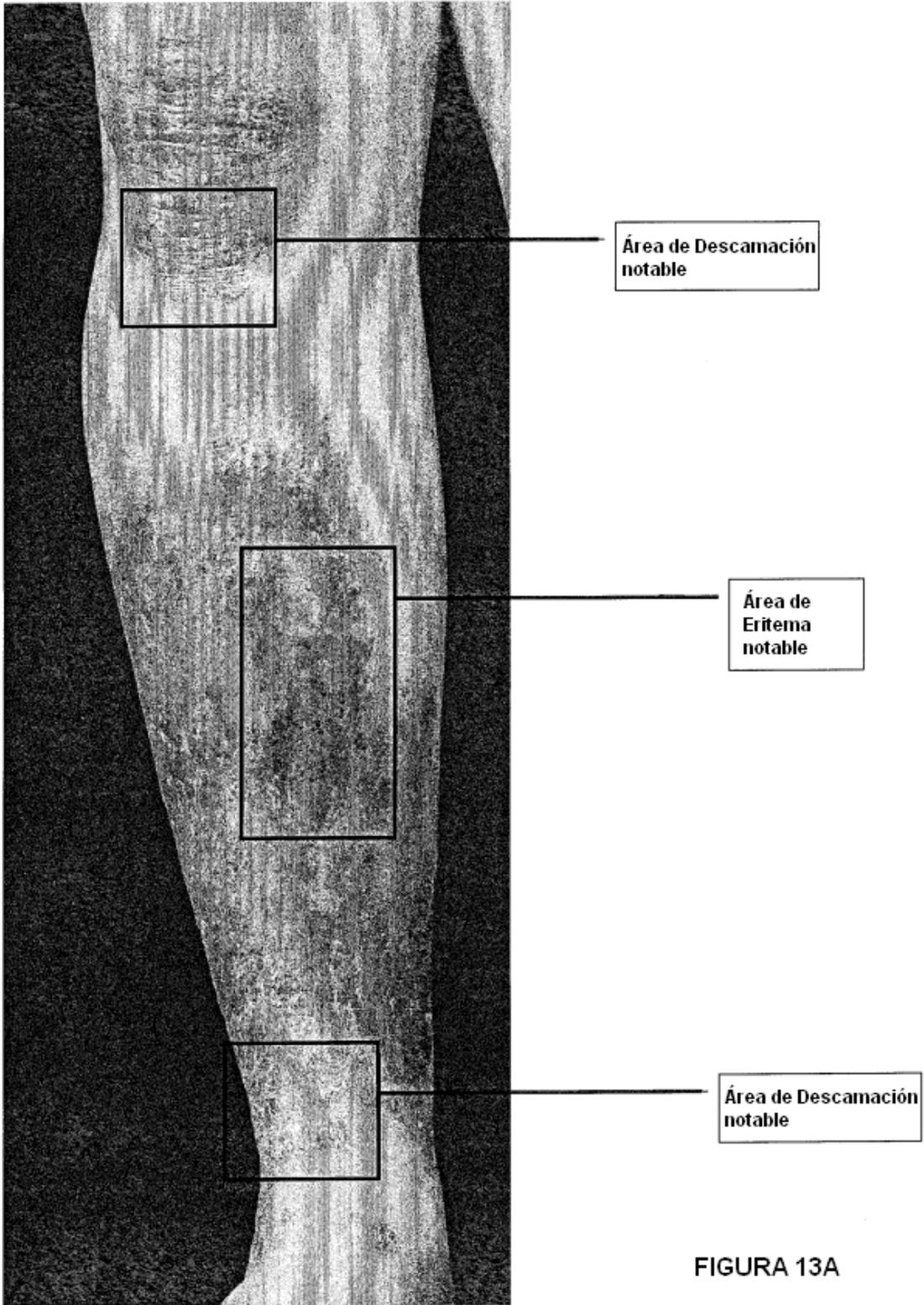


FIGURA 12H



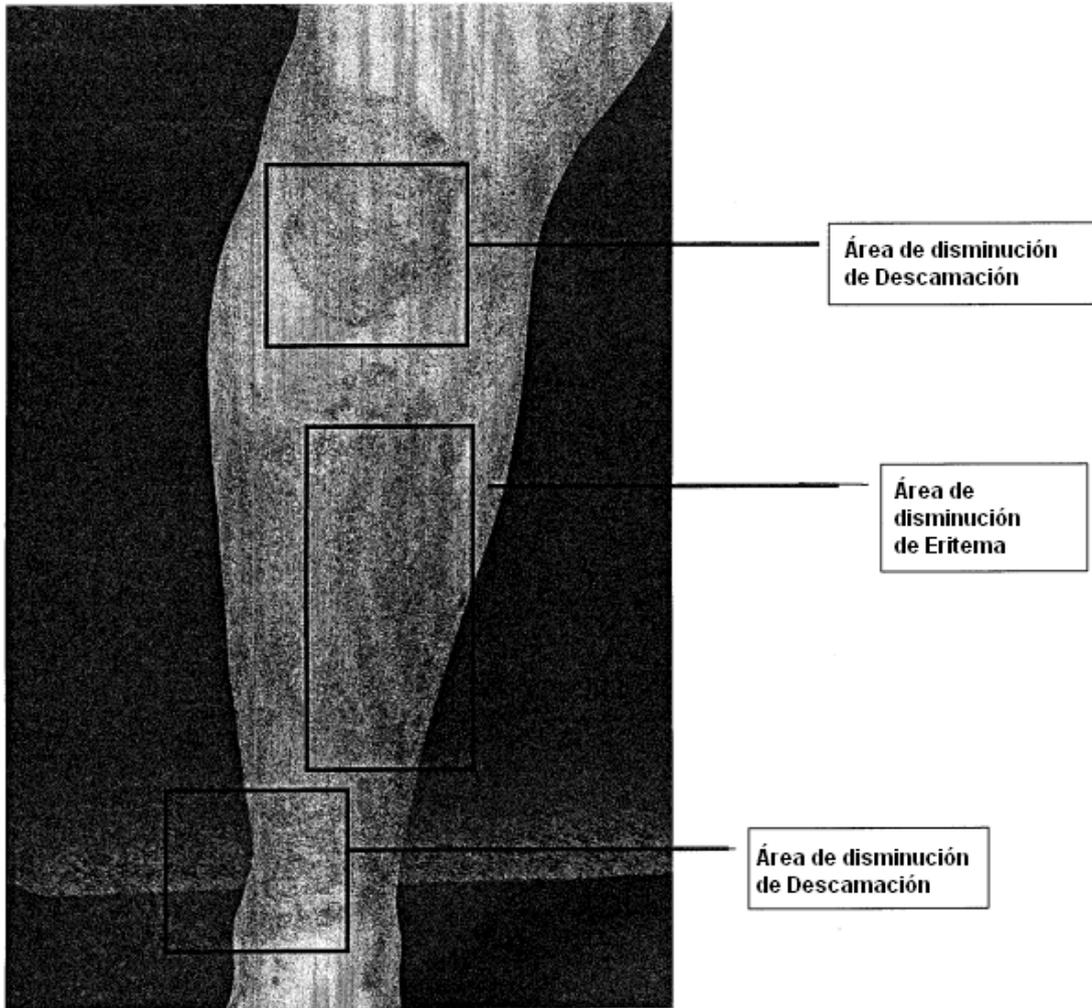


FIGURA 13B

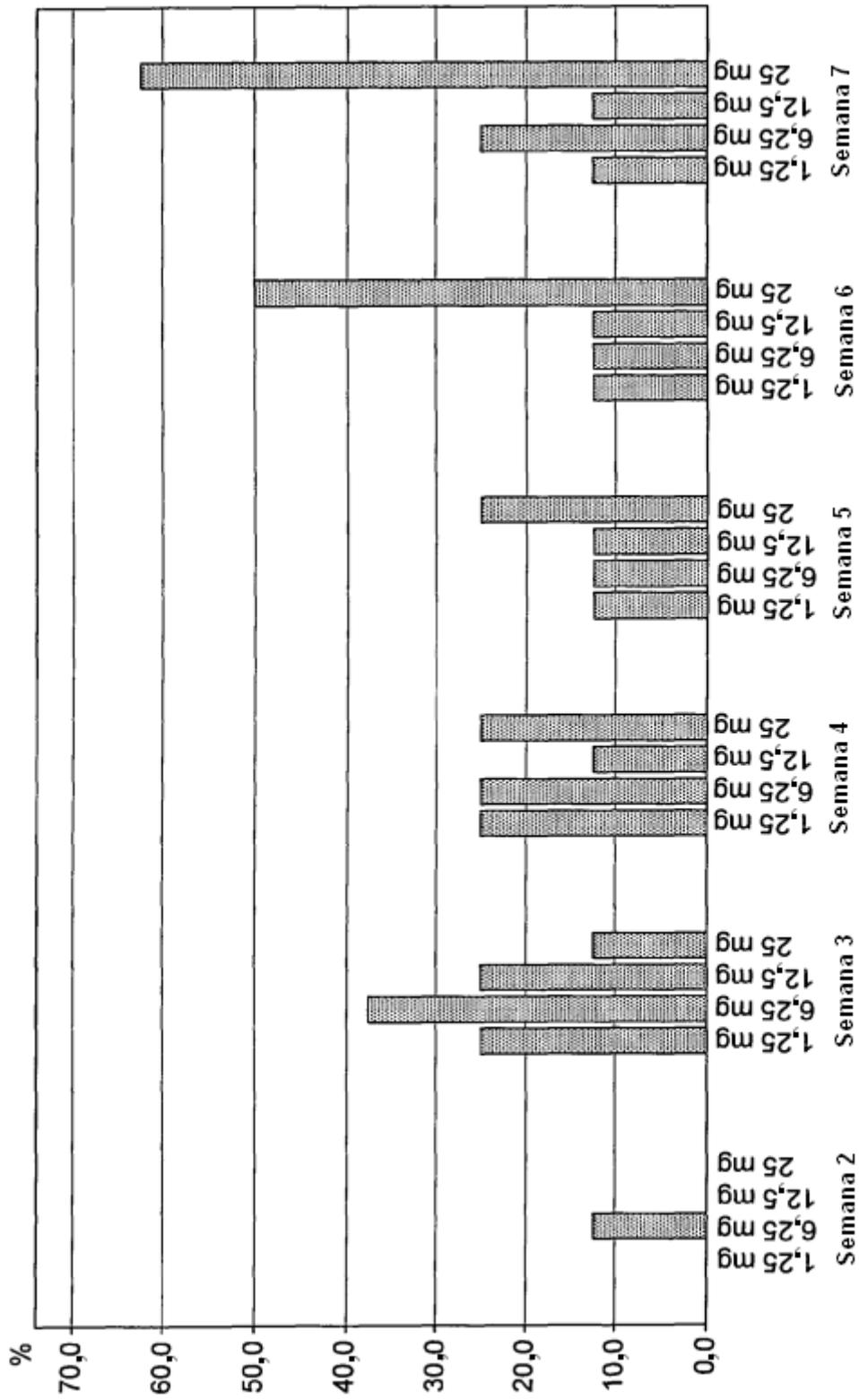


FIGURA 14

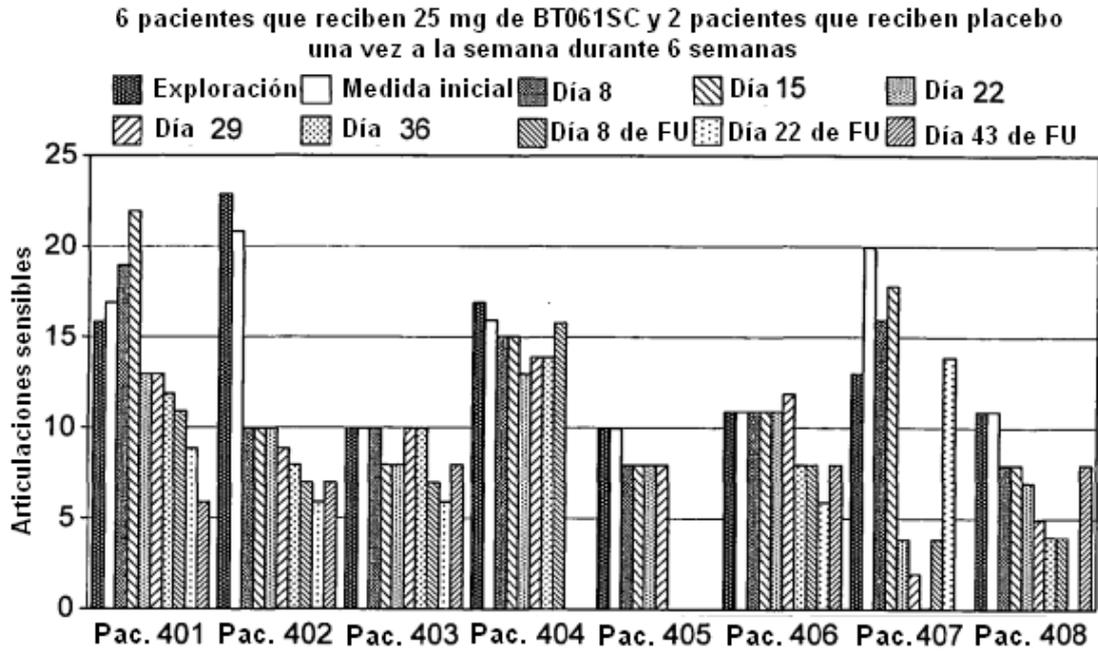


FIGURA 15A

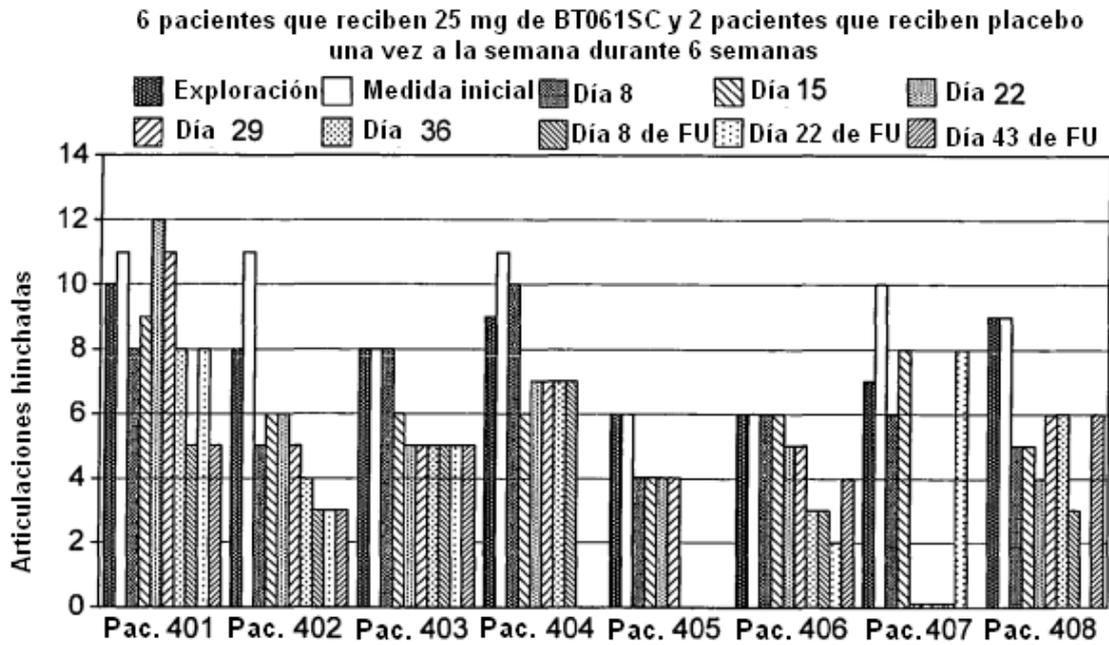


FIGURA 15B

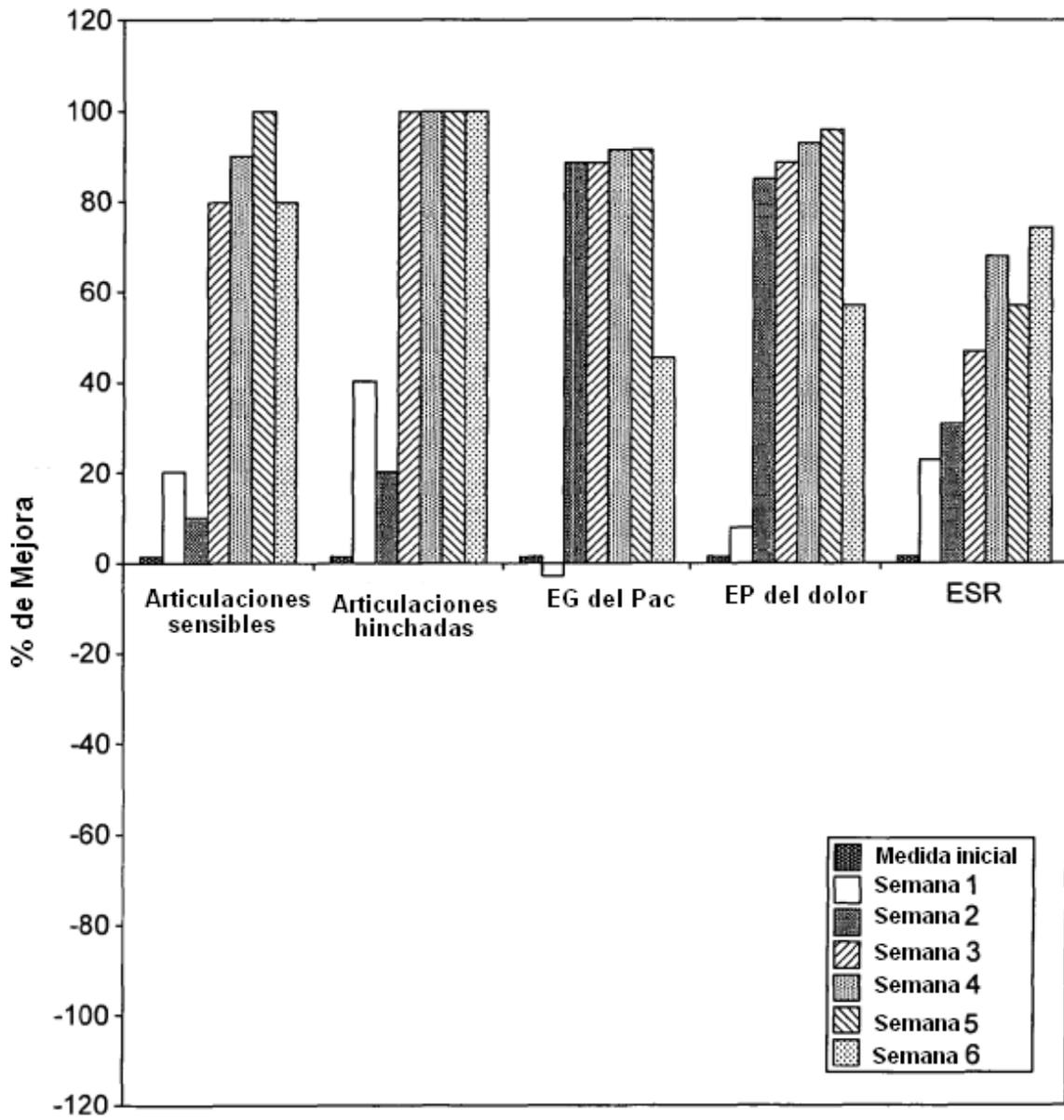


FIGURA 16A

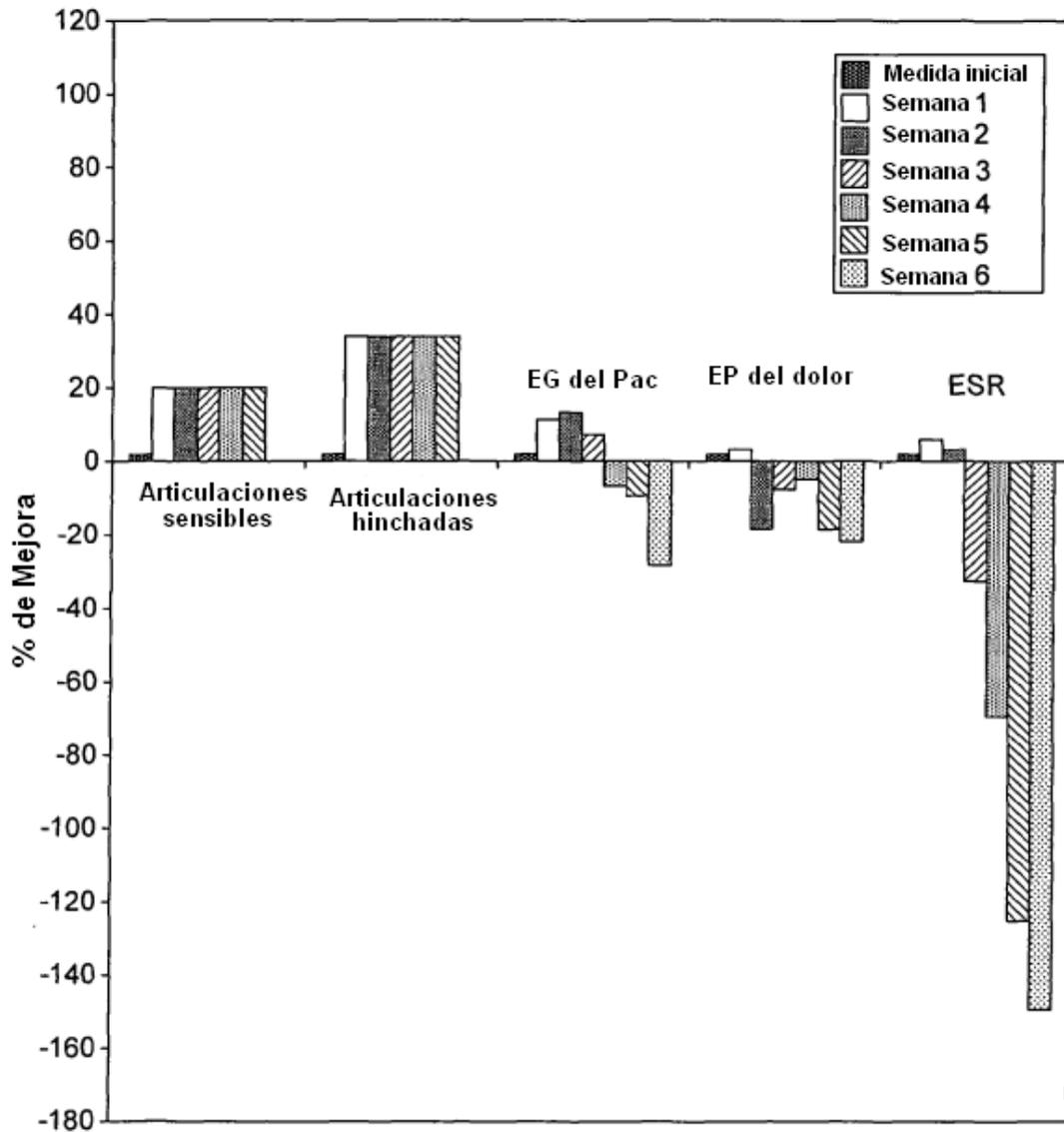


FIGURA 16B

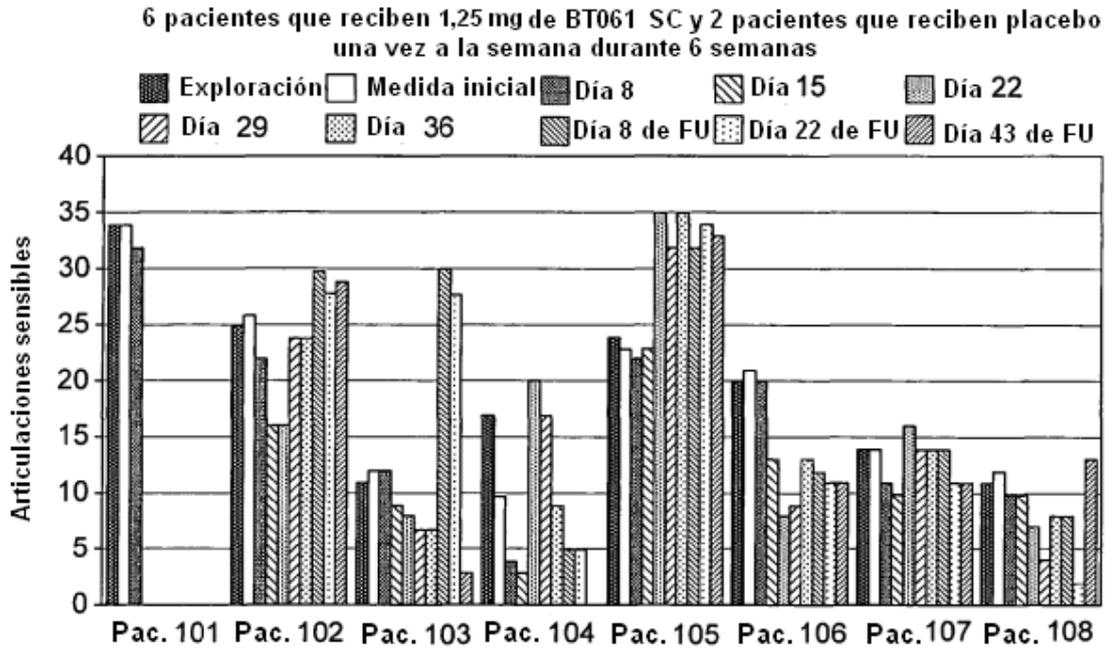


FIGURA 17A

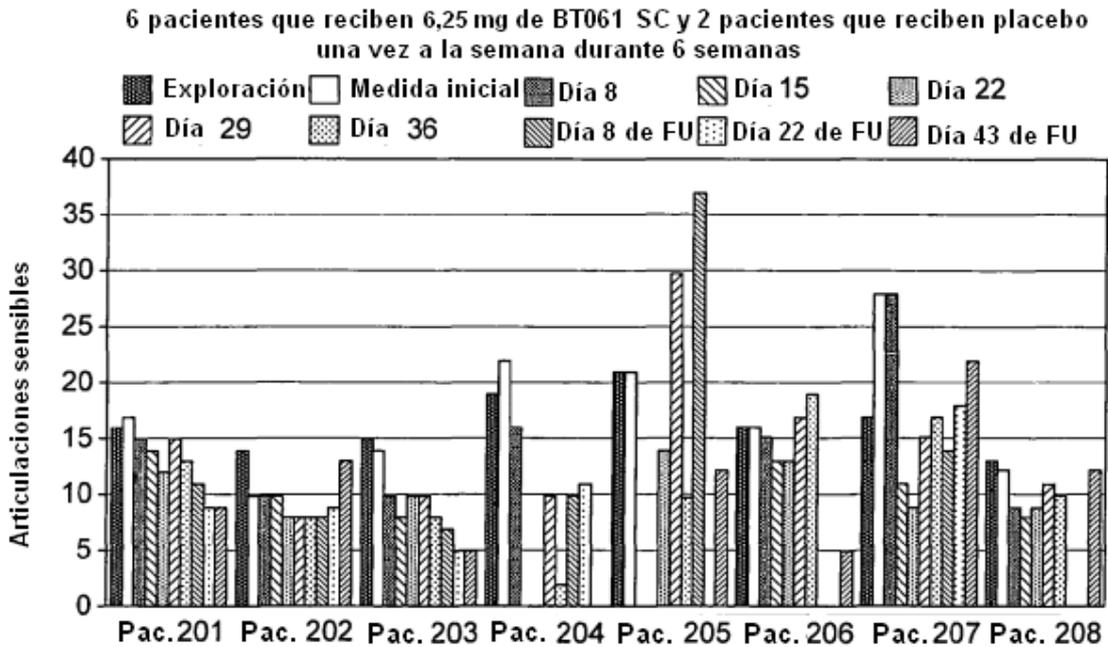


FIGURA 17B

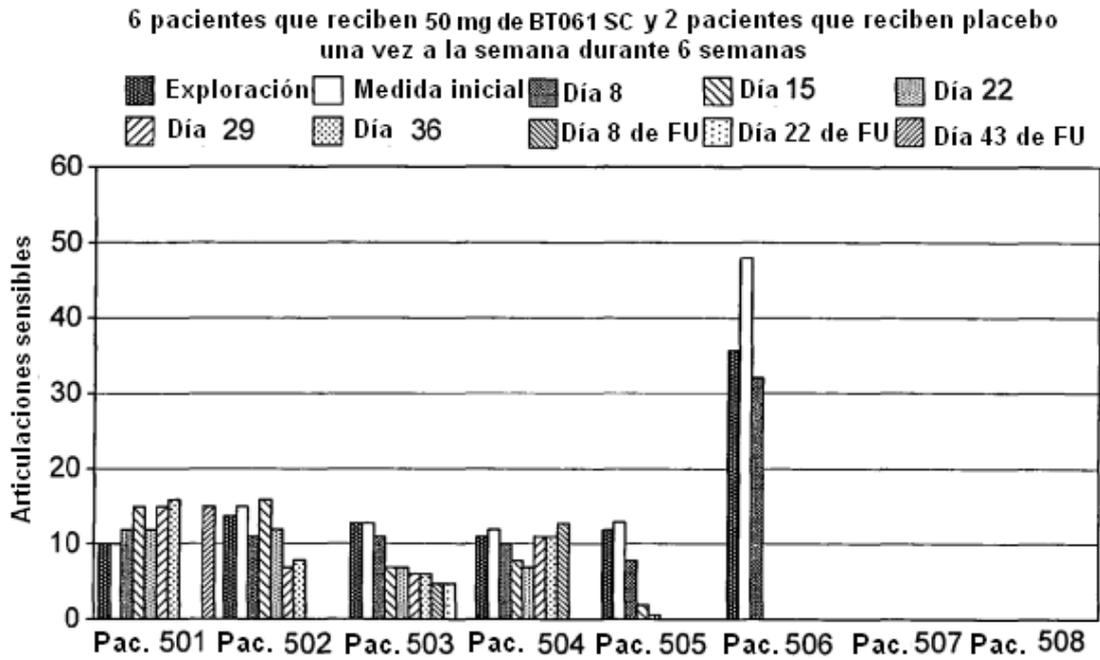


FIGURA 18A

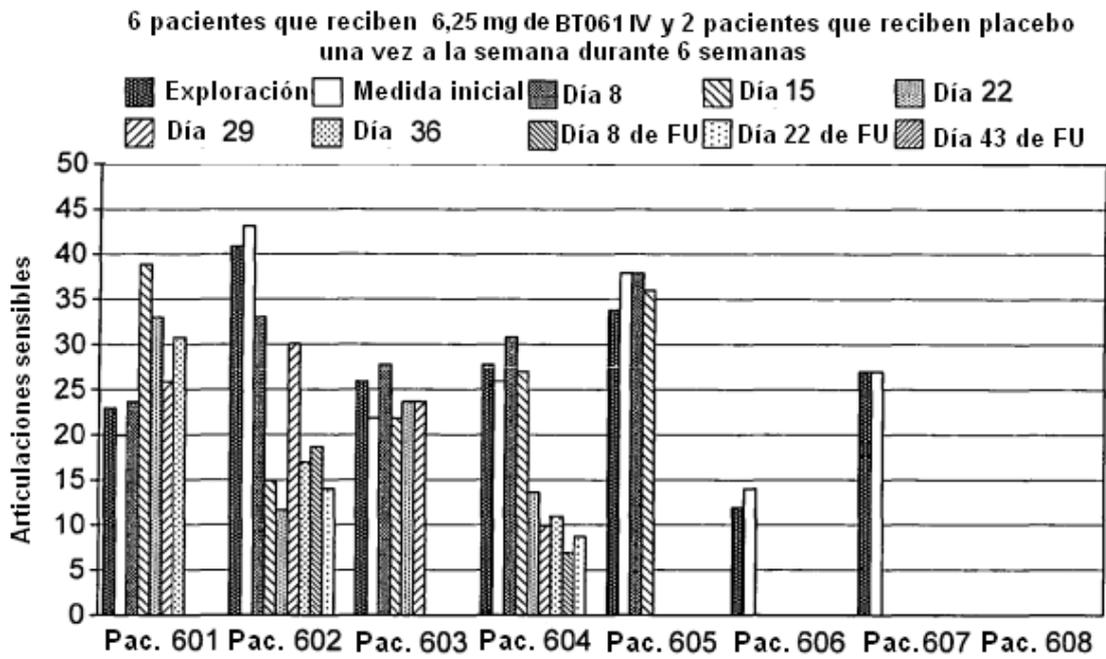


FIGURA 18B

	FR1		CDR1			FR2																																															
	1	2	3			4																																															
	12345678901234567890123		456777778901234			567890123456789																																															
			ABCD																																																		
mB-F5	D	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	V	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	K	S	V	S	T	S	G	Y	S	I	Y	Y	W	Y	Q	Q	I	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y
hB-F5L4M	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	A	S	K	S	V	S	T	S	G	Y	S	I	Y	Y	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y
hB-F5L4L	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FK-001	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C																W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y

	CDR2		FR3																																				
	5	6	7	8																																			
	0123456		78901234567890123456789012345678																																				
mB-F5	L	A	S	I	L	E	S	G	V	P	C	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V	E	E	D	A	A	T	Y	Y	C	
hB-F5L4M	L	A	S	I	L	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C
hB-F5L4L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK-001							G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	

	CDR3		FR4																
	9	10																	
	901234567		8901234567																
mB-F5	Q	H	S	R	E	L	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
hB-F5L4M	Q	H	S	R	E	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
hB-F5L4L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK-001									F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	

FIGURA 19

