

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 327**

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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2009 PCT/EP2009/052810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO2009112502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09720958 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2260057**

54 Título: **Régimen de dosificación de anticuerpos anti-CD4 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

13.03.2008 GB 0804687

29.09.2008 GB 0817809

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

27.04.2017

73 Titular/es:

BIOTEST AG (100.0%)

Landsteinerstr. 5

63303 Dreieich, DE

72 Inventor/es:

AIGNER, SILKE;

GERMER, MATTHIAS;

OSTERROTH, FRANK;

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, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 610 327 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

Régimen de dosificación de anticuerpos anti-CD4 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. La invención comprende un agente que es un anticuerpo anti-CD4 con un efecto a largo plazo que se puede administrar a los pacientes en terapia con menos frecuencia de la descrita anteriormente. Es especialmente beneficioso para los pacientes que tienen enfermedades o características que no se pueden eliminar a corto plazo, o que requieren un tratamiento indefinido para un alivio eficaz de los síntomas. La invención contempla los usos médicos que emplean las composiciones y los medicamentos que comprenden el agente.

La autoinmunidad es el fracaso de un organismo para reconocer sus propias partes constituyentes (a niveles sub-moleculares) como "propias", lo que da como resultado una respuesta inmunitaria contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que resulta de una respuesta inmunitaria aberrante se denomina enfermedad autoinmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR), psoriasis, artritis psoriática, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia gravis (MG), síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo II (SPA-II), tiroiditis de Hashimoto (TH), diabetes tipo -1 (DM1), lupus eritematoso generalizado (LEG) y síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLA).

La enfermedad autoinmunitaria se produce cuando las células T reconocen y reaccionan a 'las moléculas propias, es decir, moléculas producidas por las células del anfitrión. La activación de las células T 'autorreactivas' mediante la presentación de autoantígenos procesados por las células presentadoras de antígenos (CPA) conduce a su expansión clonal y a la migración a los tejidos específicos, en los que inducen inflamación y destrucción de tejidos.

Normalmente, las células T son tolerantes con respecto al tejido autólogo y sólo reaccionan en la presentación de estructuras heterólogas. La tolerancia central y la tolerancia periférica comprenden los dos mecanismos por los que el sistema inmunológico dificulta que las células T autorreactivas induzcan sus funciones deletéreas. La tolerancia central está mediada por la selección negativa. Este proceso implica la eliminación, a través de delección clonal de las células T autorreactivas, durante el desarrollo ontogénico en el timo.

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

Las células T reguladoras (Tregs, anteriormente también denominadas "células supresoras") como parte de la 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); Lee et al., J Exp. Medicina. 192:295-302 (2000). En general, las células T reguladoras inhiben la activación y/o la función de las células T efectoras coadyuvantes de tipo 1 (Th1) y Th2. La desregulación de la frecuencia de las células Treg o el funcionamiento puede conducir a enfermedades autoinmunitarias 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)).

Se han caracterizado varios subgrupos de células T reguladoras. La familia de Tregs consiste en dos subgrupos principales: las que surgen naturalmente, p. ej., Tregs CD4⁺CD25⁺ y las inducidas periféricamente, Tregs Tr1 y Th3. Además se han descrito NKTregs y CD8⁺ Tregs en los seres humanos y en roedores (Fehervari et al., J. Clin. Investigation 114: 1209-1217 (2004)).

Las células Treg derivadas del timo (CD4⁺CD25⁺Treg de origen natural) son las principales células reguladoras implicadas en la regulación de la autoinmunidad o las respuestas inmunitarias patógenas.

i) son células T CD4⁺ y constituyen 5-10% de las células T CD4⁺ periféricas
ii) maduran en el timo
iii) se caracterizan generalmente por la expresión combinada del receptor de IL-2 (CD25), la isoforma de bajo peso molecular de la molécula CD45, CD152 (CTLA-4), y el factor de transcripción FoxP3.

El papel de las Tregs se ilustra mejor por los experimentos que implican la reconstitución de ratones carentes de sistema inmunológico inmunodeficientes con células CD4⁺ que estaban empobrecidas en células CD25⁺. Los ratones carentes de sistema inmunológico reconstituidos CD4⁺CD25⁻ desarrollan diversas enfermedades autoinmunitarias específicas de órganos, tales como gastritis, ooforitis, orquitis, y tiroiditis (Suri-Payer et al.; J. Immunol. 160:1212-1218 (1998)).

La inclusión del subconjunto CD4⁺CD25⁺ en los experimentos de reconstitución con ratones carentes de sistema inmunológico evita la aparición de estas enfermedades (Sakaguchi et al., J Immunol. 155:1151-1164 (1995)). El valor protector de las células CD4⁺CD25⁺ contra la autoinmunidad específica de órganos también se ha demostrado en otros diversos modelos de autoinmunidad (p. ej., gastritis, prostatitis, ooforitis, glomerulonefritis, epididimitis y tiroiditis autoinmunitarias) causados por la timectomía neonatal realizada 3 días después del nacimiento (d3Tx) o por enfermedad inflamatoria del intestino causada por la reconstitución de los ratones SCID con células T CD45RBhigh, CD4⁺CD25⁺. La administración de anticuerpo anti-CD25 *in vivo* en ratones también induce la enfermedad autoinmunitaria localizada en los órganos.

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

El mecanismo farmacéutico de las células T reguladoras no está del todo claro. Las Tregs CD4⁺CD25⁺ inhiben la activación de las células T policlonales y específicas de antígenos. La supresión está mediada por un mecanismo dependiente del contacto celular que requiere la activación de Tregs CD4⁺CD25⁺ a través de TCR pero las Tregs no muestran una respuesta proliferativa tras la activación de TCR o la estimulación con anticuerpos mitógenos (anérgicos) (Shevach, Nature Rev. Immunol 2: 389 (2002)). Una vez estimuladas, son competentes para suprimir de una manera independiente del antígeno la respuesta de las células T CD4⁺ y de las células T CD8⁺, así como inhibir la activación de las células B y su expansión clonal.

Existen datos adicionales que indican que la actividad supresora de las Tregs CD4⁺CD25⁺ en parte también depende de las citoquinas antiinflamatorias como TGF-β (Kingsley et al., J Immunol. 168:1080 (2002); Nakamura et al., J Exp. Med. 194:629-644 (2001)). La importancia funcional de la secreción de TGF-β está además apoyada por los descubrimientos de que los ratones TGF-β-deficientes desarrollan enfermedades autoinmunitarias y de que la administración de anticuerpos neutralizadores para TGF-β anula la prevención *in vivo* de la autoinmunidad o la actividad inductora de tolerancia de las células T CD4⁺ en algunos modelos.

Dentro del subconjunto de células T CD4⁺ pueden existir al menos 2 tipos más de células diferentes con función supresora, que son inducidos después de la exposición al antígeno específico, exógeno (llamadas "células T reguladoras adaptables o inducibles"): Las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) y las células Th3. Estos tipos de células parecen ser distinguibles de las Treg CD4⁺CD25⁺ basándose en sus perfiles de producción de citoquinas. Sin embargo, la relación entre estos diferentes tipos es poco clara y los modos de acción se solapan.

Las células Tr1 fueron inducidas por la estimulación repetitiva de TCR en presencia de IL-10 y se demostró que principalmente regulan a la baja las respuestas inmunitarias a través de la producción de altos niveles de IL-10 junto con cantidades moderadas de TGF-β (Chen et al., J. Immunol. 171:733-744 (2003)).

Las células Th3 (identificadas en un modelo de EAE después de la administración oral de antígeno) producen altas cantidades de TGF-β y cantidades variables de IL-4 e IL-10. Se ha demostrado que IL-4, en sí, es un factor clave para la diferenciación de células Th3, en contraste con las células Tr1 que se diferencian con IL-10 (Chen et al., Science 265: 1237-1240 (1994)).

La supresión de la función de las células T mediante el uso de fármacos inmunosupresores es una estrategia terapéutica principal que se ha utilizado con éxito para tratar las enfermedades autoinmunitarias. Sin embargo, estos fármacos inducen una inmunosupresión general debido a su pobre selectividad, lo que da como resultado la inhibición de no sólo las funciones dañinas del sistema inmunológico, sino también de las útiles. Como consecuencia, se pueden producir varios riesgos como infección, cáncer y toxicidad por fármacos.

Los agentes que interfieren en la función de las células T son los pilares terapéuticos para diversas enfermedades autoinmunitarias.

Se ha demostrado que el enfoque de la utilización de agentes destinados a la activación de las células T reguladoras para la terapia de las enfermedades autoinmunitarias ha sido hasta ahora extremadamente difícil. La activación de Treg a través del TCR utilizando el anticuerpo anti-CD3 agonístico OKT-3 (Abramowicz et al., N Engl. J Med. 3 Sep 1992; 327 (10): 736) o a través de la molécula co-estimuladora CD28 utilizando el anticuerpo anti-CD28 superagonístico TGN 1412 conduce al completo empobrecimiento de la población de células T reguladoras, así como otras células T convencionales y a la inducción sistémica y la liberación de cantidades excesivas de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IFN-γ, TNF-α, IL-1 e IL-2, lo que da como resultado un síndrome de liberación de citoquinas clínicamente aparente (CRS) en los seres humanos (Suntharalingam et al., N Engl. J Med. 7 Sep 2006; 355 (10): 1018-28).

Después de las primeras dos a tres inyecciones de 5 mg de anticuerpo monoclonal OKT3 la mayoría de los pacientes desarrollan un síndrome de liberación de citoquinas con altos niveles de factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina-2, e interferón gamma que aparece en el plazo de 1-2 horas en la circulación de receptores de trasplante de riñón. (Abramowicz et al., Transplantation. Abr 1989; 47(4): 606-8). Esto da como resultado una estrecha ventana terapéutica, que limita la utilidad de este anticuerpo en el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias.

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

En general se acepta que las células T CD4 juegan un papel importante en el inicio y mantenimiento de la autoinmunidad. De acuerdo con ello, se ha propuesto utilizar mAb contra las moléculas de superficie de las células T CD4 y, en particular mAb anti-CD4, como agentes inmunosupresores. Aunque numerosos estudios clínicos han confirmado el interés potencial de este enfoque, también se plantearon varias cuestiones que deben abordarse con el fin de hacer los mAb anti-CD4 más adecuados para su uso en la práctica clínica habitual.

Se han propuesto varios mecanismos de acción diferentes para los mAb de CD4 incluyendo: (1) el antagonismo de las interacciones CD4-MHC II que da como resultado la inhibición de la activación de las células T, (2) la modulación del receptor CD4, determinada por una disminución en la expresión en la superficie celular de CD4, (3) la señalización parcial a través del receptor CD4 en ausencia de entrecruzamiento de receptor de células T que puede suprimir la posterior activación de células T y desencadenar la muerte apoptótica de las células T CD4, (4) la citotoxicidad dependiente del complemento mediada por Fc (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que conducen al empobrecimiento de células T CD4, y (5) la estimulación de células T reguladoras.

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por Fc o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que conducen al empobrecimiento de células T CD4 es el principal mecanismo observado y se demuestra especialmente para los anticuerpos de la subclase IgG1. Sólo unos pocos anticuerpos de CD4 se han atribuido a los otros mecanismos como TRX-1, TNX-355, IDEC-151, OKTcd4A siendo sólo TRX-1 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): 1139-1146 (2000); Herzyk et al., Infect Immun. 69(2): 1032-1043 (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)).

El empobrecimiento dependiente de la dosis de las células T CD4⁺ a dosis "altas" (múltiples ciclos con dosis > 100 mg) y el secuestro transitorio (empobrecimiento de corta duración) a dosis "inferiores" (múltiples ciclos con dosis > 10 mg), se observa con varios anticuerpos contra 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 empobrecedora, los mAb contra CD4 no proporcionaron un beneficio clínico y una eficacia consistente en las enfermedades autoinmunitarias investigadas, p. ej., artritis reumatoide (Strand et al., Nature Reviews 6: 75-92 (2007)). Además el empobrecimiento de células T CD4⁺ se considera generalmente como un escenario, que puede provocar una inmunosupresión severa.

El anticuerpo B-F5 (IgG1 murina anti-CD4 humano) se sometió a ensayo en diferentes enfermedades autoinmunitarias.

Un pequeño número de pacientes con psoriasis grave ha sido tratado con el anticuerpo murino B-F5 y se han descrito 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 una prueba controlada con placebo con una dosis diaria de B-F5 no indicaron una mejora significativa (Wendling et al. J Rheumatol; 25(8): 1457-1461, 1998).

En la esclerosis múltiple (EM), se observaron algunos efectos positivos después de un tratamiento de 10 días en pacientes con formas recurrentes-remitentes, algunos de los cuales todavía no habían en 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 efectos similares.

En la enfermedad de Crohn grave, no se observó una mejoría significativa en los pacientes que recibieron B-F5 durante 7 días consecutivos (Canva-Delcambre et al., Aliment Pharmacol Ther 10(5): 721-7, 1996).

En la prevención del rechazo de aloinjertos, se informó de que la biodisponibilidad de B-F5 no era suficiente para permitir su uso para la profilaxis del rechazo de aloinjertos (Dantal et al. Trasplantation, 27; 62 (10):1502-6, 1996).

Se desprende de lo anterior que una primera cuestión a resolver es la necesidad de utilizar dosis a más largo plazo de mAb para obtener una mejora clínica. En general, el uso a largo plazo de fármacos terapéuticos modificadores de la enfermedad da como resultado un mayor número de eventos adversos o una pérdida de los efectos clínicos, lo que exige un aumento de la dosis ("deslizamiento de la dosis") para mantener la respuesta (Strand et al., Nature Reviews Drug Discovery 6: 75-92, (2007)) debido a la inmunogenicidad. Cuanto menos/menos frecuentemente se tengan que administrar los agentes terapéuticos modificadores de la enfermedad, menos eventos adversos habrá, además hay un efecto beneficioso inmediato para los pacientes que requieren dosis menores y/o menos agentes terapéuticos.

Otro inconveniente de la terapia con anticuerpos monoclonales en seres humanos es que estos anticuerpos se obtienen generalmente a partir de células de ratón y provocan respuestas anti-ratón en los receptores humanos. Esto no sólo da como resultado una menor eficiencia del tratamiento e incluso de cualquier tratamiento futuro con anticuerpos monoclonales de ratón, sino también un mayor riesgo de anafilaxis.

Este inconveniente puede, en principio, evitarse mediante el uso de anticuerpos humanizados, obtenidos injertando las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que determinan la especificidad de 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 el anticuerpo monoclonal de ratón de la que derivan las secuencias de CDR, y mucho menos inmunogénicos en seres humanos.

En algunos casos, la sustitución de las CDR del anticuerpo de ratón por las CDR humanas en marcos humanos es suficiente para transferir las propiedades de unión al antígeno (incluyendo no sólo la especificidad, sino también la afinidad por el antígeno). Sin embargo, en muchos anticuerpos, algunos residuos de FR son importantes para la unión al antígeno, debido a que contactan directamente con el antígeno en el complejo anticuerpo-antígeno, o porque influyen en la conformación de las CDR y por lo tanto en su comportamiento de unión al antígeno.

Por lo tanto, en la mayoría de los casos también es necesario sustituir uno o varios residuos del marco de anticuerpo de ratón por los residuos de la FR humana correspondiente. Dado que el número de residuos sustituidos tiene que ser tan pequeño como sea posible con el fin de evitar reacciones anti-ratón, la cuestión es determinar qué residuos de aminoácido son críticos para la retención de las propiedades de unión al antígeno. Se han propuesto varios métodos para predecir los sitios más apropiados para la sustitución. Aunque proporcionan principios generales que pueden ser de alguna 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 de predecir qué sustituciones proporcionarán el resultado deseado.

Anteriormente, se ha intentado la humanización B-F5 de ratón, y se han logrado resultados positivos en la producción de B-F5 humanizado (en lo sucesivo denominado hB-F5) que tiene similares propiedades de unión de CD4 a B-F5 de ratón parental.

Por lo tanto, en el documento WO 2004/083247 (de la misma familia de patentes que EP 1460088 A1), se ha encontrado que el anticuerpo humanizado BT061 (B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) es útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la psoriasis y la artritis reumatoide. Este anticuerpo es un anticuerpo que es capaz de activar las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. La solicitud de patente describe composiciones para la administración parenteral, formuladas para permitir la administración de una dosis de 0,1 a 10 mg, preferiblemente 1-5 mg. Los regímenes de dosificación previstos son una dosis de 1 mg intravenoso por día y una dosis de 5 mg en días alternos para los pacientes con artritis reumatoide a lo largo de un período de 10 días.

El estudio también fue descrito por Wijdenes et al., en una sinopsis y presentación en la conferencia EULAR, junio de 2005. Se describió el tratamiento de 11 pacientes que padecían artritis reumatoide. Los pacientes fueron tratados con 5 infusiones intravenosas de 5 mg de BT061 cada dos días con tratamiento concomitante con 150 mg de Diclofenaco.

No se describe que el anticuerpo descrito en este estudio sea adecuado para su uso en dosis más altas o dosis a más largo plazo, y todavía es deseable encontrar tratamientos a dosis a más largo plazo con el fin de tratar un mayor número de pacientes.

Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ son capaces de mantener la tolerancia periférica y regular la autoinmunidad mediante la inhibición de la proliferación y producción de citoquinas de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ específicas del antígeno.

Estudios previos en ratones demostraron que las células T CD4⁺CD25⁺ murinas suprimen tanto la proliferación como la producción de IFN- γ por las células T CD8⁺ inducidas por anticuerpos policlonales o estímulos específicos del Ag. Además las células T CD4⁺CD25⁺ inhiben la activación de los respondedores CD8⁺ mediante la inhibición de la

producción de IL-2 y la regulación de la expresión de la cadena IL-2R α (CD25) (Piccirillo et al., J. Immunol. 167:1137-1140 (2001)). En contraste con las células T reguladoras, las células T convencionales expresan CD25 solamente después de la activación por un estímulo inmunógeno.

En los seres humanos, las células T CD4⁺CD25⁺ preactivadas por anticuerpos anti-CD3 o anti-CD28 afectan a las células T CD8⁺ conduciendo a una proliferación reducida en respuesta a la estimulación policlonal y alogénica y a una reducción de la producción de IFN- γ . Las células T CD8⁺ suprimidas mantienen su fenotipo anérgico a pesar de múltiples re-estimulaciones con su antígeno afín e IL-2 a lo largo de un máximo de 3 semanas. (Camara et al., Eur. J. Immunol. 33: 3473 - 3483 (2003), Dieckman et al., Immunology. 115 (3):305-14 (2005)).

Ehrenstein et al., describen la función alterada de las células T reguladoras en la artritis reumatoide por la terapia anti-TNF- α (J. Exp. Med., 2004; 200(3): 277-285). Gottlieb et al., describen la terapia de inducción con infliximab en pacientes con psoriasis en placas severa como: un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo (J. Am. Acad. Dermatol., 2004; 51(4): 534-542. Valencia et al., describen que el TNF modula a la baja la función de las células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi} humanas (Blood, 2006; 108(1): 253-261).

Tomando en consideración la técnica anterior, un objetivo de la presente invención es el tratamiento de pacientes que tienen enfermedades autoinmunitarias con menos dosis y/o dosis inferiores. En particular, un objetivo de la presente invención es encontrar tratamientos que se puedan aplicar a los pacientes a una baja frecuencia durante una terapia a largo plazo, con el fin de minimizar el número de inyecciones necesarias para obtener un beneficio clínico.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han observado que BT061 estimula específicamente las Treg CD4⁺CD25⁺ que suprimen la proliferación de células T CD8⁺ mediante la inhibición de la producción de IL-2 e IFN- γ por las células T CD8⁺ alorreactivas. Además las Treg CD4⁺CD25⁺ pre-activadas por BT061 suprimen convierten las células T CD8⁺ suprimidas incapaces de expresar CD25 tras la re-estimulación durante un máximo de 10 días permitiendo por primera vez un efecto terapéutico a largo plazo en el tratamiento de pacientes con este anticuerpo, ya que la expresión de CD25 es una de las características de la activación de dichas células T CD8⁺. El fracaso para expresar CD25 por lo tanto da como resultado una reducción de la activación no deseada del sistema inmunológico.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido por el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1, en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes o cada seis semanas, y en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 20 a 60 mg.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido por el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido por el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1, en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes o cada seis semanas, y en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo humanizado anti-CD4 de entre: (i) 8 a 40 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto; o (ii) de 0,2 a 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido por el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido por el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1, en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto de cada semana a cada 31 días, y en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo humanizado anti-CD4 de: (i) de 20 a 60 mg; (ii) 8 a 40 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto; o (iii) 0,2 a 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg.

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes o cada seis semanas, en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo humanizado anti-CD4 de 20 a 60 mg, y en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido por el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido por el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1.

Además, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes o cada seis semanas, en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo humanizado de entre: (i) 8 a 40 mg/m² de área superficial corporal; o (ii) de 0,2 a 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H que tiene el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L que tiene el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1.

Aún más, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto de cada semana a cada 31 días, en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo humanizado anti-CD4 de: (i) 20 a 60 mg; (ii) 8 a 40 mg/m² de área de superficie corporal; o (iii) 0,2 a 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg, y en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido por el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido por el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1.

La naturaleza a largo plazo de la terapia no está especialmente limitada, siempre que sea más larga que el tiempo requerido para el tratamiento inmediato/agudo del paciente en cuestión. Sin embargo, se prevén periodos de al menos 6 meses, 1 año, 18 meses, 2 años y 5 años, así como periodos indefinidos (p. ej., el tiempo de vida del paciente, o hasta que el paciente se cure, o no muestre síntomas).

En el tratamiento de pacientes con un agente, que es un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+, se puede demostrar tanto un efecto inmediato como un efecto terapéutico a largo plazo. Sin estar ligado por la teoría, se cree que esto es debido al hecho de que el agente estimula las células Treg CD4+CD25+ que inhiben no sólo directamente las células T CD8+, sino que también hacen que las células T CD8+ no puedan expresar CD25 tras la re-estimulación. Se cree que los efectos a largo plazo están mediados adicionalmente por una combinación de eficacia a bajos niveles y una lenta disminución de la concentración eficaz de anticuerpo administrado en un entorno clínico, lo que da como resultado largos períodos a un nivel eficaz del agente.

Se apreciará a partir de los regímenes anteriores que los autores de la presente invención han encontrado que, sorprendentemente, el anticuerpo humanizado BT061 (B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) no modula sustancialmente ni induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, en comparación con otros anticuerpos que interactúan con las células T (p. ej., anticuerpos anti-CD3), pero estimula las células T reguladoras CD4+CD25+ que inhiben directamente las células T CD8+ plus también hace que las células T CD8+ no puedan expresar CD25 tras la re-estimulación. Basándose en la investigación de los autores de la presente invención, las dosis se pueden administrar a intervalos más grandes y por un período mucho más largo que el descrito anteriormente en el documento WO 2004/083247.

La concentración del agente que es un anticuerpo anti-CD4 humanizado no está especialmente limitado, siempre que está presente a una concentración que sea adecuada para el paciente. Sin embargo, para dosis elevadas preferiblemente, la concentración del agente es de 10 a 150 mg/ml, de 15 a 150 mg/ml, de 15 a 100 mg/ml, de 15 (o mayor que 10) a 75 mg/ml, o de 20 a 60 mg/ml. Lo más preferiblemente, la concentración del agente 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.

En realizaciones preferidas alternativas para dosis más bajas, la concentración del agente es del 0,11 µg/ml a 30 mg/ml o, de 0,1 a 1.000 µg/ml, y más preferiblemente de 1-500 µg/ml y de 2 a 250 µg/ml. Lo más preferiblemente, la concentración del agente es (aproximadamente) una cualquiera de los 15 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, o 500 µg/ml, 1 mg/ml, 12,5 mg/ml o 25 mg/ml.

El volumen de dosificación aplicado a un sujeto utilizando la composición no está especialmente limitado, siempre que se suministre durante un largo plazo en comparación con los regímenes ya conocidos, y sea por lo tanto adecuado para el tratamiento de individuos que se pueden beneficiar de la terapia a largo plazo, tales como, pero no limitados a, los casos graves con un largo historial de la enfermedad y respuesta insuficiente a las terapias actuales. La concentración del agente, que es un anticuerpo anti-CD4 capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+, dentro de los volúmenes de dosificación se puede variar con el fin de proporcionar las dosis requeridas, que se describen en la presente memoria.

El volumen de dosificación variará dependiendo del método de administración. De acuerdo con la invención, la composición se va a administrar por vía intravenosa. De acuerdo con la descripción se prefiere la administración parenteral. Los ejemplos de administración parenteral son la administración intramuscular, administración

intravenosa o administración subcutánea. Cuando la composición se va a administrar por infusión intravenosa, el volumen de dosificación puede ser de 0,1 o 0,5 ml hasta 500 ml, preferiblemente entre 15 y 25 ml, y típicamente aproximadamente 20 ml. Cuando la composición se va a administrar por inyección subcutánea o intramuscular, el volumen de dosificación puede estar entre 0,1 y 3 ml, preferiblemente entre 0,5 y 1,5 ml, y típicamente aproximadamente 1 ml.

Sin embargo, la composición se puede proporcionar en forma concentrada y diluirla a la fuerza requerida para los individuos afectados. Preferiblemente, en estas situaciones, la composición se proporciona en volúmenes relativamente pequeños de aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 ml. Alternativamente, la composición se proporciona a la fuerza y el volumen de dosificación requeridos descritos anteriormente (es decir, lista para la administración). En un ejemplo específico, las composiciones farmacéuticas para la administración subcutánea se proporcionan en una forma lista para la administración que no requiere dilución para que pueda ser administrada fácilmente por personal no médico.

Como se ha mencionado anteriormente, no se sabía que los agentes capaces de tratar enfermedades autoinmunitarias podían ser administrados en las terapias a largo plazo a bajas frecuencias que se prevén en la presente invención. Mientras que las dosis conocidas de los agentes capaces de tratar la enfermedad autoinmunitaria son eficaces en algunos individuos o tipos de enfermedades, la comprensión de que pueden ser eficaces durante períodos más largos de tiempo y tolerados durante períodos más largos ha abierto el camino para un tratamiento más eficaz de algunas enfermedades autoinmunitarias y clases de pacientes.

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

La Figura 1 muestra el efecto de BT061 sobre la síntesis de citoquinas de cultivos de sangre entera a partir de 3 donantes sanos. Los cultivos se estimularon en experimentos separados con 4 diferentes tipos de activadores: CD3 = anticuerpos anti-CD3; LPS lipopolisacárido; PHA = fitohemaglutinina + anticuerpos anti-CD28; SEB = enterotoxina estafilocócica B + anticuerpos anti-CD28. Se determinaron diferentes citoquinas para medir los efectos sobre 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 entera humana (donantes con artritis reumatoide) sobre la síntesis de citoquinas provocada 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 de BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está subrayada y la secuencia de polipéptido correspondiente (SEQ ID NO: 17) se indica 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 regiones de BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está subrayado y la secuencia de polipéptidos correspondiente (SEQ ID NO: 2) se indica debajo de la secuencia de nucleótidos;

La Figura 7 muestra que las Treg CD25⁺ activadas con BT061 (mAb anti-CD4) suprimen la síntesis de citoquinas y la re-expresión de CD25 de las células T CD8⁺. Arriba: Treg CD25⁺ activadas con CD4 suprimen la síntesis de citoquinas de las células T CD8⁺ co-activadas. Abajo: Treg CD25⁺ activadas con CD4 suprimen la re-expresión de CD25 de las células T CD8⁺. Los gráficos de puntos muestran células T CD8⁺ seleccionadas en portales solamente. Se muestra un resultado representativo de tres. Los números indican los porcentajes de células positivas.

Las Figuras 8A y 8B muestran, respectivamente, la liberación TFN α y IL-6 observada en una prueba clínica con BT061 (infusión intravenosa única o inyección subcutánea) en voluntarios sanos en comparación con los niveles referidos con los anticuerpos monoclonales anti-CD3. Los niveles de dosis y el tiempo de recuperación se incluyen en las figuras. Los resultados para TRX4 indicados en las figuras como "2)", referidos en Keymeulen et al., 2005 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes patients. Los resultados para teplizumab indicados en las Figuras como "3)", referidos en Herold et al., 2002 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes Patients. Los valores normales indicados en las figuras como "4)", referidos en Straub et al., 2007, Athr. & Rheumat. "**)" representa una sola dosis, "***)" representa una dosis acumulativa inyectada hasta que se alcanzó la concentración máxima.

La Figura 9 muestra los niveles plasmáticos de IL-2 e IFN- γ después de la administración de una sola dosis intravenosa o subcutánea de BT061 en voluntarios sanos. LSN = límite superior de la normalidad; LIN = límite inferior de la normalidad.

La Figura 10 muestra una cinética de los recuentos de células 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 de puntos indican el límite superior de la normalidad (LSN) y el límite inferior de la normalidad (LIN).

La Figura 11 muestra una cinética de los recuentos de células CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una sola dosis subcutánea de BT061. Se muestran los valores medios de 3 pacientes por grupo de dosis. Las líneas de puntos indican el límite superior de la normalidad (LSN) y el límite inferior de la

normalidad (LIN).

La Figura 12, partes A a H, proporciona gráficos que muestran los datos de las pruebas clínicas con pacientes con psoriasis del grupo de dosis I como se describe en el Ejemplo 8, en el que los pacientes son tratados 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 PASI de los pacientes 1 a 8 del grupo de dosis I, respectivamente. La Figura 13, partes A a H, proporciona gráficos que muestran los datos de las pruebas clínicas con pacientes con psoriasis del grupo de dosis II como se describe en el Ejemplo 8, en el que los pacientes son tratados 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 PASI de los pacientes 1 a 8 del grupo de dosis II, respectivamente. La Figura 14, partes A y B, proporciona fotografías de la prueba clínica con pacientes con psoriasis tal como se describe en el Ejemplo 8. Las fotografías son del mismo paciente que era un miembro del grupo de dosis II. La fotografía mostrada en la parte A fue tomada antes del tratamiento. La fotografía mostrada en la parte B fue tomada 28 días después del tratamiento.

La Figura 15 proporciona los resultados de la prueba clínica con pacientes con artritis reumatoide como se ha descrito en el Ejemplo 9. La figura muestra un gráfico de barras del 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 alcanzaron al menos una respuesta ACR20. Seis pacientes en cada grupo recibieron la dosis de anticuerpo, mientras que dos pacientes recibieron un placebo.

Las Figuras 16A y 16B proporcionan los resultados de la prueba clínica con pacientes con artritis reumatoide como se ha descrito en el Ejemplo 9. La figura 16A muestra un gráfico de barras del número de articulaciones dolorosas para los pacientes del grupo de dosis que recibieron 25 mg de BT061 subcutáneo. La Figura 16B muestra un gráfico de barras del número de articulaciones inflamadas en pacientes de un mismo grupo de dosis. Seis pacientes en cada grupo recibieron la dosis de anticuerpo, mientras que dos recibieron un placebo.

Las Figuras 17A y 17 B proporciona los resultados de la prueba clínica con pacientes con artritis reumatoide como se ha descrito en el Ejemplo 9. Las Figuras muestran los cambios de los parámetros individuales (en %) de un respondedor (Figura 17A) y un no respondedor (Figura 17B) del grupo de dosis subcutánea de 25 mg. En las Figuras "Pat GA" y "Fis GA" se refieren a la evaluación global del paciente y la evaluación global del médico, respectivamente. El término "PA del dolor" se refiere a la evaluación del dolor del paciente.

Las Figuras 18A y 18B proporcionan más resultados de la prueba clínica con pacientes con artritis reumatoide como se ha descrito en el Ejemplo 9. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis subcutánea de 1,25 mg (Figura 18A) y del grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg (Figura 18B).

Las Figuras 19A y 19B proporcionan más resultados de la prueba clínica con pacientes con artritis reumatoide como se ha descrito en el Ejemplo 9. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis subcutánea de 50 mg (Figura 19A) y del grupo de dosis intravenosa de 6,25 mg (Figura 19B).

La Figura 20 muestra el alineamiento de las secuencias de polipéptidos de V_K de B-F5 murino (SEQ ID NO: 8), FK-001 (SEQ ID NO: 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 21 muestra el alineamiento de las secuencias de polipéptidos de V_H de B-F5 murino (SEQ ID NO: 7), M26 (SEQ ID NO: 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 invención se describirá ahora con más detalle.

Los agentes que se van a utilizar en la presente invención son anticuerpos anti-CD4 humanizados que comprenden un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1, que son capaces de activar las células T reguladoras CD4+CD25+. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG1 no modificado.

En un aspecto preferido de la invención, el agente no causa un aumento sustancial en el nivel de las citoquinas pro-inflamatorias en el plasma sanguíneo del sujeto después de la administración en comparación con los 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 son sustancialmente más elevados en comparación con los niveles en plasma medidos en sujetos sanos (véase la Tabla A1). Específicamente, si el LSN para una citoquina específica dada en la Tabla A1 se toma como X, en el plazo de las 96 horas después de la administración del agente de la invención puede haber un aumento menor de 20 veces en X. Preferiblemente puede haber un aumento de menos de 10 en X. Más preferiblemente estos niveles son durante el período desde 10 minutos después del inicio de la administración a 96 horas después de la finalización de la administración.

Es posible que en pacientes autoinmunitarios, los niveles de citoquinas antes de la administración del agente ya sean más altos que los observados en sujetos sanos (LSN dado en la Tabla A1), p. ej., debido a un estado de activación de las células inmunitarias modificado en comparación con el estado de activación de las células en sujetos sanos. En esos casos, la concentración para una citoquina específica directamente antes de la

administración del agente se toma como X y en el plazo de 96 horas después de la administración del agente de la invención puede haber un aumento de menos de 20 veces en X. Preferiblemente puede haber un aumento de menos de 10 veces en X. Más preferiblemente estos niveles son durante el período desde 10 minutos después del inicio de la administración a 96 horas después de la finalización de la administración.

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

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

10 En un aspecto preferido adicional de la invención, el agente no causa una disminución sustancial de larga duración en el recuento de células de linfocitos CD4+ en el plasma sanguíneo del sujeto. En concreto, en el plazo de 72 a 96 horas después de la administración el recuento de células de linfocitos CD4+ en el plasma sanguíneo del sujeto puede estar por encima de 250 células/ μ l (o al menos 250 células/ μ l).

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

20 Para evitar el impacto negativo sobre el sistema inmunológico, p. ej., una disminución en el recuento de células de linfocitos o la inducción de la liberación de citoquinas, se conoce en la técnica la utilización de anticuerpos (especialmente anticuerpos que interactúan con células T) de la subclase IgG2, IgG3 o IgG4 ya que los anticuerpos de la subclase IgG1 presentan mayores interacciones con los receptores de Fc. También es conocida en la técnica la modificación de los anticuerpos (especialmente los anticuerpos que interactúan con las células T) por mutación de Fc, desglicosilación, glicomodificación o glicoingeniería para reducir las interacciones de los receptores de Fc.

25 Los autores de la presente invención han encontrado que la evitación de anticuerpos de la subclase IgG1 y las modificaciones no son necesarias para el agente de la presente invención. En particular, el agente de la presente invención no muestra el empobrecimiento de larga duración sustancial de células CD4+ ni induce la liberación de citoquinas sustancial en comparación con los anticuerpos anti-CD3.

30 Por consiguiente, en un aspecto preferido de la invención, el agente es un anticuerpo IgG1 no modificado, es decir, un anticuerpo que no incluye una mutación de Fc, y no ha sido objeto de desglicosilación, glicomodificación o glicoingeniería para reducir las interacciones de los receptores de Fc, o un fragmento o un derivado del mismo.

35 Los anticuerpos que se van a utilizar en la presente invención son anticuerpos anti-CD4 humanizados, que son capaces de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ y que comprenden un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido por el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1. Los ejemplos de otros anticuerpos que son capaces de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ se comentan en Becker et al., (European Journal of Immunology (2007), Vol. 37: páginas 1217-1223).

40 En general, el anticuerpo utilizado en la descripción comprende adicionalmente una región constante humana (Fc). Esta región constante se puede seleccionar entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las regiones constantes preferidas se seleccionan entre los dominios constantes de IgG, en particular, IgG1.

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

50 En un aspecto particularmente preferido de la presente descripción, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o un fragmento o derivado del mismo derivados del anticuerpo anti-CD4 monoclonal de ratón B-F5. En un aspecto particularmente preferido de la presente invención, el anticuerpo es el anticuerpo BT061.

Anticuerpo BT061, fragmentos y derivados del mismo

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

● Dominio V de la cadena H: EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA
PGKGLEWIGVISVKSENIGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVY YCSAS
YYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

5 ● Dominio V de la cadena L:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYQYQQ
KPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWT
FG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

10 Los derivados de este anticuerpo también son adecuados para su uso en la presente descripción. Los derivados incluyen aquellos con dominios V definidos por las secuencias de polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% con el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 2.

15 Los anticuerpos particularmente preferidos son los que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del mAb B-F5 de ratón, y conservan la capacidad de hB-F5 para activar las células T reguladoras CD4+CD25+. La ubicación de las CDR dentro de los dominios V_H y V_K se muestran en las Figuras 20 y 21. Tales anticuerpos pueden tener opcionalmente variaciones en la secuencia de las CDR que no afectan sustancialmente a la especificidad y/o afinidad de unión.

20 En general, el anticuerpo hB-F5 utilizado en la descripción comprende adicionalmente una región constante humana (F_c). Como se indicó anteriormente, esta región constante se puede seleccionar entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las regiones constantes preferidas se seleccionan entre los dominios constantes de IgG, en particular, IgG1.

25 La presente descripción también incluye cualquier fragmento de un anticuerpo BT061 que comprende las regiones V del mismo. Este comprende, en particular, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y scFv.

30 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 el propósito de expresar las cadenas H y L completas obtenidas de este modo; también se puede añadir una secuencia que codifica un péptido señal que permite la secreción de la proteína.

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

40 Estos constructos de ADN recombinante se pueden obtener e introducir en células anfitrionas mediante técnicas bien conocidas de ADN recombinante e ingeniería genética.

45 La descripción también hace uso de una célula anfitriona, transformada por un polinucleótido de la descripción. Las células anfitrionas útiles en el marco de la presente descripción pueden ser células procariotas o eucariotas. Entre las células eucariotas adecuadas, se mencionan, a modo de ejemplo, células vegetales, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, células de insectos, tales como *Drosophila*, o *Spodoptera*, y células de mamífero tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

La construcción de vectores de expresión utilizados en la descripción, y la transformación de las células anfitrionas se pueden llevar a cabo mediante técnicas convencionales de la biología molecular.

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

55 *Construcción de B-F5 humanizado*

Diseño de las regiones V_H y V_K de B-F5 humanizado

60 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 la Figura 4 y en los identificadores de secuencia SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. La V_H y la V_K humanas

en las que se injertan las CDR de ratón fueron seleccionados mediante la búsqueda en bases de datos de la V_H humana más parecida a la V_H y V_K de B-F5 de ratón original. La región V_H de un anticuerpo humano (M26; Número de Acceso A36006) tenía la más alta homología con 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 más alta homología con V_K de B-F5.

Se construyeron dos tipos de V_K que difieren entre ellas en que el 4º residuo era leucina o metionina y se denominaron L4L y L4M. Se construyeron dos tipos de V_H que difieren entre ellas en que el 37º residuo de aminoácido era Leucina o Valina, y se denominaron H37L y H37V. El alineamiento de las secuencias de polipéptido de B-F5, FK-001, L4L y L4M se muestra en la Figura 20. El alineamiento de las secuencias de polipéptido de B-F5, M26, H37L y H37V se muestra en la Figura 21. Se informó previamente de que los residuos de la FR que eran importantes para el empaquetamiento de las CDR (Chothia et al., Nature 342 (1989), 877; Foote et al., J. Mol. Biol., 224 (1992), 487) estaban recuadrados.

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

Expresión de B-F5 humanizado

Las etapas posteriores para la producción de B-F5 humanizado fueron las mismas que las descritas en la Patente de los Estados Unidos 5.886.152 para B-B10 humanizado.

Brevemente, se construyeron por separado los plásmidos de expresión para la cadena H (región V_H humanizada fusionada a la región constante de una cadena γ -1 humana (TAKAHASHI et al., Cell, 29 (1982), 671-679)) y la cadena L (región V_K humanizada fusionada a la región constante de la cadena K FK-001) de B-F5 humanizado. En estos plásmidos, la expresión de B-F5 humanizado es dirigida por el promotor/intensificador del gen de la IgM monoclonal humana, FK-001. Las Figuras 5 y 6 muestran respectivamente los fragmentos de los plásmidos que codifican las regiones V_H y V_K de B-F5 humanizado. Las secuencias que codifican la región V están subrayadas y las secuencias polipeptídicas correspondientes se indican debajo de la secuencia de nucleótidos. Tanto los plásmidos como pSV2neo se introdujeron simultáneamente en mieloma de ratón Sp2/0 (ATCC CRL-1581) utilizando Lipofectinaⁿⁱ. Los transfectomas que producen IgG humana se seleccionaron mediante ELISA, utilizando un anticuerpo anti-IgG humana (y cadena) y un anticuerpo anti-cadena K de Ig humana.

Caracterización de las diferentes versiones de B-F5 humanizado

Estimación de la actividad de unión a CD4

Se recogieron sobrenadantes de cultivo de transfectomas que producen las cuatro versiones de hB-F5, y se concentraron. Los diferentes anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante el uso de cromatografía de afinidad con proteína A Sefarosa y se evaluaron para determinar su actividad de unión a CD4 midiendo, mediante ELISA competitivo, sus actividades inhibitoras frente a la unión de mB-F5 biotinilado a CD4 soluble como revestimiento sobre placas de microtitulación. El tiempo de incubación es de 2 horas a 37°C y durante la noche a 4°C.

Las actividades de unión relativa de los hB-F5 (actividad de unión de mB-F5 se tomó como 100%) se muestran en la Tabla A siguiente:

Tabla A

Anticuerpo	Temperatura (°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

A partir de los resultados mostrados en la Tabla A, parece que el residuo 37º de Leucina, es crítico para mantener la actividad de unión a CD4 de hB-F5 debido a que la actividad de unión a CD4 se reduce varias veces por la conversión de la ³⁷Leu en ³⁷Val. Por el contrario, se ha encontrado que el 4º residuo de V_K no es tan importante para la actividad de unión a CD4. Puesto que la diferencia estructural entre ³⁷Leu y ³⁷Val de V_H no está claramente

demostrada por medio del modelado molecular, la superioridad de H37L con respecto a H37V en la actividad de unión a CD4 fue inesperada.

Se eligieron H37L/L4L y H37L/L4M para su evaluación.

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

Se evaluaron las actividades biológicas *in vitro* de B-F5 de ratón y de B-F5 humanizados (IgG1 H37L/L4M e IgG1 H37L/L4L). También se sometieron a ensayo los B-F5 humanizados de tipo IgG2 (IgG2 H37L/L4M e IgG2 H37L/L4L).

Se evaluaron las actividades biológicas *in vitro* mB-F5 y los cuatro tipos de hB-F5 utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Las PBMC fueron activadas por ConA (2,5 pg/ml, 3 días) o PPD (10 pg/ml, 4 días) en presencia de B-F5 murino o hB-F5, y fueron controladas por sus respuestas proliferativas por incorporación de 3H-timidina.

El B-F5 murino y el hB-F5 podrían inhibir moderadamente la proliferación inducida por ConA, pero las actividades variaban de anticuerpo a anticuerpo y/o de donante a donante. Asimismo, el B-F5 murino y el hB-F5 fueron capaces de inhibir la proliferación de PBMC específica del Ag inducida por PPD.

El tipo IgG1 de hB-F5 inhibió la proliferación inducida por PPD con mayor eficacia (hasta 70% de inhibición) que mB-F5. El tipo IgG1 parecía ser más eficaz que el tipo IgG2 cuya actividad inhibidora era casi la misma que la de mB-F5. Para el tipo IgG1, H37L/L4M fue más eficaz que H37L/L4L. El tipo IgG2 de H37L/L4M y H37L/L4L tenía casi las mismas actividades inhibidoras. En resumen, las actividades inhibidoras de los B-F5 contra la proliferación de PBMC inducida por PPD fueron las siguientes: IgG1 H37L/L4M > IgG1 H37L/L4L > IgG2 H37L/L4M = IgG2 H37L/L4L = mB-F5.

Teniendo en cuenta la eficacia de la actividad biológica *in vitro* y el número más pequeño de aminoácidos de ratón, se eligió la IgG1 H37L/L4M para una evaluación adicional, y es este anticuerpo el que se denomina BT061 y se emplea para demostrar la presente invención en los Ejemplos proporcionados.

Composiciones y usos

Como se ha mencionado, la composición farmacéutica y los medicamentos utilizados en la presente descripción, son preferiblemente capaces de tratar una enfermedad autoinmunitaria en pacientes que se benefician de las terapias a largo plazo.

En algunos ejemplos (dosis más altas) las dosis preferidas del agente son de 10 mg a 100 mg, de 10 mg a 80 mg, de 15 mg a 80 mg, de 20 mg a 75 mg, preferiblemente de 20 mg a 60 mg y lo más preferiblemente de 25 mg a 60 mg.

Alternativamente, la dosificación se puede definir basándose en la dosis acumulativa a lo largo de una pluralidad de dosis. En particular, para una pluralidad de dosis durante un período de 10 días, se prefiere que la dosis acumulativa esté entre más de 25 mg, pero menos o igual a 200 mg, más preferiblemente entre 28 mg y 100 mg, y lo más preferiblemente entre 30 mg y 100 mg. Además, las dosis acumulativas durante un período de 5 días son preferiblemente mayores de 15 mg, pero inferiores o igual a 100 mg, más preferiblemente entre 18 mg y 100 mg y lo más preferiblemente entre 20 mg y 100 mg. En este aspecto se prefiere particularmente que las dosis se administren por vía subcutánea.

En un ejemplo alternativo (dosis más bajas) las dosis preferidas son de 0,2 mg a 30 mg, de 0,2 a 20 mg por dosis, de 0,3 mg a 7,5 mg, de 0,3 a 5 mg por dosis o preferiblemente de 0,3 a 1 mg por dosis.

Alternativamente, la dosificación puede ser definida basándose en la dosis acumulativa a lo largo de una pluralidad de dosis. En particular, para una pluralidad de dosis a lo largo de un período de 10 días, se prefiere que la dosis acumulativa esté entre 0,2 y menos de 25 mg, más preferiblemente entre 0,2 y 20 mg y lo más preferiblemente entre 0,2 y menos de 10 mg. Además, la dosis acumulativa a lo largo de un período de 5 días debe estar entre 0,2 y menos de 15 mg, preferiblemente entre 0,2 y 12 mg, y más preferiblemente entre 0,2 y menos de 5 mg.

En este aspecto, se prefiere que, cuando la dosis se vaya a administrar por vía intravenosa, las dosis a lo largo de un período de 10 días sean entre 0,2 y menos de 10 mg, más preferiblemente entre 0,2 y 7,5 mg. Alternativamente, cuando las dosis se van a administrar por vía subcutánea o por vía intramuscular, se prefiere que las dosis a lo largo de un período de 10 días sean entre 1 mg y 30 mg, más preferiblemente entre 5 mg y 30 mg.

La dosis también se puede calcular basándose en el peso corporal del sujeto o el área de superficie corporal (ASC)

del sujeto. El área de superficie corporal (ASC) se puede calcular de acuerdo con cualquier método conocido. Los ejemplos de los métodos de cálculo del ASC son los siguientes:

Fórmula de Mosteller:

$$5 \quad (ASC \text{ (m}^2\text{)}) = ([\text{Altura (cm)} \times \text{Peso (kg)}] / 3600)^{1/2}$$

(Mosteller RD: Cálculo simplificado del Área de Superficie Corporal. N Engl J Med 22 Oct 1987; 317 (17): 1098)

DuBois y fórmula de DuBois:

$$10 \quad ASC \text{ (m}^2\text{)} = 0,20247 \times \text{Altura (m)}^{0,725} \times \text{Peso (kg)}^{0,425}$$

(DuBois D; DuBois EF: Una fórmula para estimar el área de superficie aproximada si la altura y el peso se conocen. Arch Int Med 1916 17:863-71.

Fórmula de Haycock:

$$15 \quad ASC \text{ (m}^2\text{)} = 0,024265 \times \text{Altura (cm)}^{0,3964} \times \text{Peso (kg)}^{0,5378}$$

(Haycock G.B., Schwartz G. J., Wisotsky D. H. Método geométrico para la medición de la superficie corporal: Una fórmula de altura peso validada en lactantes, niños y adultos. The Journal of Pediatrics 1978 93: 1: 62-66)

Fórmula de Gehan y George:

$$20 \quad ASC \text{ (m}^2\text{)} = 0,0235 \times \text{Altura (cm)}^{0,42246} \times \text{Peso (kg)}^{0,51456}$$

(Gehan EA, George SL, Estimación de la superficie corporal humana a partir de la altura y el peso. Cancer Chemother Rep 1970 54: 225-35)

Fórmula de Boyd:

$$25 \quad ASC \text{ (m}^2\text{)} = 0,0003207 \times \text{Altura (cm)}^{0,3} \times \text{Peso (gramos)}^{(0,7285 - (0,0188 \times \text{LOG (gramos))})}$$

De acuerdo con los ejemplos de dosis más altas de la descripción la dosis del agente al sujeto en términos de peso corporal es de 0,1 a 2 mg/kg, preferiblemente de 0,15 a 1,5 mg/kg, y lo más preferiblemente de 0,2 a 1 mg/kg. En términos de ASC la dosis del agente al sujeto es de 5 a 60 mg/m² de ASC, preferiblemente de 6 a 50 mg/m² y lo más preferiblemente de 8 a 40 mg/m².

En estos aspectos, donde la dosis se basa en el área de superficie corporal o el peso corporal del sujeto, se prefiere que las dosis a lo largo de un período de 10 días estén entre 10 mg/m² y 120 mg/m², más preferiblemente entre 16 mg/m² y 120 mg/m², o entre 0,2 mg/kg y 4 mg/kg, más preferiblemente entre 0,4 mg/kg y 4 mg/kg. Se prefiere particularmente que las dosis se administren por vía subcutánea.

De acuerdo con los ejemplos de dosis más bajas de la descripción la dosis del agente al sujeto en términos de peso corporal es de 1 a 500 µg/kg, preferiblemente de 2 a 400 µg/kg, más preferiblemente 2 a 250 µg/kg y lo más preferiblemente 2,5 a 20 µg/kg. En términos de ASC la dosis del agente al sujeto es de 0,12 a 15 mg/m², más preferiblemente de 0,20 a 10 mg/m² y lo más preferiblemente de 0,30 a 0,50 mg/m².

En estos aspectos en los que la dosis se basa en el área de superficie corporal o el peso corporal del sujeto, se prefiere que, cuando la dosis se vaya a administrar por vía intravenosa, las dosis a lo largo de un período de 10 días sean entre 0,20 y 10 mg/m², más preferiblemente entre 0,20 y 4 mg/m², o entre 2 y 250 µg/kg, más preferiblemente entre 2 y 100 µg/kg. Alternativamente, cuando las dosis se vayan a administrar por vía subcutánea o por vía intramuscular, se prefiere que las dosis a lo largo de un período de 10 días sean entre 0,30 y 20 mg/m², más preferiblemente entre 0,5 y 20 mg/m² o entre 2,5 y 500 µg/kg, más preferiblemente entre 20 y 500 µg/kg.

La frecuencia de administración no está especialmente limitada, a condición de que proporcione las ventajas del tratamiento a largo plazo. Se prefiere que la pluralidad de dosis se administre por lo menos en las siguientes bases: 3 diarias, semanalmente, cada cuatro semanas, cada 6 semanas, cada 12 semanas, cada 24 semanas, todos los meses del calendario, cada 3 meses del calendario, cada seis meses del calendario o cada año. Por lo tanto, las dosis pueden estar separadas por al menos tres días, o alternativamente por al menos una semana, por al menos 10 días, por al menos un mes, por al menos 3 meses, por al menos 6 meses, o por al menos un año (lo que significa que se toman las dosis al menos cada 3 días, cada semana, cada 10 días, cada mes, cada 3 meses, cada 6 meses o cada año). En una alternativa adicional la pluralidad de dosis se toma cada 3 a 31 días, cada 3-10 días, cada 3-6 días o cada 1-12 meses.

La descripción también proporciona un kit para su uso como se define anteriormente, en donde el kit comprende una pluralidad de dosis de medicamento como se define anteriormente para la administración simultánea, secuencial o separada a un sujeto.

La descripción también proporciona un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, cuyo método comprende la administración de un medicamento como se ha definido anteriormente, de una manera como se ha definido anteriormente, a un sujeto.

Como se ha mencionado, la composición farmacéutica y los medicamentos utilizados en la presente descripción, son preferiblemente capaces de tratar una enfermedad autoinmunitaria en pacientes que se benefician de las terapias a largo plazo. Tales pacientes incluyen, pero no se limitan a, los casos graves con una larga historia de la enfermedad.

La composición farmacéutica y los medicamentos para su uso de acuerdo con la presente invención se utilizan en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Preferiblemente, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, lupus eritematoso generalizado, colitis ulcerosa, dermatitis atópica, miocarditis y enfermedades relacionadas con los trasplantes tales como las reacciones de injerto contra anfitrión o anfitrión contra injerto, o problemas de tolerancia de órganos en general.

En un aspecto particularmente preferido de la invención, las composiciones farmacéuticas se utilizan para el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria psoriasis. En particular, dichas composiciones farmacéuticas se van a administrar por vía intravenosa en las dosificaciones especificadas en las reivindicaciones.

La psoriasis es un trastorno que causa lesiones psoriásicas o placas en la piel del paciente.

Normalmente se utiliza el Índice de Severidad del Área de Psoriasis (PASI) para evaluar y registrar el nivel de la psoriasis exhibido por los enfermos. La puntuación PASI consiste en la evaluación del eritema (E), la infiltración (I), y la descamación (D), y la participación de la superficie corporal (A) en más de 4 regiones del cuerpo (cabeza (c), tronco (t), y extremidades superiores (s) e inferiores (i)). La siguiente Tabla B muestra cómo funciona el sistema de puntuación.

TABLA B - Sistema de puntuación PASI

Grado de severidad (por región del cuerpo)	Valor dado	Superficie implicada (por región del cuerpo)	Valor dado
No hay síntomas	0	< 10%	1
Leve	1	10-29%	2
Moderado	2	30-49%	3
Marcado	3	50-69%	4
Muy marcado	4	70-89%	5
		90-100%	6

Debido a que la cabeza, las extremidades superiores, el tronco, y las extremidades inferiores corresponden a aproximadamente 10, 20, 30, y 40% de área de superficie corporal, respectivamente, la puntuación PASI se calcula por la fórmula:

$$\text{PASI} = 0,1 (E_c + I_c + D_c)A_c + 0,2 (E_s + I_s + D_s)A_s + 0,3 (E_t + I_t + D_t)A_t + 0,4 (E_i + I_i + D_i)A_i$$

la puntuación PASI oscila entre 0 y 72. Una puntuación de 0 significa que no hay psoriasis, mientras que una puntuación de 72 representa la psoriasis más grave.

En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención es capaz de tratar la psoriasis, proporcionando una mejora de al menos 40%, y preferiblemente al menos 50%, en la puntuación PASI del paciente. Preferiblemente, el sujeto tiene una puntuación PASI de al menos 10 antes del tratamiento. Estos efectos pueden ser observados por lo menos 56 días después de la administración de una sola dosis del anticuerpo, más preferiblemente al menos 75 días después de la administración de una sola dosis del anticuerpo. En particular, estos efectos pueden ser observados en al menos 80% de los pacientes.

En un aspecto adicional de la presente invención las composiciones farmacéuticas se utilizan para el tratamiento de la artritis reumatoide.

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

La mejora en la artritis reumatoide exhibida por un paciente tratado comúnmente evaluado utilizando el conjunto básico de criterios de valoración ("core set") 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 mejora de 20% en el recuento de articulaciones sensibles e inflamadas y una mejora de 20% en 3 de las 5 medidas restantes del conjunto

básico de criterios de valoración del ACR: evaluaciones globales del paciente y el médico, dolor, discapacidad y un reaccionante de fase aguda, tal como la proteína C reactiva (CRP).

5 En particular, de acuerdo con la descripción, las composiciones farmacéuticas que se van a utilizar para el tratamiento de la artritis reumatoide se van a administrar preferiblemente por vía intramuscular o por vía subcutánea en las dosis especificadas en la presente memoria.

10 El tratamiento actual de la artritis incluye fármacos de primera línea para el control del dolor y la inflamación clasificados como antiinflamatorios no esteroideos (AINE), p. ej., aspirina, ibuprofeno, naproxeno, etc. El tratamiento secundario de la artritis incluye corticosteroides (p. ej., prednisona y dexametasona), fármacos antirreumáticos de acción lenta (FARAL) o los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME), p. ej., metotrexato, penicilamina, ciclofosfamida, sales de oro, azotipoprina, leflunomida, etc.

15 Los corticosteroides, las versiones sintéticas de la hormona cortisona del cuerpo, se utilizan para inhibir la progresión de la AR (p. ej., prednisona y dexametasona).

20 También se ha desarrollado otro grupo de fármacos denominados modificadores de la respuesta biológica (MRB) para el tratamiento de la AR incluyendo los antagonistas de TNF-alfa (adalimumab, infliximab, etanercept), que funcionan mediante la unión a su receptor o uniéndose directamente a la proteína TNF-alfa.

En una realización de este aspecto de la invención, las composiciones se van a administrar combinadas con los fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de la artritis reumatoide. En particular, las composiciones se van a administrar con uno de los fármacos mencionados anteriormente, preferiblemente metotrexato.

25 Los medicamentos conocidos, como el metotrexato, y la composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado.

La invención se describirá a continuación con más detalle en relación con las siguientes realizaciones específicas.

30 Ejemplos

EJEMPLO 1 - *Investigación de las capacidades inmunomoduladoras de BT061 con respecto a la proliferación de células T.*

35 Método

Se realizaron cultivos de sangre total con sangre periférica recién extraída. En pocas palabras, utilizando agujas 19G, se recogió sangre de tres voluntarios en jeringas heparinizadas. La sangre se sembró en placas de cultivo de 96 pocillos, a más tardar 60 minutos después de la donación.

40 El anticuerpo utilizado 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" más abajo). Se dejó que las células interactuaran con el anticuerpo durante 90 min a 37°C, CO₂ al 5% en atmósfera humidificada, a continuación, se añadieron cuatro estimulantes diferentes a los cultivos separados:

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

55 Todos los cultivos de sangre completa se incubaron durante 24 horas a 37°C, CO₂ al 5% (atmósfera humidificada). A continuación se recogieron los sobrenadantes de cultivo para la determinación de los criterios de valoración de las citoquinas, a excepción de los cultivos estimulados con PHA/antiCD28, que se incubaron durante 48 horas con el fin de obtener una estimulación suficiente de las células Th2.

Los resultados se exponen en la Figura 1.

60 Resultados

BT061 no mostró ningún efecto significativo sobre las actividades principales de los monocitos/macrófagos y sobre las actividades de Th1 y Th2 en cultivos de sangre completa de voluntarios sanos. Hubo un efecto dependiente de la concentración sobre las células Treg (demostrado como un aumento en 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 mg/ml correspondientes a la aplicación a alta dosis de hasta 150 mg en pacientes
- Ninguna inducción de la citoquina inflamatoria IFN-gamma a concentraciones de hasta 50 µg/ml correspondientes a la aplicación a alta dosis de hasta 150 mg en pacientes
- Ninguna modulación de las citoquinas Th1/Th2 a concentraciones de hasta 50 µg/ml correspondientes a la aplicación a alta dosis en pacientes
- Se produjo una regulación al alza sólo muy esporádica de IL-6 por un incremento marginal, cuyas implicaciones están en proceso de discusión
- Aumento de la liberación de TGF-beta (células Treg)
- Ningún efecto significativo sobre las principales actividades reguladoras de monocitos/macrófagos y sobre las actividades de Th1 y Th2.

Ejemplo 2 - Ensayo de BT061 para determinar su influencia sobre las PBMC humanas cultivadas cebadas para una respuesta contra el toxoide tetánico y un análisis de citoquinas

Método

Análisis de proliferación

Se cultivaron PBMC recién aisladas en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de 200 µl/pocillo (4×10^5 células/pocillo). El elemento de ensayo (mAb anti-CD4 BT061) se utilizó a las concentraciones de 20 µg/ml, 4 µg/ml y 0,8 µg/ml (además de 40 µg/ml en el pre-ensayo); Se utilizó toxoide tetánico a concentraciones de 25 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml. Para el control negativo se tomó medio de cultivo celular. Todos los cultivos se establecieron por triplicado.

Para la estimulación con ConA se utilizó una concentración de 2,5 µg/ml y un volumen de 200 µl/pocillo. Las PBMC se ajustaron a una densidad de 1×10^6 /ml y se dispensaron en un volumen de 100 µl por pocillo.

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

Análisis de citoquinas

Todas las citoquinas se cuantificaron en los sobrenadantes del cultivo utilizando kits de ELISA comerciales, de acuerdo con las respectivas instrucciones de los fabricantes. Los reactivos empleados se indican en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Sustancia	Fuente	Código	Lote
IFN-γ humana Kit OptEIA	BD Biosciences	555142	MF31099
IL-1 humano Kit ELISA	Juerga	BEM243/2EMT	n/A.
IL-4 humana Kit OptEIA	BD Biosciences	555194	MF10142
IL-5 humana Kit OptEIA	BD Biosciences	555202	MF31662
IL-6 humana Kit OptEIA	BD Biosciences	555220	MF25815
IL-10 humana Kit OptEIA	BD Biosciences	555157	MF24968
TGF-β humano Kit OptEIA	BD Biosciences	559119	47704
TNF-α humano Kit OptEIA	BD Biosciences	555212	MF31447

* Material adicional, necesario para el ELISA de Interleuquina-1

Se determinaron los niveles de interleuquina (IL)-1 en los sobrenadantes de cultivo utilizando el kit A de ELISA de IL-1 (Bender) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El intervalo del ensayo, predeterminado por el patrón

suministrado con el kit, se especificó en 1,3 a 130 pg/ml para las muestras sin diluir.

Se determinaron los niveles de IL-4, 5, 6 y 10 en los sobrenadantes de cultivo, así como factor de crecimiento transformante (TGF) β 1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) α utilizando el kit de ensayo OptEIA (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El intervalo de los ensayos, predeterminado por los patrones suministrados con los kits se especificó en 3,8 a 330 pg/ml para IFN- γ , 6,3 a 616 pg/ml (para IL-4, 5, 10 y TNF), medición de muestras sin diluir y 7,6 a 660 pg/ml para IL-6 utilizando diluciones a la mitad de las muestras.

Se incluyeron dos (para cultivos de monocitos) u ocho (para cultivos de PBMC) determinaciones de citoquinas por medio de ELISA, cada uno de los micro-cultivos independientes se incluyó en el cálculo de la media y la desviación típica. Se establecieron los títulos por encima del intervalo superior del ensayo (p. ej., 616 pg/ml en el caso de TNF) para este valor para el cálculo. El intervalo más bajo del ensayo se restó de cada valor medio antes del cálculo.

Resultados

BT061 (también denominado B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) es capaz de suprimir de manera dependiente de la dosis la proliferación de células T específicas del toxoide tetánico; no ha habido ningún efecto sobre el número total de células T. Se ha demostrado la supresión general de la liberación de citoquinas.

La Tabla 2 muestra la influencia del mAb anti-CD4BT061 en un análisis de proliferación de células T específicas de toxoide tetánico, medida por triplicado.

Se presentan las medias y la DT de la incorporación de ^3H -TdR, medida por triplicado, así como el índice de estimulación (SI, definido como $\text{cpm}_{\text{compuesto}}/\text{cpm}_{\text{nulo}}$) para cada concentración y el nivel de significación en la prueba de t de dos colas, no pareada frente al control de medio (ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Tabla 2

Anti-CD4 (BT061)	Tétanos	Toxoide		
20 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	nulo
Media (cpm)	5123	2426	2589	456
DT (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
Prueba t (compuesto vs. nulo)				
p=	0,000 ***	0,032 *	0,031 *	
4 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	nulo
Media (cpm)	6591	5005	2957	358
DT (cpm)	468	518	1333	57
Media (SI)	18,39	13,97	8,25	1,00
DT (SI)	4,21	3,65	5,02	0,32
Prueba t (compuesto vs. nulo)				
p=	0,000 ***	0,000 ***	0,028 *	
0,8 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	nulo
Media (cpm)	8787	6748	3902	414
DT (cpm)	1886	763	218	12
Media (SI)	21,24	16,31	9,43	1,00
DT (SI)	5,18	2,32	0,80	0,06
Prueba t (compuesto vs. nulo)				
p=	0,002	0,000	0,000	
Nulo	25 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	nulo

ES 2 610 327 T3

Media (cpm)	13783	10244	6970	650
DT (cpm)	1826	758	1351	95
Media (SI)	21,22	15,77	10,73	1,00
DT (SI)	5,91	3,47	3,65	0,29
Prueba t (compuesto vs. nulo)				
p=	0,000 ***	0,000 ***	0,001 **	
Viab-ctr	ConA	nulo		
Media (cpm)	94473	404		
DT (cpm)	4200	239		
Media (SI)	233,94	1,00		
DT (SI)	148,86	1,18		
Prueba t (compuesto vs. nulo)				
p=	0,000 ***			

Tabla 3

Esta tabla muestra la influencia del mAb anti-CD4 BT061 sobre la producción de citoquinas de cultivos de PBMC estimulados con toxoide tetánico. Se proporcionan la media y la DT de ocho microcultivos individuales.

BT061 Tox. Tet.										IL- 10 pg/ml		IFN- γ pg/ml		TGF- β 1 pg/ml		TNF α pg/ml	
		IL-1 pg/ml		IL-4 pg/ml		IL-5 pg/ml		IL-6 pg/ml									
μ g/ml	μ g/ml	Media DT		Media DT		Media DT		Media DT		Media DT		Media DT		Media DT		Media DT	
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 anticuerpo anti CD4 mAb BT061 en la producción de citoquinas inflamatorias LPS estimularon cultivos de monocitos. La media y SD se dan de dos culturas micro individuales.

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

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

- Se ha demostrado una supresión dependiente de la dosis de la proliferación de células T inducida por el toxoide tetánico (respuesta de recuerdo) incluso a altas dosis de BT061, mostrando que BT061 no anula todas las respuestas inmunitarias. Las dosis utilizadas se aplican a una aplicación de alta dosis correspondiente de hasta 60 mg en pacientes
- Supresión general de la liberación de citoquinas (reducción dependiente de la dosis de IFN-gamma, IL-5 y TNF-alfa, sin cambios en IL-1, IL-4, IL-6, IL-10) y sin afectar al equilibrio Th1/Th2 .
- Un aumento en la liberación de TGF-beta

Ejemplo 3 - Ensayo de citometría de flujo para ADCC (la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) inducida por BT061 (mAb anti-CD4)

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

Tabla 5

Concentración [μ g/ml]	Tecelac/ATG (control positivo) intensidad de fluorescencia media	Control negativo intensidad de fluorescencia media	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 [μ g/ml]	hB-F5 intensidad de fluorescencia media	Control negativo intensidad de fluorescencia media	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 hubo inducción de ADCC por BT061 (hB-F5) ni siquiera a altas concentraciones

Ejemplo 4 - Apoptosis

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

Después de un tiempo de incubación de 7 días, se llevó a cabo la detección de células apoptóticas mediante tinción de las células apoptóticas con Anexina-V-Fluoresceína. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

	Estímulo	
Experimentos de estimulación 7d	Control positivo (ATG/Tecelac)	BT061
Concentración de anticuerpo [µg/ml]	Aumento de la razón 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

5

Los datos demuestran que no hubo inducción de apoptosis ni siquiera a altas concentraciones de BT061.

Ejemplo 5 - Unión del complemento

- 10 En un ensayo de citometría de flujo para la unión al factor del complemento C1q se aislaron e incubaron PBMC con *BT061 (mAb anti-CD4)*, seguido de una incubación con C1q recombinante purificado.

ATG (Tecelac) sirvió como control positivo.

- 15 La detección se realizó con un anticuerpo de detección marcado con FITC contra C1q. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Concentración de anticuerpo [µg/ml]	mAb anti-CD4 BT061	Control positivo
	Intensidad media	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

- 20 Los datos muestran que no se puede observar unión del complemento, ni siquiera a altas concentraciones.

Ejemplo 6 - Treg CD25+ activadas con CD4 suprimen la síntesis de citoquinas y la re-expresión CD25 de células T CD8+

- 25 La Figura 7 muestra que las Treg CD25+ activadas por CD4 suprimen la síntesis de citoquinas y la re-expresión CD25 de las células T CD8+. Arriba: Treg CD25+ activadas por CD4 suprimen la síntesis de citoquinas de las células T CD8+ co-activadas.

Método

30

Las Treg CD25+ fueron estimulados con/sin mAb anti-CD3 o mAb anti-CD4 (B-F5, 1 µg/ml cada uno) durante 48 h. Después de eso, las células fueron co-cultivadas con PBMC singeneicas empobrecidas en células T y células T CD8+ alogénicas (razón 1:1). La producción de citoquinas se analizó el día 7. Las células T CD8+ alorreactivas fueron re-estimuladas con PHA/PMA durante 5 h en presencia de monensina, se fijaron y se tiñeron con mAb anti-

CD8 y específicos de citoquinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante respectivo (todos de BD Pharmingen). La síntesis de citoquinas se analizó por medio de citometría de flujo "seleccionando en portales" los linfocitos CD8+. Se midió la re-expresión de CD25 por células T CD8+ se acuerdo con el siguiente procedimiento: Las Treg CD25+ fueron estimuladas con/sin mAb anti-CD3 mAb o mAb anti-CD4 (B-F5, 1 µg/ml cada uno) durante 48 h. Después de eso, las células fueron co-cultivadas con PBMC singeneicas empobrecidas en células T y células T CD8+ alogénicos. El día 10, las células T CD8+ se re-estimularon con PBMC empobrecidas en CD3 alogeneicas del mismo donante que se utilizó para la estimulación primaria (razón 1:1) y se analizó la re-expresión de CD25 de las células T CD8+ 24 h después de la citometría de flujo de re-estimulación.

Resultados

Las Treg CD25+ activadas no sólo suprimen la proliferación de células T convencionales sino que también inhiben la producción de citoquinas y la capacidad de las células T CD8+ para expresar la cadena α del receptor de IL-2, CD25. Como se muestra en la Figura 7, las Treg CD25+ activadas con CD4 inhibían la producción de IL-2 e IFN- γ de células T CD8+ alorreactivas, de un modo similar a las Treg CD25+ estimuladas con anti-CD3. Al mismo tiempo se convirtieron en células T CD8+ suprimidas incapaces de expresar CD25 tras la re-estimulación (Figura 7). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la estimulación con CD4 activa plenamente las propiedades supresoras de las Treg CD25+.

Ejemplo 7 - Seguridad y tolerabilidad de dosis crecientes de BT061 (con dosis subcutáneas de referencia)

Se realizó un estudio para controlar la seguridad y la tolerabilidad de BT061 utilizando dosis crecientes del anticuerpo en voluntarios sanos de ambos sexos entre las edades de ≥ 18 a ≤ 75 años.

Treinta voluntarios recibieron BT061 por administración intravenosa en 10 grupos de dosificación, con 3 voluntarios por grupo. Además, 15 voluntarios recibieron BT061 por medio de administración subcutánea en 5 grupos de dosificación también con 3 voluntarios por grupo. La administración intravenosa de BT061 se ilustra en la Tabla 8 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
30,5 µg	0,28 µl	-	-
20 µg	1,6 µl	-	-
100 µg	8 µl	-	-
500 µg	40 µl	-	-
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 una inyección de cloruro de sodio al 0,9% hasta un volumen total de 20 ml. La dosis se administra como una sola infusión intravenosa continua durante 2 horas.

La administración subcutánea de BT061 se ilustra en la Tabla 9 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	-	-

Administración de BT061			
Dosis total de mAb BT061	Volumen de BT061 - 12,5 mg	Volumen de BT061 - 25 mg	Volumen de BT061 - 50 mg
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 en una sola inyección en embolada.

Los voluntarios fueron evaluados durante un período de 3 meses después de la inyección.

5 Para la 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 de la administración y el día 75.

10 Para la 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 de la administración.

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

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

Resultados

20 Se encontró que las dosis intravenosas y subcutáneas de hasta 60 mg eran generalmente bien toleradas.

Niveles de citoquinas

25 La inducción de la liberación de citoquinas es una complicación inmediata común que ocurre con el uso de anticuerpos terapéuticos que interactúan con células 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 auto-limitantes. Los efectos secundarios correlacionados con la inducción de citoquinas después de la administración de anticuerpos requieren la aplicación de fármacos adicionales, tales como el clorhidrato de difenhidramina antihistamínico y/o el agente antiinflamatorio ibuprofeno.

30 Con el uso de OKT3 (muromonab-CD3), un anticuerpo monoclonal terapéutico específico de CD3 murino, incluso, se han registrado fallecimientos, y los efectos secundarios graves limitan el uso clínico de este anticuerpo principalmente a los pacientes inmunodeprimidos.

35 Aunque los anticuerpos monoclonales específicos de CD3 que no se unen a FcR humanizados que se utilizan actualmente en la medicina clínica para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias (Teplizumab y TRX4) presentan una disminución de los efectos secundarios inducidos por la activación de células T y/o por la activación de las células que expresan el receptor de Fc después de la primera dosis, en comparación con anticuerpos específicos de CD3 que se unen a FcR, tales como OKT3, todavía se observa un cierto grado de activación de las células T y activación de células que expresan receptores de Fc que conduce a la liberación de citoquinas en general conectada con los efectos secundarios dependientes de citoquinas.

45 En el presente estudio se encontró sorprendentemente que la inducción de citoquinas observada en voluntarios sanos después de la aplicación intravenosa o subcutánea de BT061 era baja y transitoria, en comparación con los anticuerpos anti-CD3. La inducción de citoquinas generalmente aumentó con el aumento de dosis. Sin embargo, incluso a las más altas dosis de 40 a 60 mg, la inducción de citoquinas es mucho menor que la observada con los otros anticuerpos monoclonales que interactúan con las células T (Figura 8A y B).

50 Las medianas de las concentraciones máximas para las citoquinas observadas en cualquier punto horario dentro de las 96 horas después de la administración utilizando las dosis más altas (40 mg a 60 mg de BT061) se muestran en las Figuras 8 y 9.

La mediana de la concentración máxima para cada citoquina se calcula como sigue: La mediana de las

concentraciones más altas de citoquinas observada después de la administración del anticuerpo.

Las Figuras 8A y B muestran la liberación de TNF α e IL-6 observada en voluntarios sanos después de la administración intravenosa o subcutánea de BT061 en comparación con los liberados después de la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD3, Teplizumab y TRX4. Los valores normales de estas citoquinas se tomaron de Straub et al., (2007, Arthr. & Rheumat.). La Figura 9 muestra los niveles en plasma de IL-2 e IFN- γ después de la administración intravenosa o subcutánea de BT061. La mediana de los niveles máximos se calculó a partir del grupo de dosis de 40 y 60 mg medido en el plazo de 4 días después de la inyección de anticuerpos. Se calculó el límite superior de la normalidad (LSN) basándose en los niveles de citoquinas medidos en 39 sujetos sanos, en los que el LSN = valor medio + 2 x desviación típica.

En comparación con Teplizumab y TRX4 (tomados de los resultados de Herold et al., 2002, New Engl. J. Med y Keymeulen et al., 2005 New Engl. J. Med, respectivamente) BT061 indujo la liberación de citoquinas solo marginalmente y de manera transitoria. Los niveles de TNF- α e IL-6 se incrementaron ligeramente. La Figura 8 muestra que la mediana de los valores máximos de los niveles de citoquinas IL-6 y TNF α detectados en el plasma después de la aplicación de BT061 (40 y 60 mg) son más bajos que los observados después del tratamiento con los anticuerpos terapéuticos específicos de CD3 Teplizumab y TRX4.

Adicionalmente, en contraste con los MAb anti-CD3, BT061 no condujo a un aumento sustancial de los niveles de IFN- γ e IL-2 (Figura 9), como se informó para la aplicación de TRX4 (Keymeulen et al. 2005).

Linfocitos CD4+

Además, la prueba también incluyó un estudio del número de linfocitos CD4+ en las muestras de plasma recogidas.

Los resultados de la administración intravenosa se muestran a continuación en las Tablas 10, 11 y 12. La Tabla 13 muestra los resultados de la prueba con la administración subcutánea. Los resultados se muestran gráficamente en las Figuras 10 y 11.

TABLA 10 Recuentos de células CD4 + en voluntarios sanos individuales después de la administración de 3,5 μ g a 2,5 mg mediante administración intravenosa de BT061

HORA	DOSIS														
	30,5 µg	30,5 µg	30,5 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	
Antes de la dosis	998	878	1025	955	1209	666	1164	800	543	759	493	1240	891	782	
3h	1098	746	1020	708	1121	642	452	791	319	777	566	1058	392	461	
6h	922	710	1063	746	1091	590	353	627	314	805	381	1115	487	512	
12h	898	1183	942	1016	1667	1055	465	1065	477	955	643	1505	669	881	
24h	868	825	769	699	1043	517	399	606	347	687	439	1017	521	701	
36h	948	1035	1148	861	1549	836	559	1016	485	869	688	1542	976	1207	
48h	798	542	834	566	1119	711	384	644	413	730	509	1108	574	815	
72h	798	626	766	622	942	575	400	749	503	696	484	969	537	689	
96h	469	715	838	583	978	531	475	698	400	800	390	1026	499	785	
120h	736	643	843	604	942	472	401	650	511	830	488	1168	501	782	
144h	663	593	766	635	1200	510	372	573	432	705	394	953	518	745	
168h	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	

HORA	DOSIS													
	30,5 µg	30,5 µg	30,5 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
día 90														
Recuento de células mínimo (72 h a día 75)	469	378	625	583	863	472	348	573	400	645	390	953	499	689
Reducción máxima de células 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 11 Recuentos de células CD4+ en voluntarios sanos individuales después de la administración intravenosa de 2,5 mg a 20 mg de BT061

HORA	DOSIS							
	2,5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	10 mg	10 mg	10 mg	20 mg
Antes de la dosis	1080	1116	623	1160	840	835	1281	700
3h	488	313	108	111	104	143	132	63
6h	514	445	164	246	122	82	120	110
12h	699	763	346	573	297	285	366	199
24h	726	617	282	539	470	496	772	351
36h	985	1102	505	721	414	985	1417	677
48h	738	807	390	687	388	794	942	493
72h	711	736	419	700	440	830	919	504
96h	680	791	395	806	516	641	918	538
120h	649	669	438	750	543	674	1002	558
144h	662	723	407	676	448	549	942	579
168h	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 de células mínimo (72 h de día 75)	579	669	300	475	357	525	876	420
Reducción máxima de células CD4+ (%)	46,4	40,1	51,8	59,1	57,5	37,1	31,6	40,0

- 5 En particular, la Figura 10 muestra los recuentos de células CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una sola dosis intravenosa de BT061. Los puntos de datos representan los valores medios de los 3 pacientes en cada grupo de dosis. Las líneas de puntos indican el límite superior de la normalidad (LSN) y el límite inferior de la normalidad (LIN). El LSN y el LIN (valor medio + (o -) la desviación típica) fueron calculados basándose en los

recuentos de células de voluntarios sanos, como 443 células CD4 por (límite inferior de la normalidad; LIN) y 1324 células CD4 por μ l (límite superior de la normalidad; LSN).

La Figura 11 muestra los recuentos de células CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una sola dosis subcutánea de BT061. Al igual que con la Figura 10, los puntos de datos representan los valores medios de los 3 pacientes en cada grupo de dosis. Las líneas de puntos indican el límite superior de la normalidad (LSN) y el límite inferior de la normalidad (LIN).

TABLA 12 Recuentos de células CD4 + en voluntarios sanos individuales después de la administración intravenosa de 20 mg a 60 mg de BT061

TIEMPO	DOSIFICACIÓN							
	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
Antes de la dosis	843	1233	1152	789	976	900	989	2539
3h	69	186	72	137	48	63	55	71
6h	83	245	87	147	69	81	78	109
12h	214	469	262	221	212	360	276	182
24h	266	490	208	222	292	315	285	313
36h	562	1019	489	475		707	561	569
48h	359	792	460	455	703	413	500	565
72h	392	909	591	545	625	709	688	806
96h	468	755	567	545	733	717	737	774
120h	391	795	578	517	636	718	685	646
144h	347	897	548	523	760	714	732	606
168h	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 de células mínimo (72 h a día 75)	331	755	439	440	570	466	546	423
Reducción máxima de células CD4+ (%)	60,7	38,8	61,9	44,2	41,6	48,2	44,8	83,3

TABLA 13 Recuentos de células CD4+ en voluntarios sanos individuales después de la aplicación subcutánea de BT061

TIEMPO	DOSIFICACIÓN														
	5 mg	5 mg	5 mg	10 mg	10 mg	10 mg	20 mg	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
Antes de la dosis	1053	553	663	962	697	891	863	692	621	689	946	840	1114	719	1345
24h	858	402	707	640	623	615	537	535	500	177	326	379	580	470	333
36h	1131	916	946	1232	955	1019	762	666	944	268	463	870	503	527	487
48h	625	526	550	610	757	537	628	599	587	354	586	686	739	735	551
72h	814	661	580	589	709	610	700	587	596	299	719	734	860	813	539

TIEMPO	DOSIFICACIÓN														
96h	799	582	694	666	732	579	643	665	589	283	605	653	852	743	608
120h	823	566	712	653	673	659	642	528	633	323	835	629	873	639	555
144h	890	543	809	744	767	784	603	620	627	239	626	568	801	924	591
168h	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 de células mínimo (72 h a día 75)	719	450	437	589	653	516	603	469	531	239	515	541	568	639	505
Reducción máxima de células 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 de CD4 conocidos en la técnica (tales como los revisados en Strand et al., 2007) logran la inmunosupresión a través del empobrecimiento en linfocitos CD4-positivos. El inconveniente de estos anticuerpos es que los individuos tratados se vuelven inmuno-comprometidos, y son susceptibles a otras infecciones.

Por el contrario este estudio mostró que BT061 no inducía un empobrecimiento masivo de larga duración de las células CD4 positivas. Sin embargo, se observó una disminución transitoria de los linfocitos CD4-positivos con una recuperación a valores normales en la sangre periférica en el plazo de las 72 h después de la administración del anticuerpo.

En el punto horario de 72 h después de la aplicación de BT061, los recuentos de células CD4 en cuatro voluntarios de los grupos con dosis intravenosas mostraron niveles de CD4 que estaban por debajo de estos valores normales de la siguiente manera: 1 voluntario de la dosis intravenosa de 100 µg: 400 células CD4 por µl; 1 de voluntario del grupo de 5 mg: 419 células CD4 por µl; 1 voluntario del grupo de 10 mg: 440 células CD4 por µl; y 1 voluntario del grupo de 20 mg: 392 células CD4 por µl.

Sin embargo, estos valores estuvieron sólo ligeramente por debajo de los valores normales. El recuento de células CD4 en los 26 voluntarios restantes de los grupos de dosis intravenosas estaban dentro de los valores normales 72 horas después de la administración de BT061.

En los grupos de dosis subcutáneas, después de 72 h, sólo uno de cada 15 voluntarios mostró recuentos de células CD4 por debajo de los valores normales.

En conclusión, a diferencia del empobrecimiento de los mA b específicos de CD4, incluso a dosis altas BT061 solamente indujo una disminución transitoria de células CD4-positivas, seguido de una recuperación general. De la disminución transitoria y la recuperación rápida general se concluye que se ha producido una redistribución transitoria de las células CD4-positivas, en lugar del empobrecimiento en estas células.

Por lo tanto los datos apoyan el uso de BT061 como un agente para su administración a una pluralidad de dosis durante un período de tiempo prolongado.

Ejemplo 8 - Prueba clínica de *BT061* en pacientes con *psoriasis crónica moderada a severa* (con dosis subcutáneas

de referencia)

La capacidad de la Hb-F5 BT061 para tratar una enfermedad autoinmunitaria está siendo sometida a ensayo en 56 pacientes que sufren psoriasis crónica moderada a severa. La prueba consta de un solo estudio a escala de dosis para evaluar la seguridad y eficacia de hB-F5.

Las condiciones de la prueba son las siguientes:

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) van a recibir el anticuerpo o placebo por medio de administración intravenosa y dos grupos de dosis (grupos de dosis VI y VII) van a recibir el anticuerpo o placebo a través de la 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 intravenoso. 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.

Para la administración intravenosa, el anticuerpo/placebo se debe infundir en la vena del antebrazo de acuerdo con procedimientos aceptados médicamente. En el presente caso el volumen total se administra como una sola infusión intravenosa continua durante un período de 2 horas a través de 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.

Para la administración subcutánea el anticuerpo debe ser administrado en forma de una única inyección subcutánea. El mismo procedimiento se aplica para el placebo.

El nivel de psoriasis exhibido por cada paciente se registra utilizando la puntuación del Índice de Severidad del Área de Psoriasis (PASI). Como se describió anteriormente, las puntuaciones PASI superiores corresponden a un nivel más alto de psoriasis. Los pacientes inscritos en la prueba tienen una psoriasis crónica moderada a severa, es decir, una puntuación PASI de 10 o superior.

La puntuación PASI del paciente se evalúa antes de la prueba para proporcionar un valor "en el momento inicial" en el día 0, y en varias ocasiones durante la prueba en los días 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56 y 75.

Grupo de dosis I

Seis pacientes del grupo de dosis I recibieron una sola 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 (ASC) para cada paciente se muestran en la Tabla 14. El área de superficie corporal se calculó de acuerdo con la fórmula de Mosteller descrita en la presente memoria.

Las puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis I se muestran en la Tabla 14 junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación PASI desde el momento inicial.

Grupo de dosis II

Seis pacientes del grupo de dosis II recibieron una única inyección intravenosa de 2,5 mg de BT061 mientras que dos pacientes del grupo de dosis 2 recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (ASC) para cada paciente se muestran en la Tabla 15.

Las puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis II se muestran en la Tabla 15 junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación PASI desde el momento inicial.

Grupo de dosis III

Seis pacientes del grupo de dosis III recibieron una única inyección intravenosa de 5,0 mg de BT061 mientras que dos pacientes del grupo de dosis III recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (ASC) para cada paciente se muestran en la Tabla 15B.

Las puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis III se muestran en la Tabla 15B junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación PASI desde el momento inicial.

Grupo de dosis IV

Seis pacientes del grupo de dosis IV recibieron una única inyección intravenosa de 10,0 mg de BT061 mientras que dos pacientes del grupo de dosis IV recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área de superficie corporal (ASC) de los pacientes se muestran en la Tabla 15C.

- 5 Las puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis IV se muestran en la Tabla 15C junto con el porcentaje de mejoría en la puntuación PASI desde el momento inicial.

TABLA 14 - Puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis I (dosis intravenosa 0,5 mg) durante el curso de la prueba

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [µg/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 PASI (cambio relativo/mejoría con respecto al momento inicial)								
Momento 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%)

TABLA 15A - Puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis II (dosis intravenosa 2,5 mg) durante el curso de la prueba

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [mg/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
PASI Puntuación (cambio relativo/mejoría con respecto al momento inicial)								
Momento 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%)	8,0 (41%)	6,5 (52%)

ES 2 610 327 T3

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
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 15B - Puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis III (dosis intravenosa 5,0 mg) durante el curso de prueba

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [mg/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 PASI (cambio relativo/mejoría con respecto al momento inicial)								
Momento 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 15C - Puntuaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis IV (dosis intravenosa 10,0 mg) durante el curso de la prueba

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Dosis Rel. [mg/kg]/[mg/m ²]	173,0 /	142,9 /	102,8 /	115,6 /	119,6 /	108,8 /	75,9 /	106,6 /
PASI Puntuación (cambio relativo/mejoría con respecto al momento inicial)								
Momento 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	11,0	22,5	19,0	17,3			

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
	(22%)	(0%)	(+4%)	(14%)	(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								

Adicionalmente, las puntuaciones PASI frente al tiempo para los pacientes individuales se muestran en forma de gráfico en las Figuras 12A a 12H y en las Figuras 13A a 13H. Las gráficas mostradas en las Figuras 12A a 12H representan puntuaciones PASI de los pacientes del grupo de dosis I, mientras que las gráficas mostradas en las Figuras 13A a 13H representan puntuaciones PASI para los pacientes del grupo de dosis II.

Como se puede observar a partir de los resultados mostrados en las Tablas 14 y 15, 75% de todos los pacientes del grupo de dosis I y del grupo de dosis II muestran una clara mejoría en sus puntuaciones PASI, es decir, al menos una mejoría de 40% sobre el valor en el momento inicial, después de una sola dosis. Cabe señalar que 25% de los pacientes en el grupo de dosis I y el grupo de dosis II recibió un placebo.

De hecho, en ambos grupos de dosis 50% de los pacientes mostró una mejoría de al menos 50% en sus puntuaciones PASI, mostrando un paciente en el grupo de dosis II una mejoría de 88% en la puntuación PASI el día 56, (es decir, el paciente 3 en la Tabla 15). Por otra parte, el efecto terapéutico es de larga duración, incluso a estas dosis bajas, observándose aún mejorías en muchos pacientes al final de la prueba, 75 días después de la administración.

Los pacientes del grupo de dosis III también muestran una mejoría en su puntuación PASI, mostrando seis de los ocho pacientes una mejoría mayor de 20% y mostrando dos de esos seis una mejoría mayor de 30% después del tratamiento. Sin embargo, la mejoría no fue tan significativa como la observada en los pacientes del grupo de dosis I y el grupo de dosis II que recibieron una dosis más baja de anticuerpo. También se observa cierta eficacia en los pacientes del grupo de dosis IV. En particular, los pacientes 1, 4, 5 y 8 de este grupo de dosis (como se muestra en la Tabla 15C) muestran una clara mejoría en sus puntuaciones PASI, aunque esto está limitado en comparación con los pacientes de los grupos de dosis I a III.

El número de pacientes que muestran una mejoría de al menos 40%, 50%, 60% y 75% en la puntuación PASI se muestra en la Tabla 16.

TABLA 16 - Resumen de los resultados de los Grupos de Dosis I a III

	Grupo de dosis I* 0,5 mg BT-061	Grupo de dosis II* 2,5 mg BT-061	Grupo de dosis III* 5,0 mg BT061
Mejoría ≥ 40%	6/8 pacientes	6/8 pacientes	1/ 8 pacientes
Mejoría ≥ 50%	4/8 pacientes	4/8 pacientes	0/ 8 pacientes
Mejoría ≥ 60%	1/8 pacientes	2/8 pacientes	0/ 8 pacientes
Mejoría ≥ 75%	0/8 pacientes	1/8 pacientes	0/8 pacientes

* Por grupo de dosis: 75% de los pacientes recibieron BT061, 25% de los pacientes recibieron placebo

Las Figuras 14 A y 14 B proporcionan evidencia fotográfica de la mejoría en el nivel de la psoriasis antes y después del tratamiento. La Figura 14 A muestra un área de psoriasis en la piel de un paciente del grupo de dosis II antes de la administración. La Figura 14 B muestra la misma área de psoriasis 28 días después de la administración. Las áreas de mejoría se marcan en la Figura 14 B con recuadros de color negro.

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

Los resultados de este estudio, combinados con los descritos anteriormente en el Ejemplo 7, que muestran que incluso dosis altas de anticuerpo son generalmente bien toleradas en los seres humanos, demuestran la capacidad de las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención para proporcionar un tratamiento

eficaz a largo plazo de las enfermedades autoinmunitarias con los regímenes de dosificación descritos en la presente memoria.

Ejemplo 9 - Prueba clínica de BT061 en pacientes con artritis reumatoide (con dosis subcutáneas de referencia)

Se está sometiendo a ensayo la capacidad de BT061 para tratar la artritis reumatoide en pacientes que sufren esta enfermedad. La prueba comprende un estudio de dosis múltiples que incluye 96 pacientes, divididos en 12 grupos. En cada grupo, dos pacientes reciben un placebo, mientras que 6 pacientes reciben BT061. Los pacientes reciben dosis una vez por semana durante un período de 6 semanas.

Los pacientes se dividen en los que recibieron el anticuerpo por vía subcutánea y los que recibieron el anticuerpo por vía intravenosa. Los grupos de dosis subcutáneas son: 1,25 mg, 6,25 mg, 12,5 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg y 100 mg. Los grupos de dosis intravenosas 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 están numerados como 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108. En el grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg los pacientes están numerados 201-208. En el grupo de dosis subcutánea de 12,5 mg los pacientes están numerados 301-308. En el grupo de dosis subcutánea de 25 mg los pacientes están numerados 401-408. En el grupo de dosis subcutánea de 50 mg los pacientes están numerados 501-508. En el grupo de dosis intravenosa de 6,25 mg los pacientes están numerados 601-608.

El procedimiento de administración intravenosa y subcutánea fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 8 para la prueba de psoriasis.

El nivel de la artritis reumatoide se registra semanalmente mediante la evaluación de los parámetros del ACR y, en particular, el estudio del número de articulaciones dolorosas e inflamadas y siguiendo los niveles de proteína C-reactiva (CRP) y la velocidad de sedimentación globular (VSG). Estos parámetros son evaluados antes de la prueba para proporcionar un valor en "el momento inicial" en el día 0, y en varias ocasiones durante el período de prueba y, posteriormente, a los 8, 22 y 43 días después de finalizar el período de administración (es decir, seguimiento (FU) el día 8, FU el día 22 y FU el día 43).

Las siguientes Tablas proporcionan los datos obtenidos a partir de la prueba. Específicamente las Tablas 17 a 22 proporcionan el número de articulaciones dolorosas e inflamadas en el transcurso de la prueba.

Tabla 17 - Recuentos de articulaciones dolorosas e inflamadas del grupo de dosis subcutánea de 1,25 mg

Pacientes - Grupo dosis SC 1,25 mg	Articulaciones (núm)	Visitas									
		Visita de Escrutinio	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	dolorida	34	34	32	-	-	-	-	-	-	0
	inflamada	10	10	18	-	-	-	-	-	-	0
102	dolorida	25	26	22	16	16	24	24	30	28	29
	inflamada	12	13	9	10	9	15	12	9	18	15
103	dolorida	11	12	12	9	8	7	7	30	28	3
	inflamada	7	8	8	6	6	6	6	9	18	2
104	dolorida	17	10	4	3	20	17	9	5	5	0
	inflamada	8	6	0	0	0	8	2	0	0	0
105	dolorida	24	23	22	23	35	32	35	32	34	33
	inflamada	14	14	14	17	18	18	19	19	20	20
106	dolorida	20	21	20	13	8	9	13	12	11	11
	inflamada	9	12	9	10	5	5	6	5	5	7
107	dolorida	14	14	11	10	16	14	14	14	11	11
	inflamada	8	9	8	8	5	5	5	6	6	6
108	dolorida	11	12	10	10	7	4	8	8	2	13
	inflamada	10	11	7	11	10	9	11	7	6	8

Tabla 18 - Recuentos de articulaciones doloridas e inflamadas del grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg

Pacientes - Grupo dosis SC 6,25 mg	Articulaciones (num)	Visitas									
		Visita Escrutinio	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	dolorida	16	17	15	14	12	15	13	11	9	9
	inflamada	9	10	7	6	6	5	6	5	6	6
202	dolorida	14	10	10	10	8	8	8	8	9	13
	inflamada	10	8	6	6	4	4	4	4	4	6
203	dolorida	15	14	10	8	10	10	8	7	5	5
	inflamada	11	11	10	9	9	10	7	7	6	7
204	dolorida	19	22	16	0	0	10	2	10	11	0
	inflamada	10	10	5	0	0	4	0	0	10	0
205	dolorida	21	21	0	0	14	30	10	37	-	12
	inflamada	9	9	0	0	14	16	6	25	-	8
206	dolorida	16	16	15	13	13	17	19	-	-	5
	inflamada	10	12	12	10	14	11	11	-	-	4
207	dolorida	17	28	28	11	9	15	17	14	18	22
	inflamada	11	12	13	7	10	11	8	10	11	10
208	dolorida	13	12	9	8	9	11	10	-	-	12
	inflamada	10	10	9	9	10	10	9	-	-	8

Tabla 19 - Recuentos de articulaciones doloridas e inflamadas del grupo de dosis subcutánea de 12,5 mg

Pacientes - Grupo dosis SC 12,5 mg	Articulaciones (num)	Visitas									
		Visita Escrutinio	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	dolorida	18	18	16	16	16	16	16	20	14	14
	inflamada	8	8	8	8	8	8	8	6	6	6
302	dolorida	36	36	34	35	31	-	-	-	-	30
	inflamada	20	20	19	19	17	-	-	-	-	18
303	dolorida	20	19	19	16	15	14	16	18	-	19
	inflamada	10	11	12	13	13	14	13	14	-	14
304	dolorida	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8
	inflamada	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4
305	dolorida	16	16	14	14	13	13	13	12	10	10
	inflamada	8	8	8	8	6	6	6	6	4	4
306	dolorida	27	27	18	18	12	23	28	-	-	29
	inflamada	14	14	20	11	16	13	17	-	-	24
307	dolorida	25	23	23	17	17	17	17	15	13	11
	inflamada	8	8	8	8	8	8	8	6	6	4
308	dolorida	20	20	18	8	8	8	8	8	8	4
	inflamada	12	12	8	6	6	5	6	6	6	4

Tabla 20 - Recuentos de articulaciones doloridas e inflamadas del grupo de dosis subcutánea de 25 mg

Pacientes - Grupo dosis SC 25 mg	Articulaciones (num)	Visitas									
		Visita Escrutinio	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	dolorida	16	17	19	22	13	13	12	11	9	6
	inflamada	10	11	8	9	12	11	8	5	8	5
402	dolorida	23	21	10	10	10	9	8	7	6	7
	inflamada	8	11	5	6	6	5	4	3	3	3
403	dolorida	10	10	10	8	8	10	10	7	6	8
	inflamada	8	8	8	6	5	5	5	5	5	5
404	dolorida	17	16	15	15	13	14	14	16		
	inflamada	9	11	10	6	7	7	7	7		
405	dolorida	10	10	8	8	8	8	8	10	-	10
	inflamada	6	6	4	4	4	4	4	6	-	6
406	dolorida	11	11	11	11	11	12	8	8	6	8
	inflamada	6	6	6	6	5	5	3	3	2	4
407	dolorida	13	20	16	18	4	2	0	4	14	
	inflamada	7	10	6	8	0	0	0	0	8	
408	dolorida	11	11	8	8	7	5	4	4	-	8
	inflamada	9	9	5	5	4	6	6	3	-	6

Tabla 21 - Recuentos de articulaciones doloridas e inflamadas del grupo de dosis subcutánea de 50 mg

Pacientes - Grupo dosis SC 50 mg	Articulaciones (num)	Visitas									
		Visita Escrutinio	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	dolorida	10	10	12	15	12	15	16	-	-	15
	inflamada	10	10	10	10	10	13	13	-	-	13
502	dolorida	14	15	11	16	12	7	8			
	inflamada	5	9	10	10	7	4	5			
503	dolorida	13	13	11	7	7	6	6	5	5	
	inflamada	8	8	8	6	6	3	3	2	3	
504	dolorida	11	12	10	8	7	11	11	13		
	inflamada	8	8	8	6	7	7	7	8		
505	dolorida	12	13	8	2	1					
	inflamada	7	7	5	0	0					
506	dolorida	36	48	32							
	inflamada	8	8	4							
507	dolorida										
	inflamada										
508	dolorida										
	inflamada										

Tabla 22 - Recuentos de articulaciones doloridas e inflamadas del grupo de dosis intravenosa de 6,25 mg

Pacientes - grupo dosis IV 6,25 mg	Articulaciones (num.)	Visitas									
		Visita Escrutinio	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	dolorida	23	20	24	39	33	26	31			
	inflamada	13	15	15	25	26	20	21			
602	dolorida	41	43	33	15	12	30	17	19	14	
	inflamada	13	12	8	10	10	6	5	5	7	
603	dolorida	26	22	28	22	24	24				
	inflamada	10	4	8	4	4	6				
604	dolorida	28	26	31	27	14	10	11	7	9	
	inflamada	8	8	8	10	6	2	2	3	1	
605	dolorida	34	38	38	36						
	inflamada	22	18	22	20						
606	dolorida	12	14								
	inflamada	8	9								
607	dolorida	27	27								
	inflamada	17	19								
608	dolorida										
	inflamada										

La Figura 15 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 logran una mejoría de al menos 20% de los parámetros relevantes de la ACR en el transcurso de la prueba, y el porcentaje de pacientes que logran al menos una respuesta ACR20 en la semana 7.

En particular, se puede observar que 50% de los pacientes del grupo de dosis subcutánea de 25 mg (es decir, 4 de los 8 pacientes en los que 2 de los pacientes reciben un placebo) alcanzaron al menos una mejoría de 20% de los parámetros relevantes de la ACR en la semana 6. Estas cifras aumentaron a 5 de los 8 pacientes en la semana 7, es decir, 5 de los 8 pacientes lograron al menos ACR20. Un paciente en este grupo de dosis logró una mejoría de más de 50% de los parámetros relevantes de la ACR en las semanas 5 y 6 (conjunto completo de datos no mostrado).

También se obtuvieron resultados positivos por los pacientes de otros grupos de dosis. Un paciente en el grupo de dosis subcutánea de 6,25 mg alcanzó mejoría de al menos 50% de los parámetros relevantes de la ACR en la semana 4, mientras que otra alcanzó mejora de al menos 70% de los parámetros relevantes de la ACR en la semana 3 (conjunto completo de datos no mostrado).

Las Figuras 16 A y 16 B muestran los resultados para el número de articulaciones doloridas e inflamadas presentadas por los pacientes del grupo de dosis subcutánea de 25 mg de BT061 durante un período de seis semanas. Varios de los pacientes mostraron una reducción en el número de articulaciones dolorosas e inflamadas a lo largo del período de tratamiento. Los resultados para un paciente respondedor y un paciente no respondedor de este grupo de dosis se muestran en las Figuras 17A y 17B, respectivamente. La respuesta muestra una mejoría significativa en el número de articulaciones dolorosas e inflamadas y en los niveles de dolor.

También se observa una reducción en el número de articulaciones doloridas e inflamadas en los pacientes de los otros grupos de dosis. Las figuras 18A, 18B, 19A y 19B muestran el número de articulaciones doloridas en los grupos de dosis subcutánea de 1,25 mg, subcutánea de 6,25 mg, subcutánea de 50 mg e intravenosa de 6,25 mg, respectivamente, en el transcurso de la prueba y en las semanas siguientes.

Estos resultados demuestran la eficacia del agente en el tratamiento de la artritis reumatoide dentro de los intervalos de dosis descritos en la presente memoria.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> BiotestAG
 <120> Agente para el tratamiento de enfermedades
 <130> 314.790.WO/JND/CJS
 10 <160> 18
 <170> PatentIn Versión 3.3
 15 <210> 1
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Dominio V de la cadena H del anticuerpo humanizado hB-F5H37L
 <400> 1
 Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
 20 25 30
 Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 25 115 120
 <210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio V de la cadena K del anticuerpo humanizado hB-F5L4M

ES 2 610 327 T3

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

5 <211> 550

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 3

gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcatcttcc tgcccgtgct gggcctccca 60

tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg aggggtgttt 120

cactttgctg ttctcttttg tctccagggtg tctgtcaga ggaacagctt gtggagtctg 180

ggggaggctt ggtgaaaccc ggaggttctc tgaggctctc ctgtgcagcc tcgggtttca 240

gtttcagtga ctgccgatg tactgggttc gccaggctcc agggaagggg ctggagtgga 300

ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag tctgtgaggg 360

gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggt ctatctgcag atgaacagct 420

tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgcttc ctattatagg tacgacgtgg 480

gggcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca ggtaagaatg 540

gccaagcttg 550

15 <210> 4

<211> 498
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Parte del plásmido que codifica el dominio V de la cadena K del anticuerpo hB-F5 humanizado

<400> 4
 ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta aatgacatat 60
 ttcaattata tctgagacag cgtgtataag ttatgtata atcattgtcc attcctgact 120
 acagggtcct acggggacat cgtgatgacc cagtctccag actccctggc tgtgtctctg 180
 ggcgagaggg ccacatcaa ctgcagggcc agcaaaagtg tcagtacatc tggctacagt 240
 tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgctcat ttaccttgca 300
 tccatcctag aatctggggt ccctgaccga ttcagtggca gcgggtctgg gacagatttc 360
 actctacca tcagcagcct gcaggctgaa gatgtggcag ttattactg tcagcacagt 420
 agggaacttc cgtggacgtt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacg tgagtagaat 480

10 ttaaatttta agcttctt 498

<210> 5
 <211> 372
 <212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 5
 caggaatacc ttgtggagac cgggggaggc ttggtgaggc ctggaaattc tctgaaactc 60
 tcctgtgtca cctcgggttt cagtttcagt gactgccgga tgtactggct tcgccagcct 120
 ccaggaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca 180
 aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actattcaa gagatgattc aaaaagcagt 240
 gtctatctgc agatgagcag attgagagag gaagacactg ccacttatta ttgtagtgcc 300
 tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg ttgtcttact ggggccaagg gactctggtc 360
 actgtctctg ca 372

20 <210> 6
 <211> 383
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <400> 6

gacattgtgc tgacacagtc tcctttctcc ttagtgtgat ctctggggca gagggccacc 60
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac 120
caacagatcc caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccat cctagaatct 180
gggggtccctg gcagggtcag tggcagtggtg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatc aaacgggctg atgtgcacc aactgtatcc 360
atctccac catccagtga gca 383

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<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

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

ES 2 610 327 T3

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

5 <210> 9
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <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

15 <210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11
<211> 32
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<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

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 13
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
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

<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

<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

<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

<210> 17
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Dominio V de la cadena H del anticuerpo hB-F5H37V humanizado

<400> 17
 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

10

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

15

<210> 18
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Dominio V de la cadena K del anticuerpo HB-F5L4L humanizado
 <400> 18

ES 2 610 327 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 su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1,
 5 en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes o cada seis semanas, y en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 20 a 60 mg.
 10
2. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición va a ser administrada a un sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 20 mg, 25 mg, o 60 mg.
3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1,
 15 en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes o cada seis semanas, y en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado entre: (i) 8 y 40 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto; o (ii) 0,2 y 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente 1 mg/kg.
 20
4. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1,
 25 en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto de cada semana a cada 31 días, y en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de: (i) 20 a 60 mg; (ii) 8 a 40 mg/m² de área de superficie corporal del sujeto; o (iii) 0,2 a 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg.
 30
5. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado está presente a una concentración de 10 µg/ml a 150 µg/ml.
 35
6. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, lupus eritematoso generalizado y enfermedades relacionadas con trasplantes tales como injerto contra anfitrión o cuestiones generales de tolerancia de órganos.
 40
7. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad es psoriasis o artritis reumatoide.
 45
8. El uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes de calendario o cada seis semanas, en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de 20 a 60 mg, y en el donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1.
 50
9. El uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto cada semana, cada cuatro semanas, cada mes de calendario o cada seis semanas, en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo humanizado entre: (i) 8 y 40 mg/m² de área de superficie corporal; o (ii) 0,2 y 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente 1 mg/kg,
 55 en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H que tiene el SEQ ID NO: 1, un dominio V de cadena L que tiene el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1.
 60
10. El uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado capaz de activar las células T reguladoras CD4+CD25+ para la

5 fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en donde la composición va a ser administrada por vía intravenosa a un sujeto de cada semana a cada 31 días, en donde la composición va a ser administrada al sujeto a una dosis del anticuerpo anti-CD4 humanizado de: (i) 20 a 60 mg; (ii) 8 a 40 mg/m² de área de superficie corporal; o (iii) 0,2 a 1 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de 1 mg/kg, y en donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende un dominio V de la cadena H definido en el SEQ ID NO: 1, un dominio V de la cadena L definido en el SEQ ID NO: 2, y un dominio constante de IgG1.

10 11. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 10, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, lupus eritematoso generalizado y enfermedades relacionadas con trasplantes tales como injerto contra anfitrión o cuestiones de tolerancia general de órganos, y es preferiblemente psoriasis o artritis reumatoide.

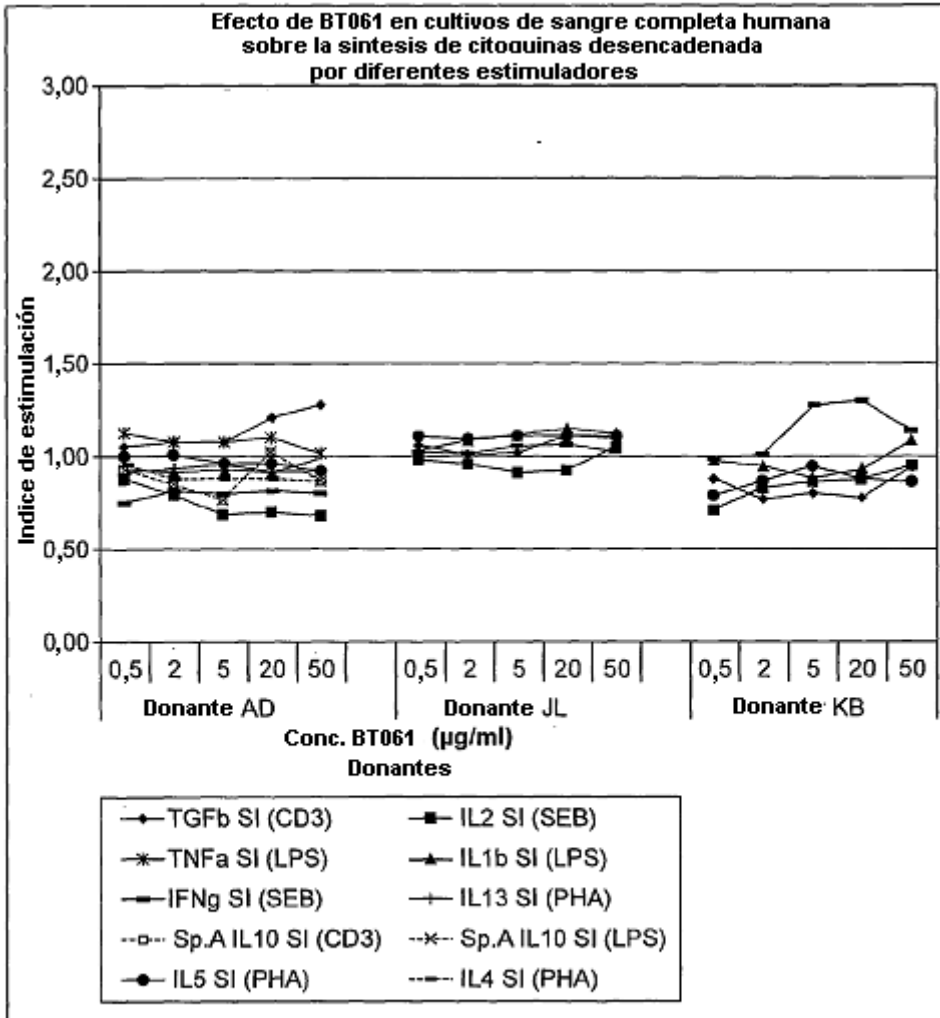


FIG. 1

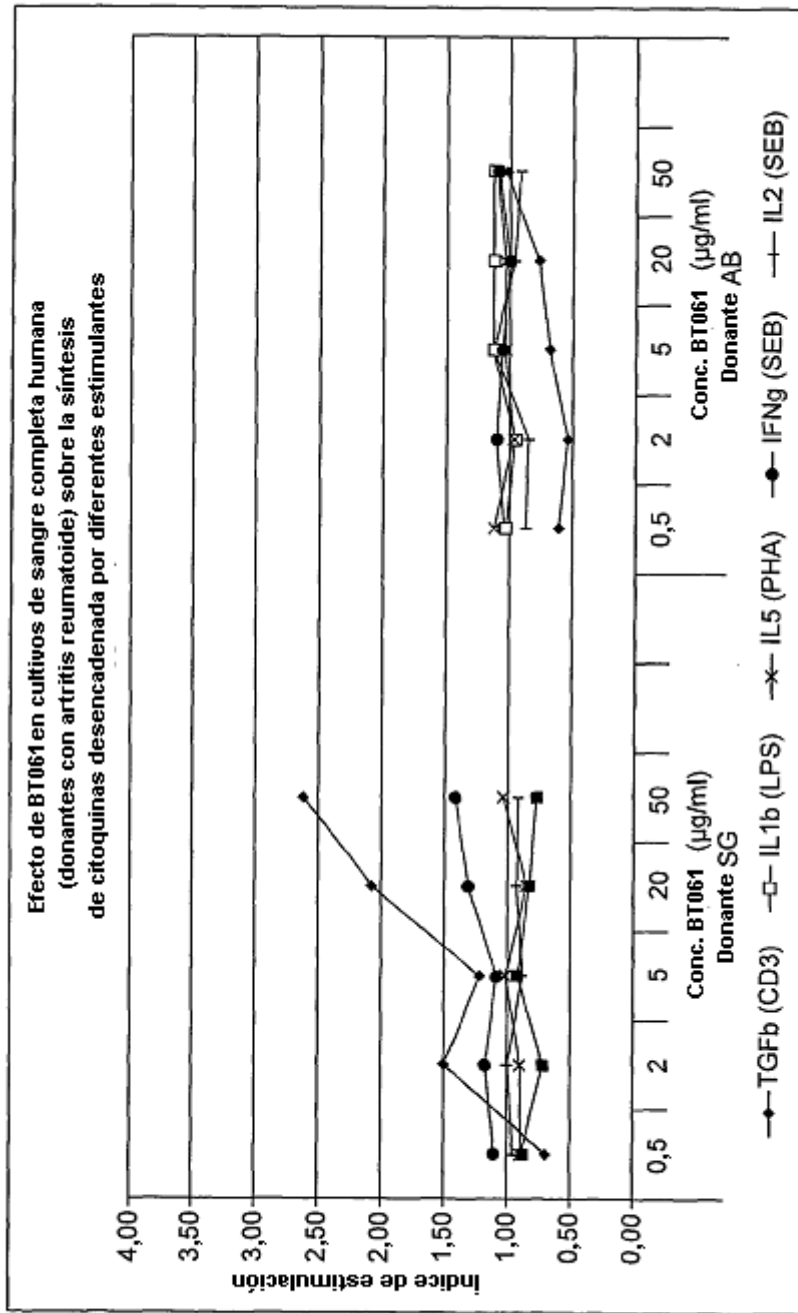


FIG. 2

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 GGC 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

GA GGA GCT CCA GAC AAT GTC TGT CTC CTT CCT CAT CT? CCT GCC CGT GCT GGG CCT

CCC ATG GGG TCA GTG TCA GGG AGA TGC CGT ATT CAC AGC AGC ATT CAC AGA CTG AGG

GGT GTT TCA CTT TGC TGT TTC CTT TTG TCT CCA GGT GTC CTG TCA GAG GAA CAG CTT
E E Q L

GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG AAA CCC GGA GGT TCT CTG AGG CTC TCC TGT GCA
V E S G G G L V K P G G S L R L S C A

GCC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGG
A S G F S F S D C R M Y W V R Q A P G

AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT TAT GGA GCA AAT
K G L E W I G V I S V K S E N Y G A N

TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG
Y A E S V R G R F T I S R D D S K N T

GTC TAT CTG CAG ATG AAC AGC TTG AAG ACC GAA GAC ACT GCC GTT TAT TAT TGT AGT
V Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C...S...

GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT
A S Y Y R Y D V G A W F A Y W G Q G T

CTG GTC ACT GTC TCT TCA GGT AAG AAT GGC CAA GCT TG
L V T V S S

FIGURA 5

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 GGC 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

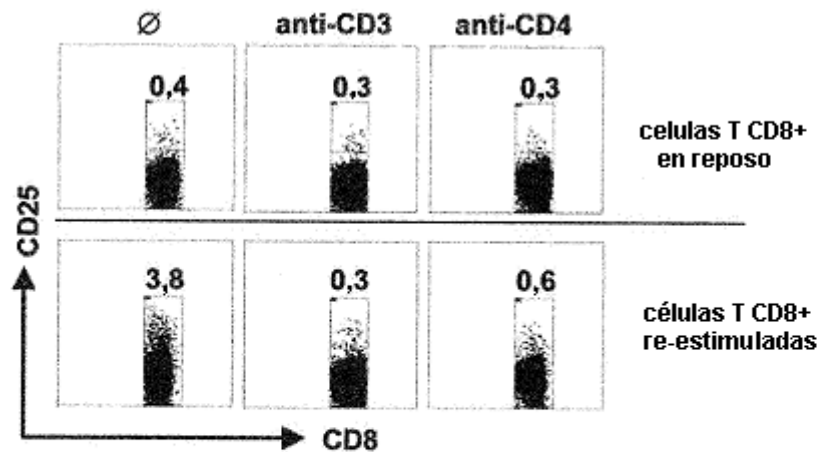


FIGURA 7

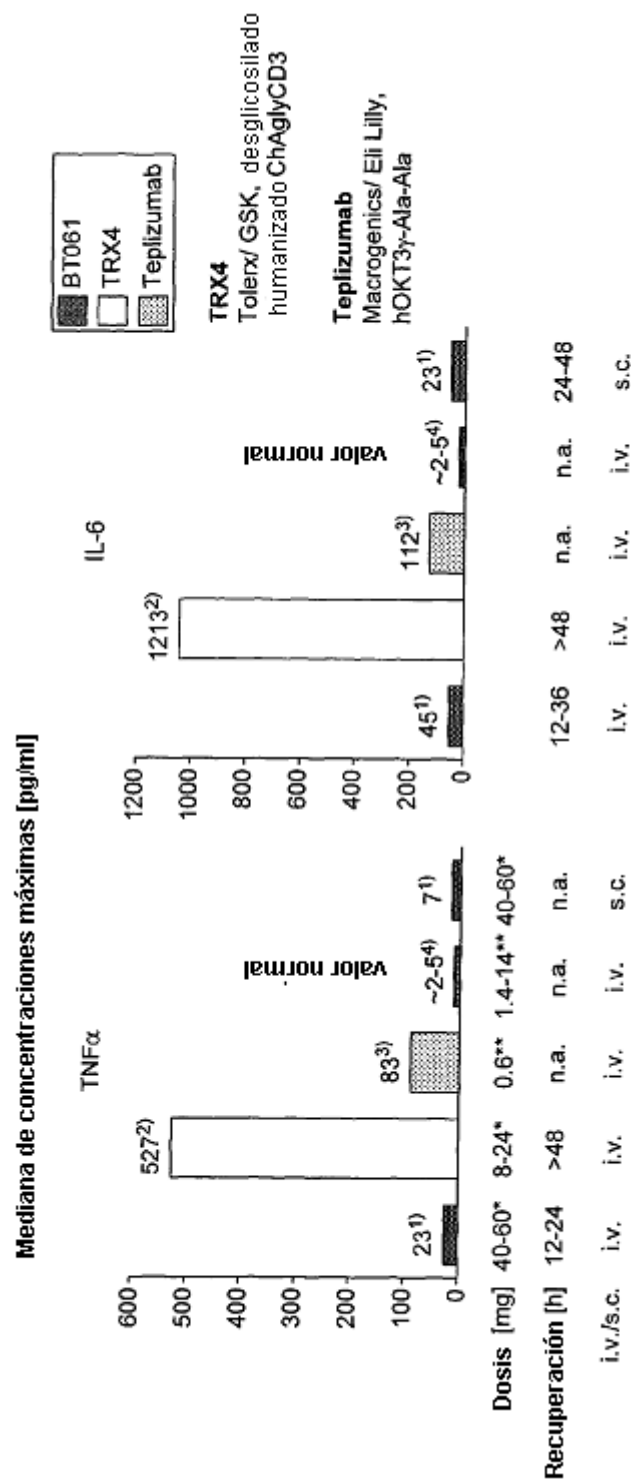


FIG. 8B

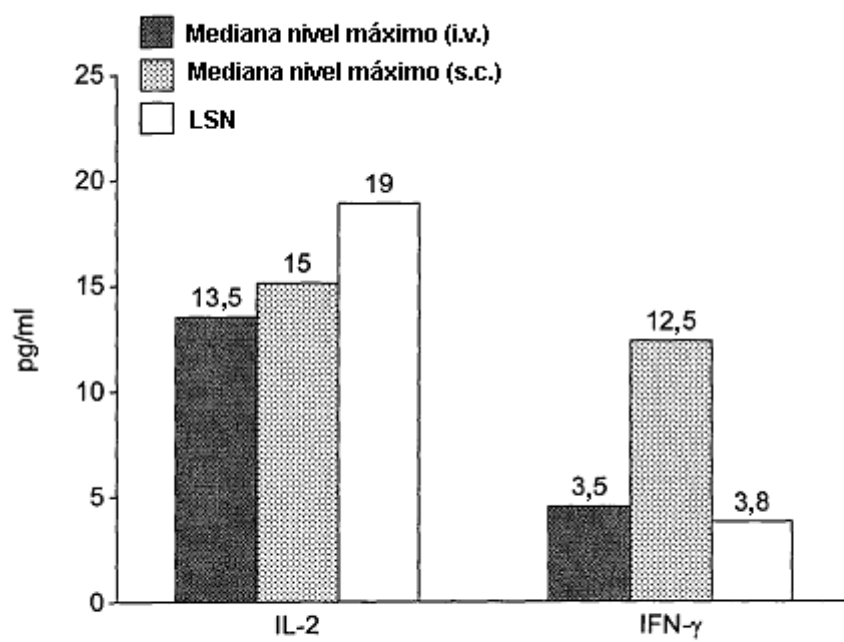


FIG. 9

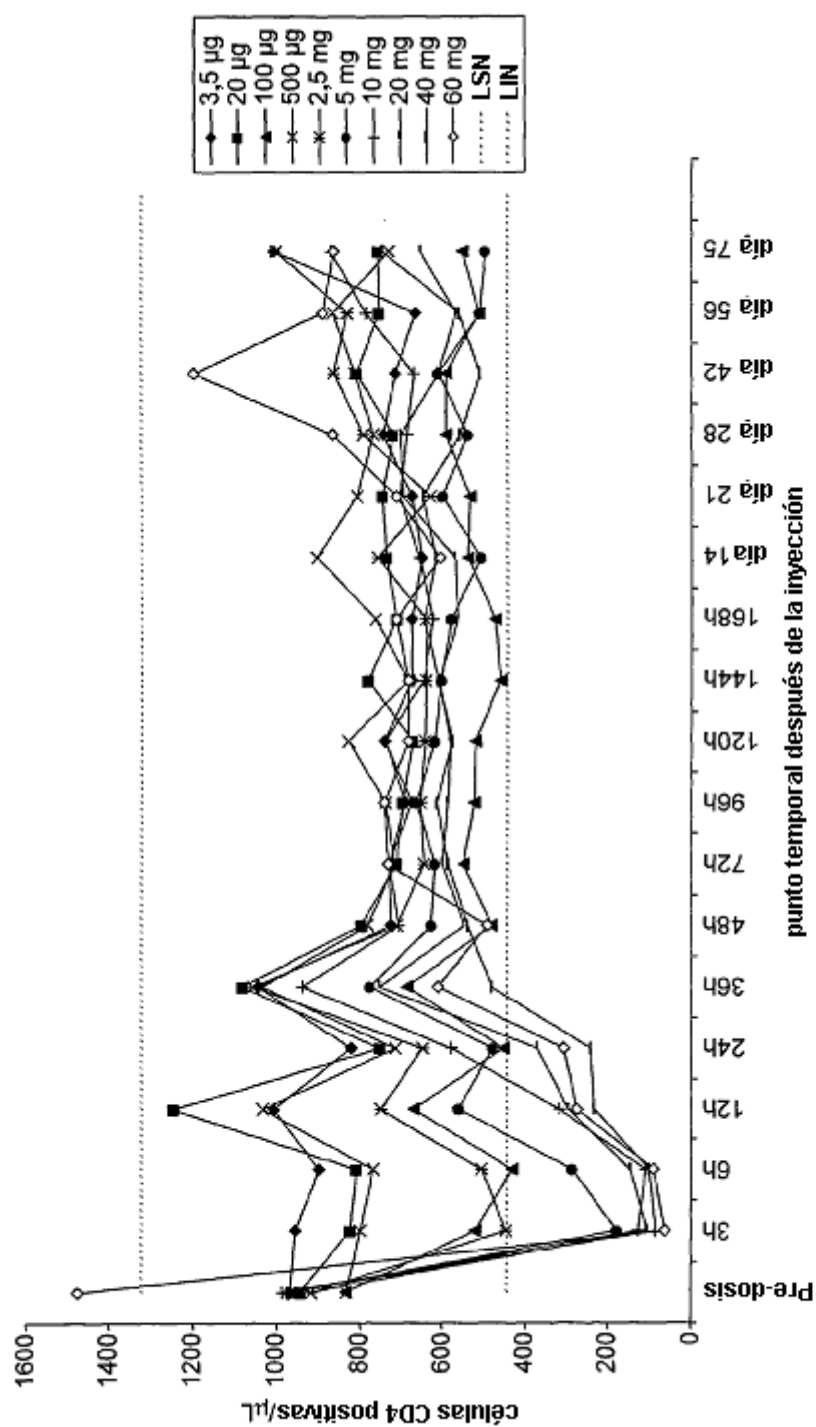


FIG. 10

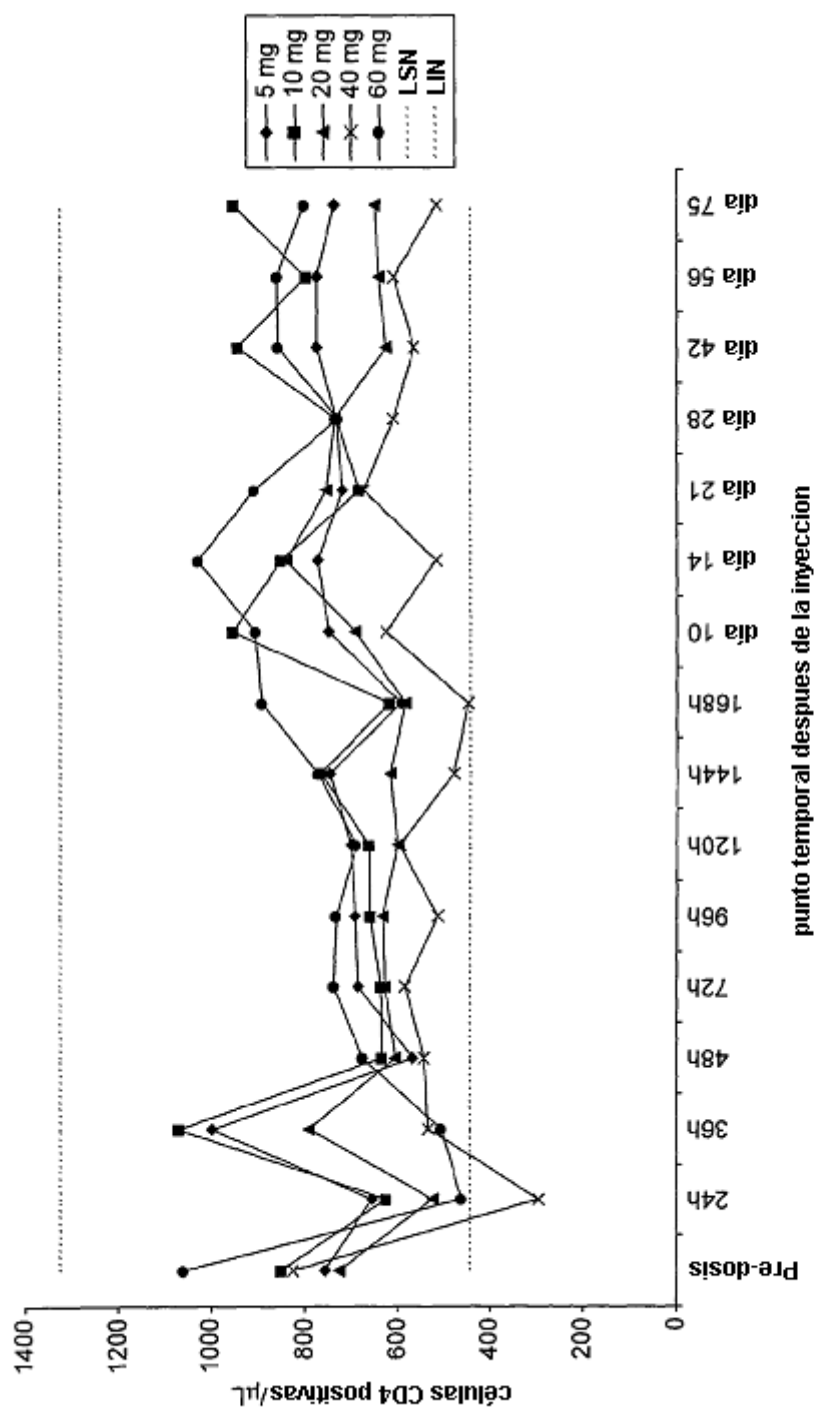


FIG. 11

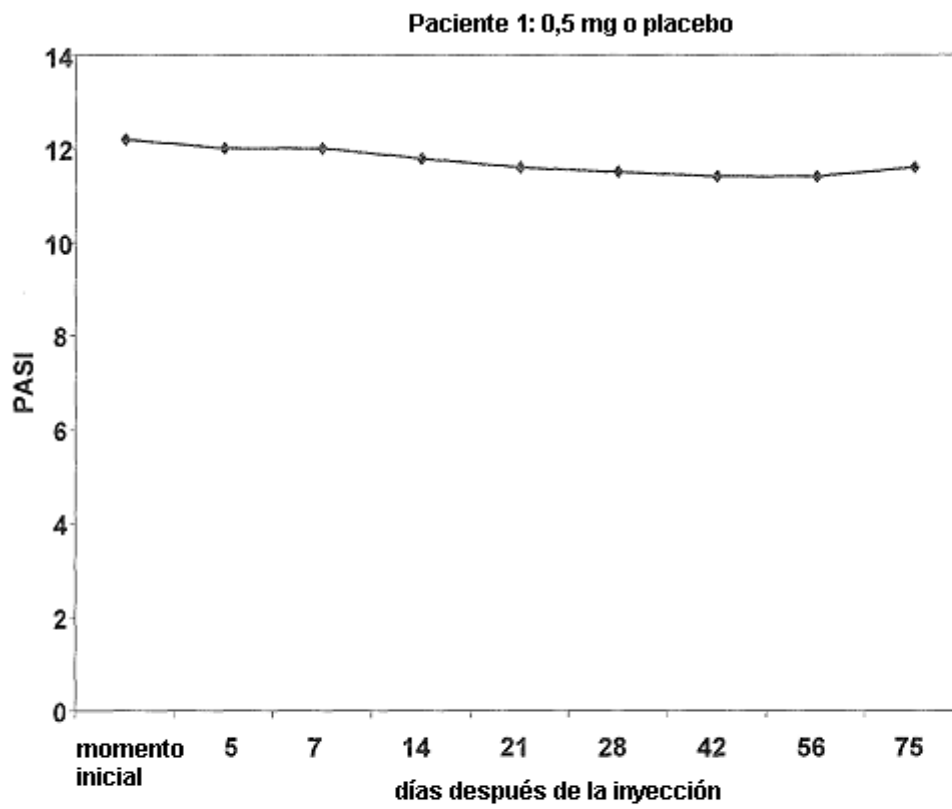


FIGURA 12A

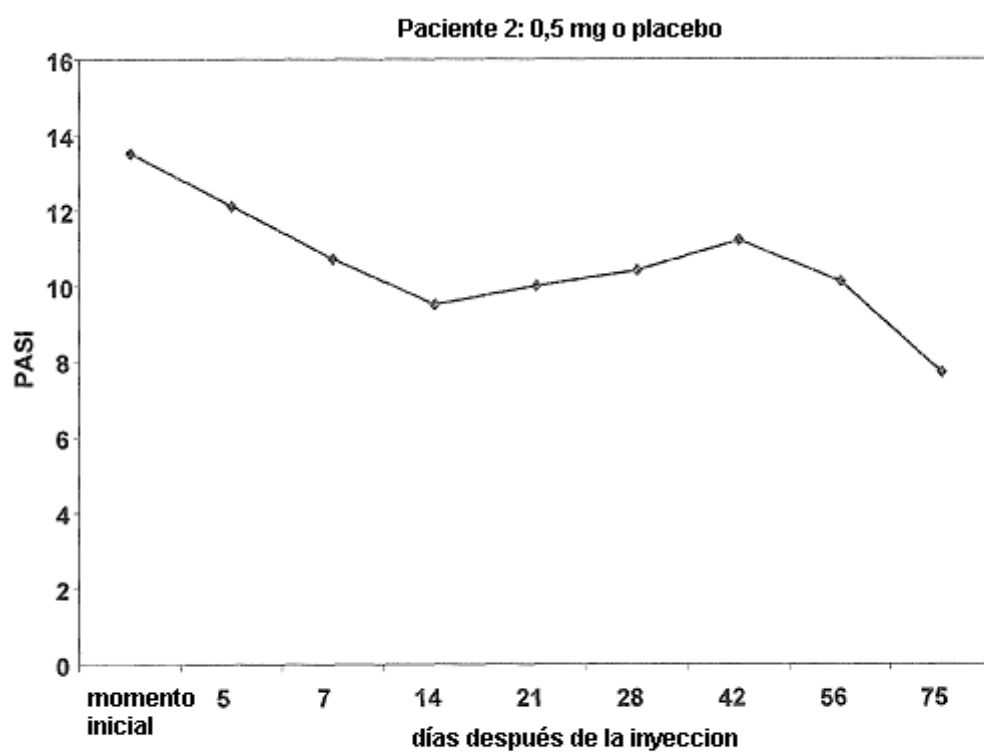


FIGURA 12 B

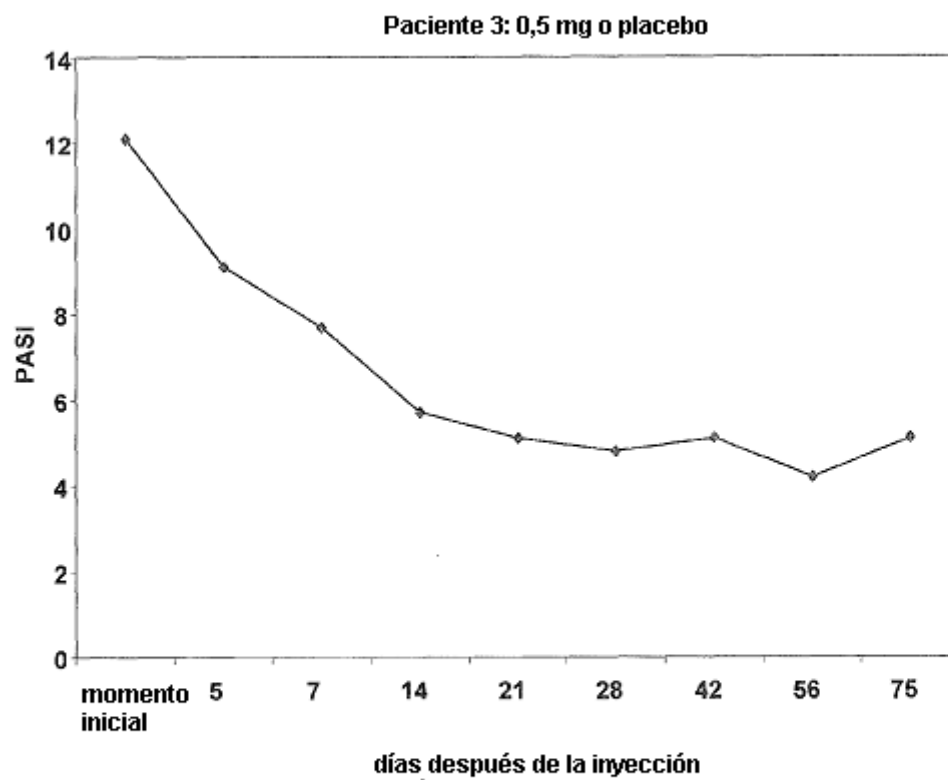


FIGURA 12 C

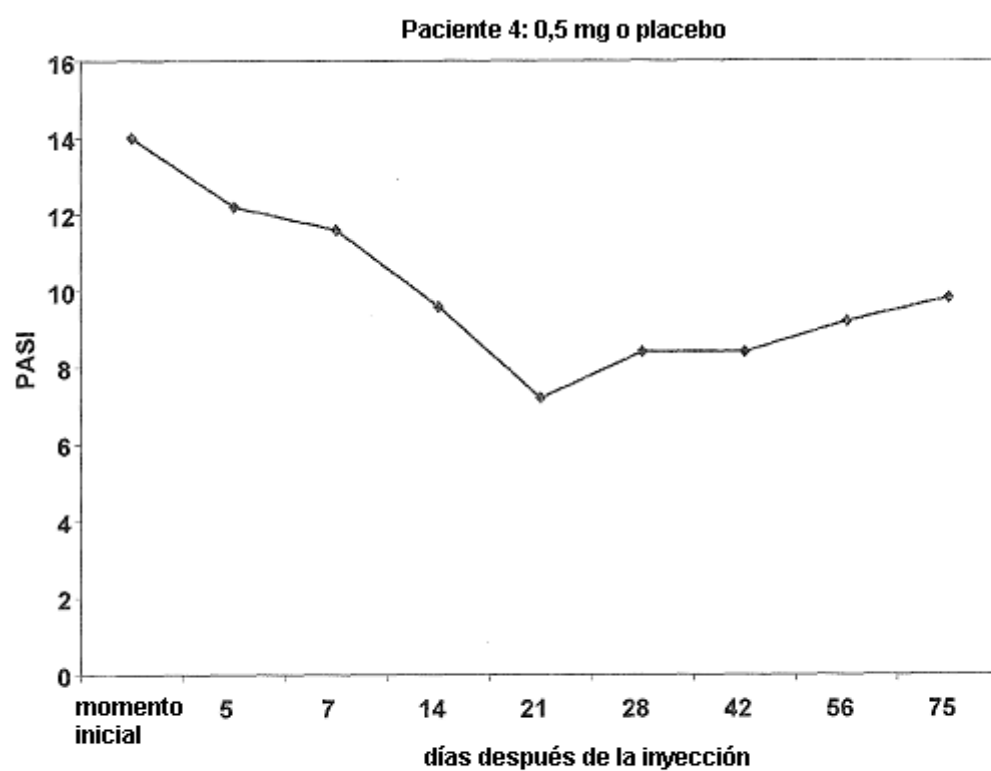


FIGURA 12 D

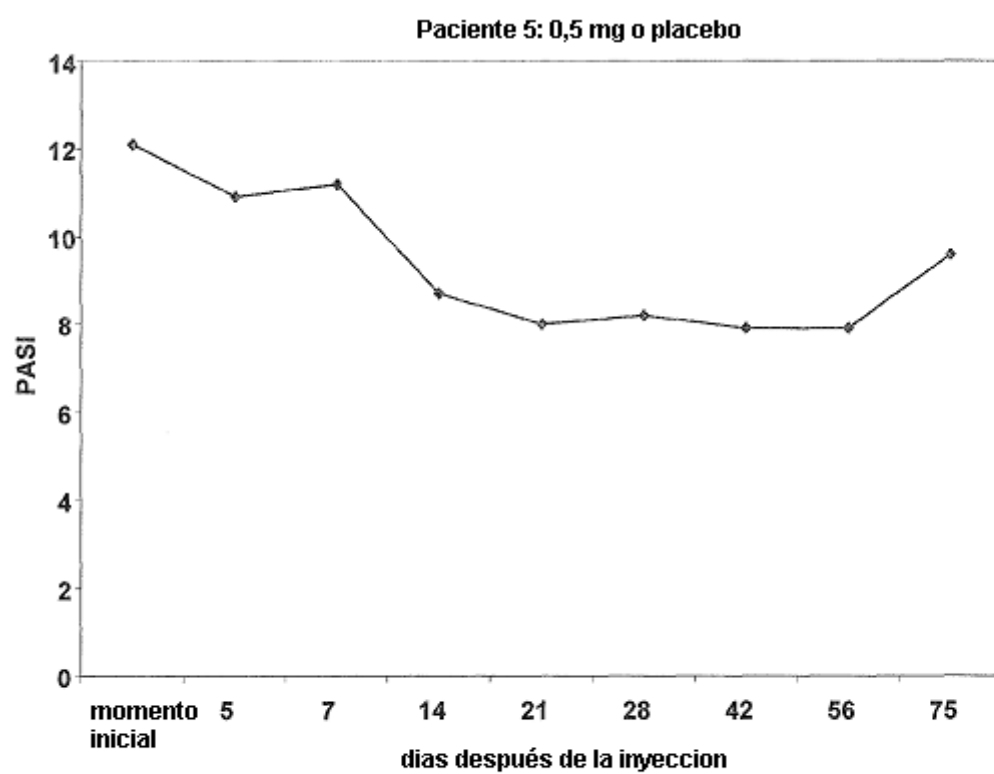


FIGURA 12E

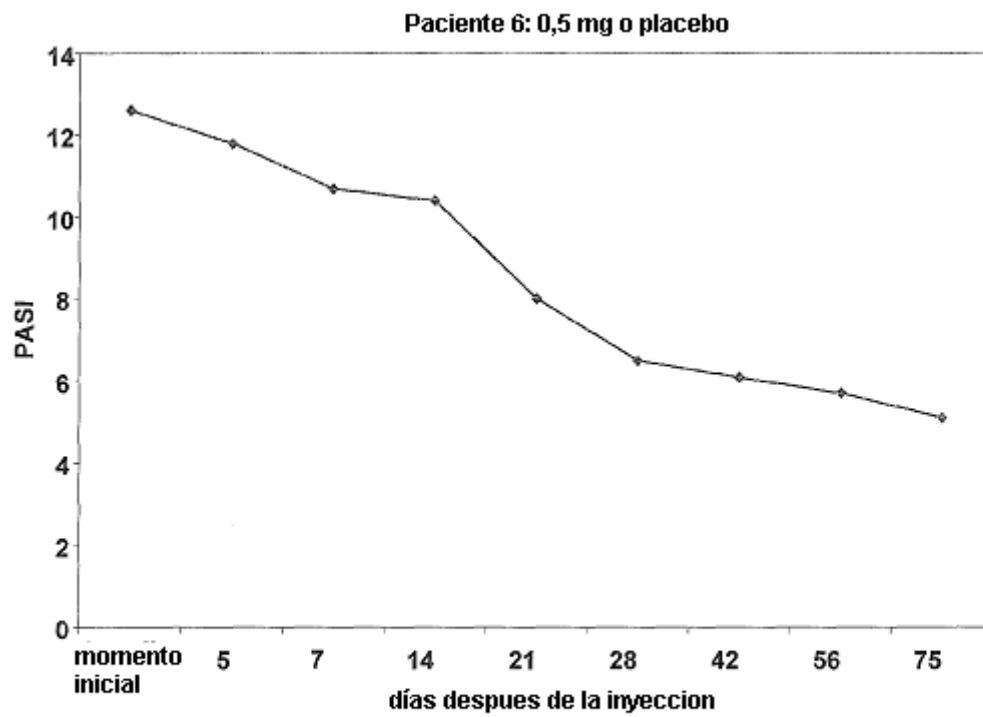


FIGURA 12F

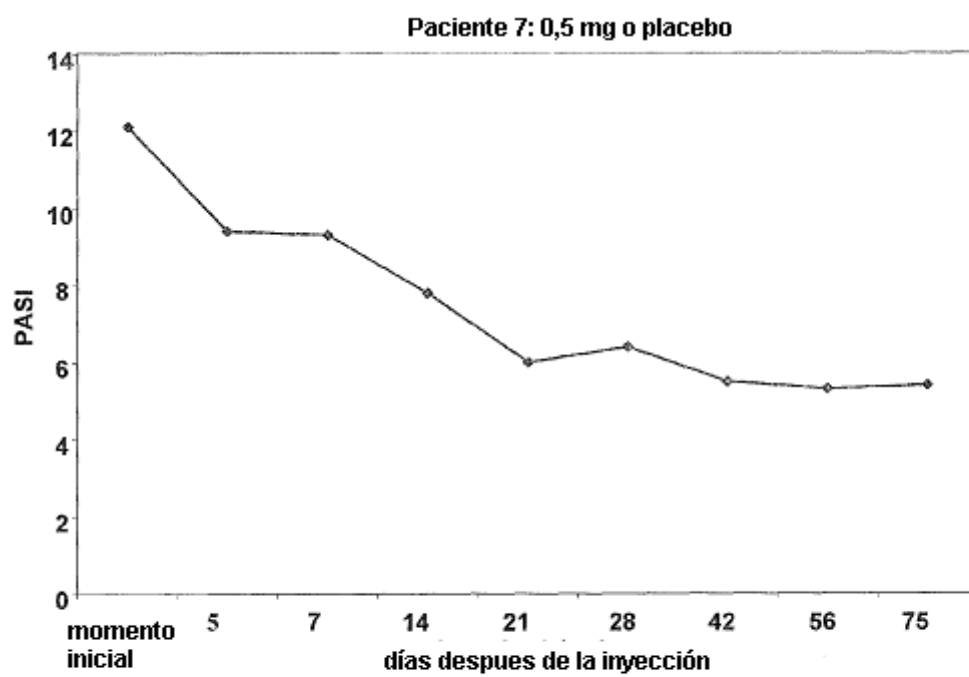


FIGURA 12G

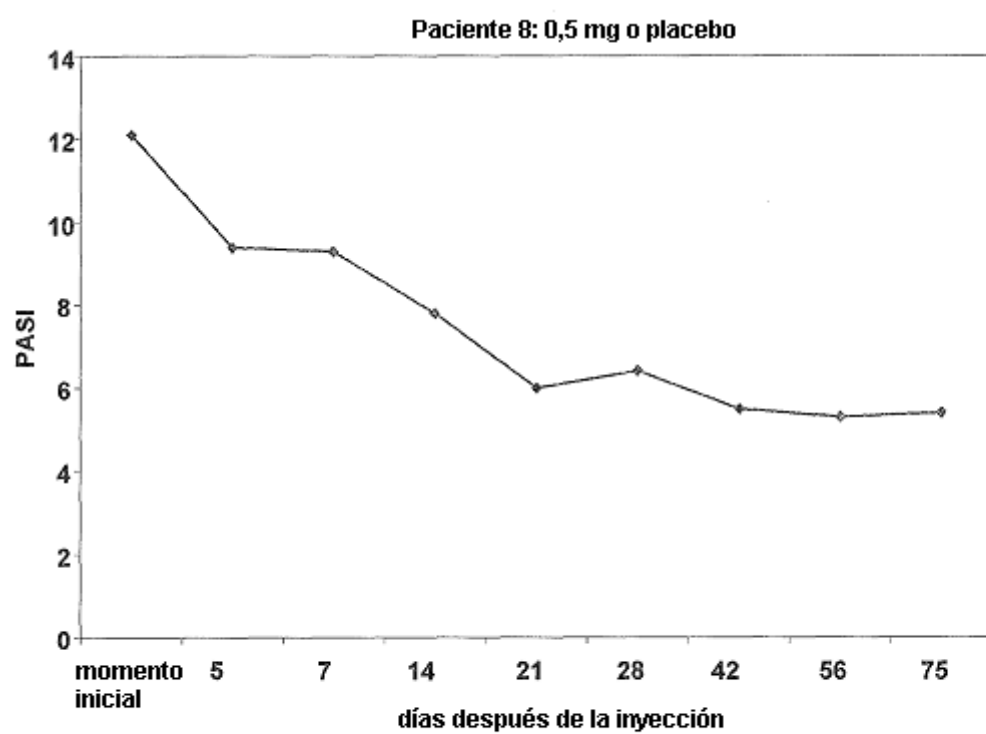


FIGURA 12H

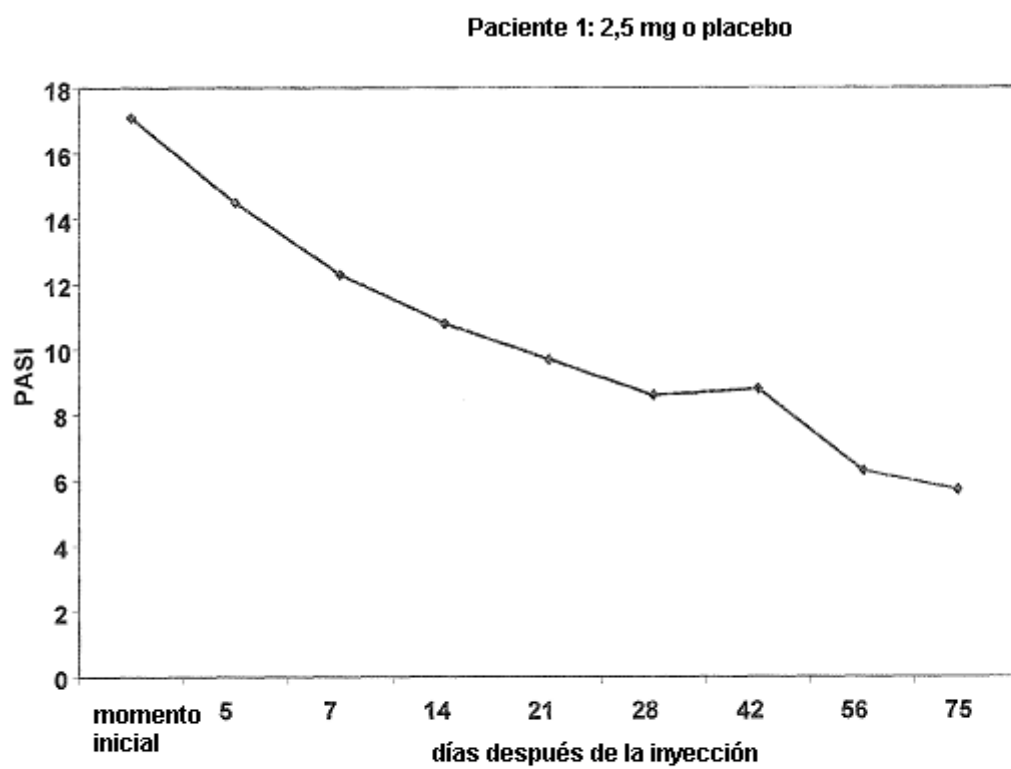


FIGURA 13A

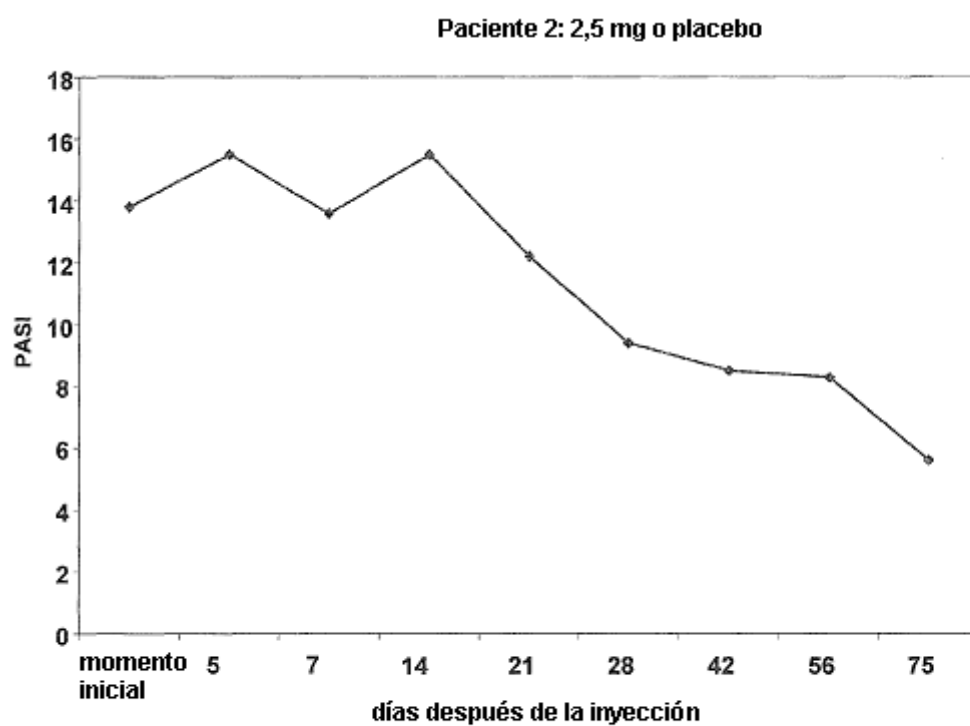


FIGURA 13B

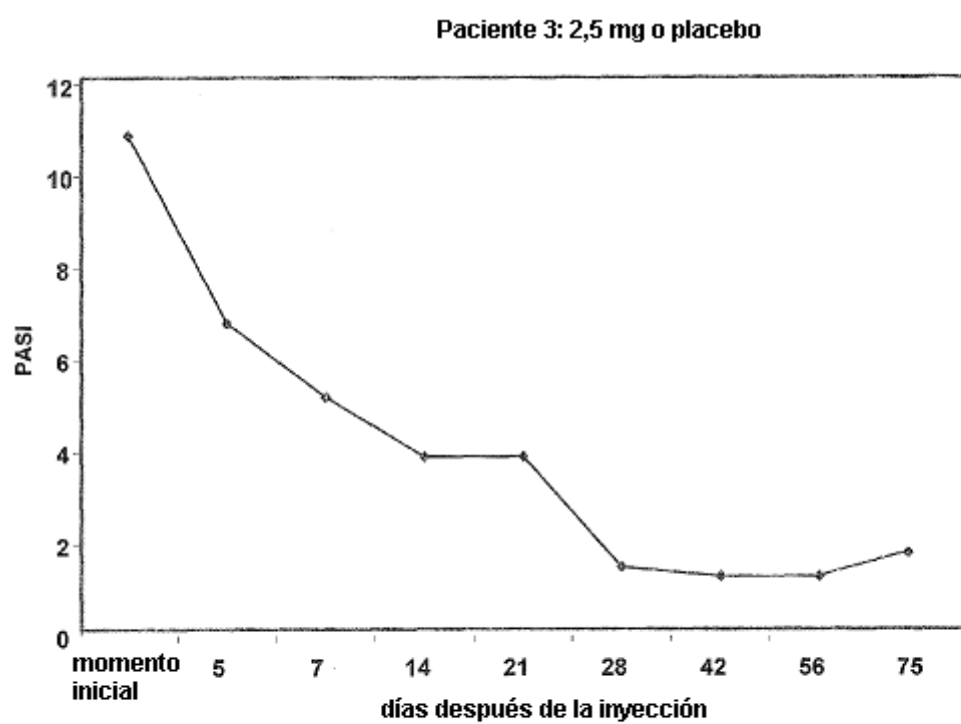


FIGURA 13C

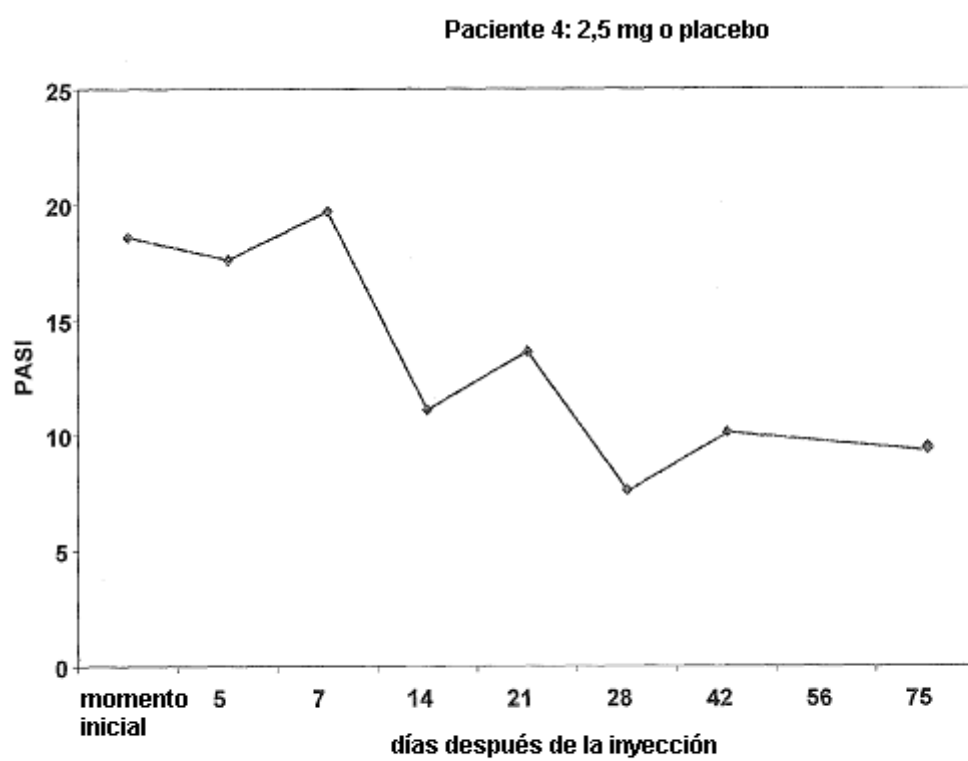


FIGURA 13D

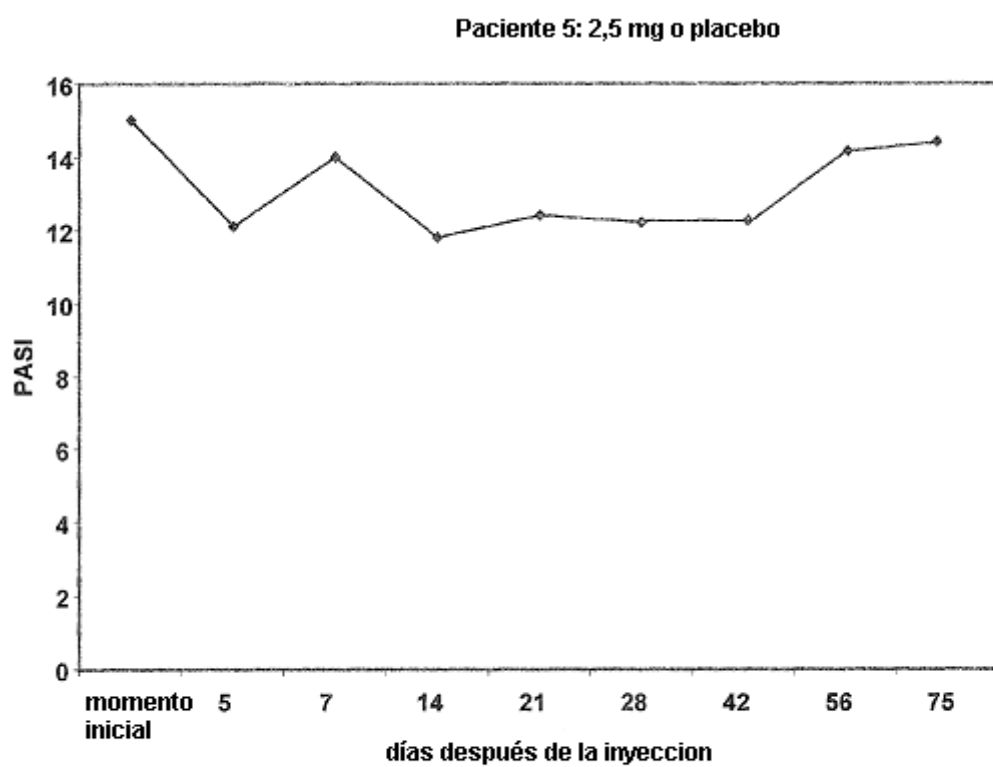


FIGURA 13E

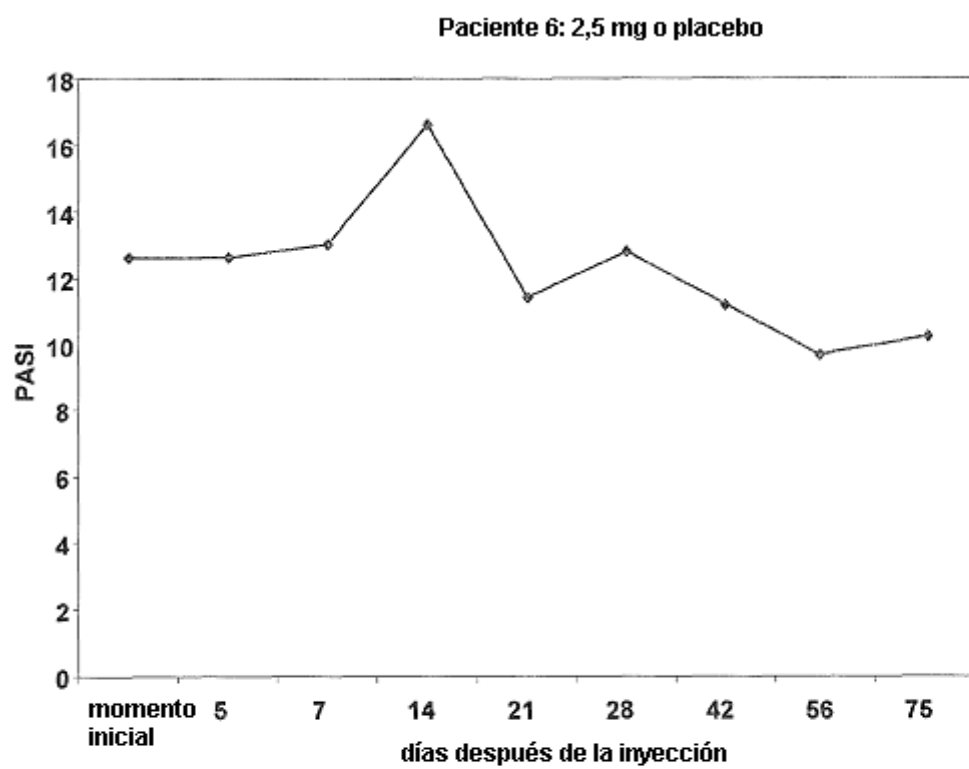


FIGURA 13F

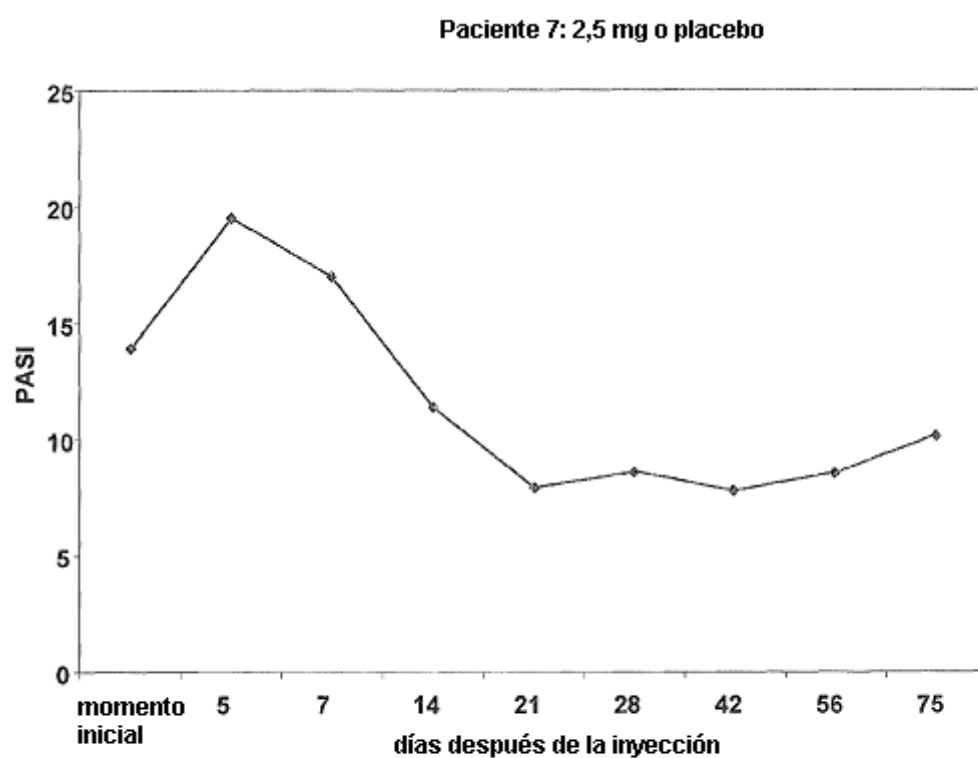


FIGURA 13G

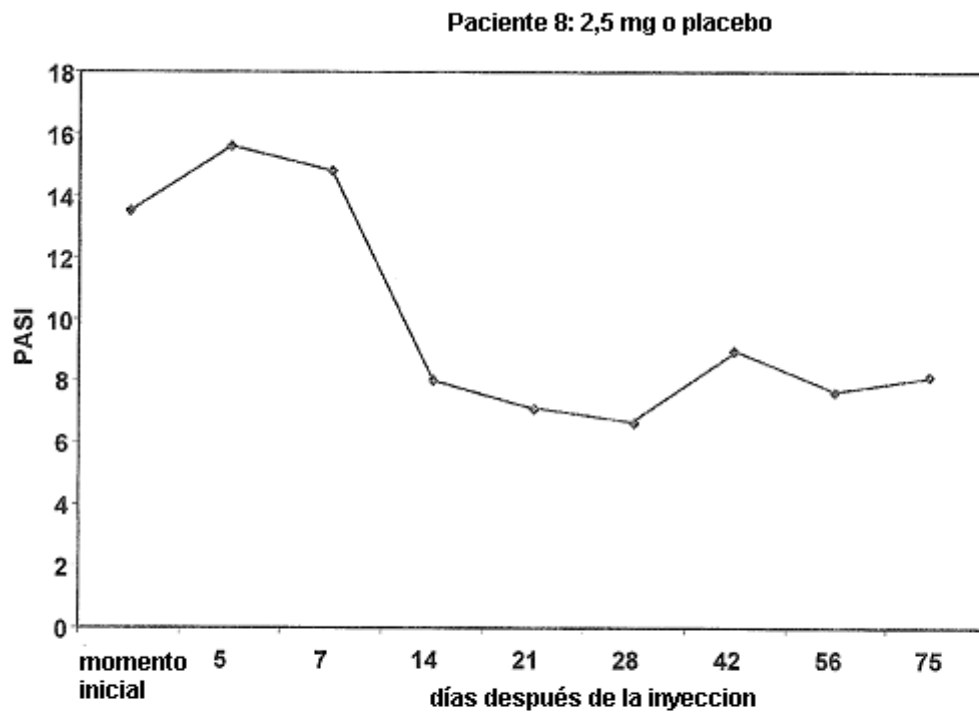
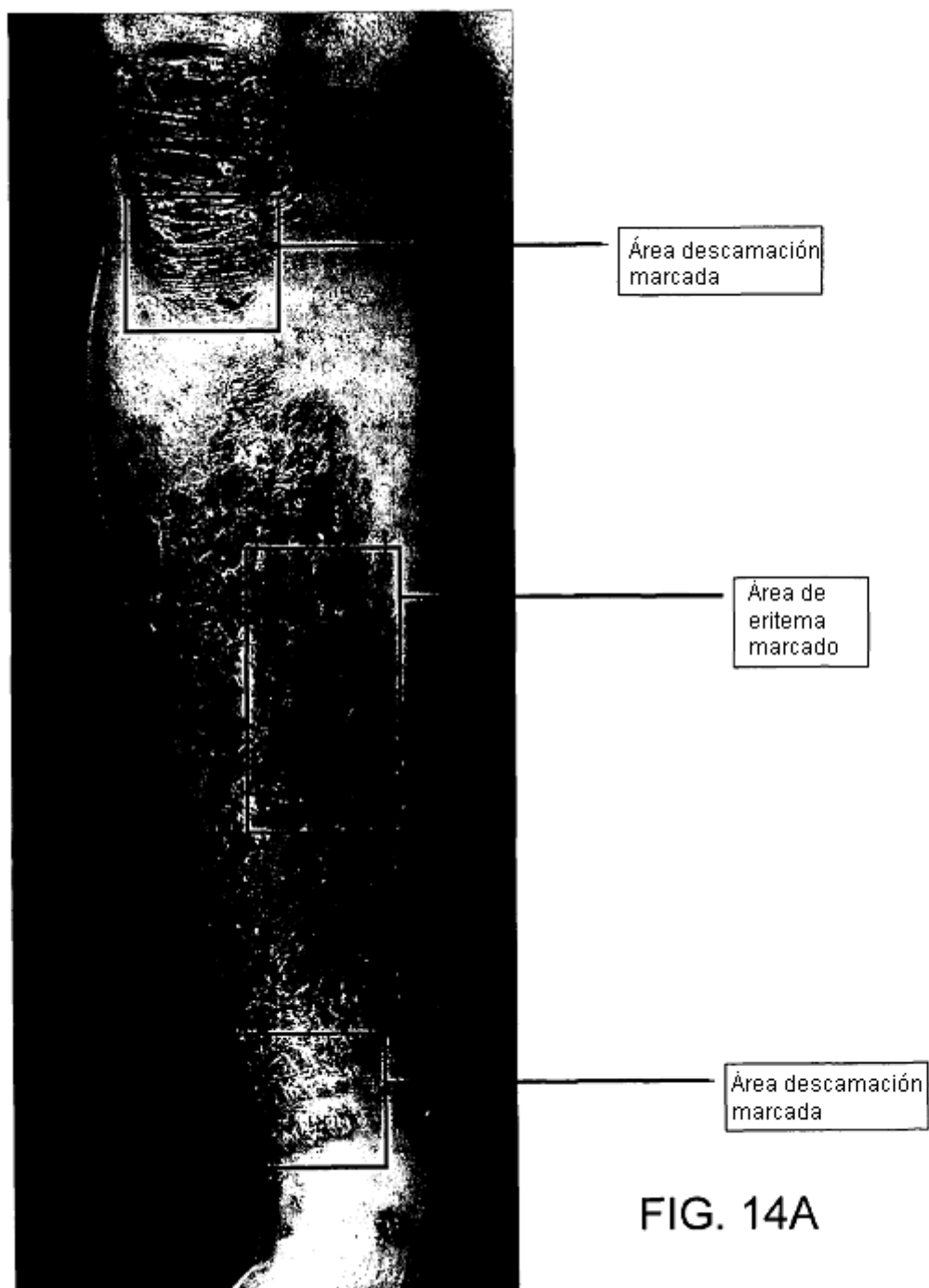


FIGURA 13H



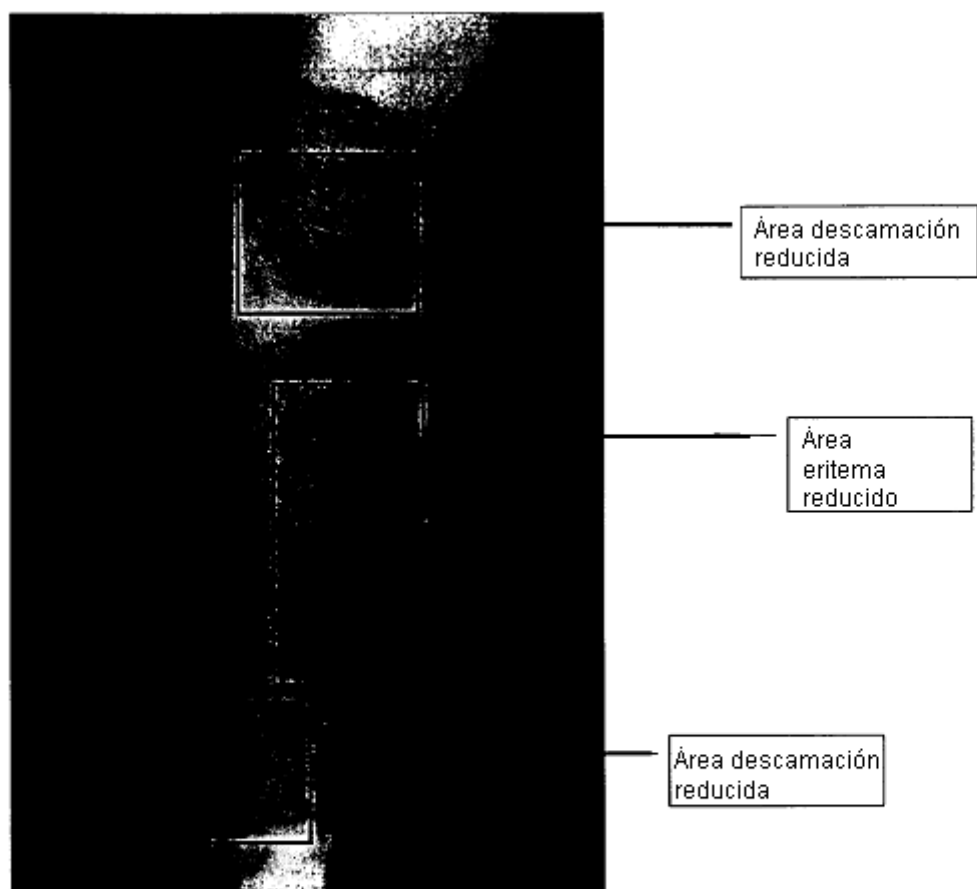


FIG. 14B

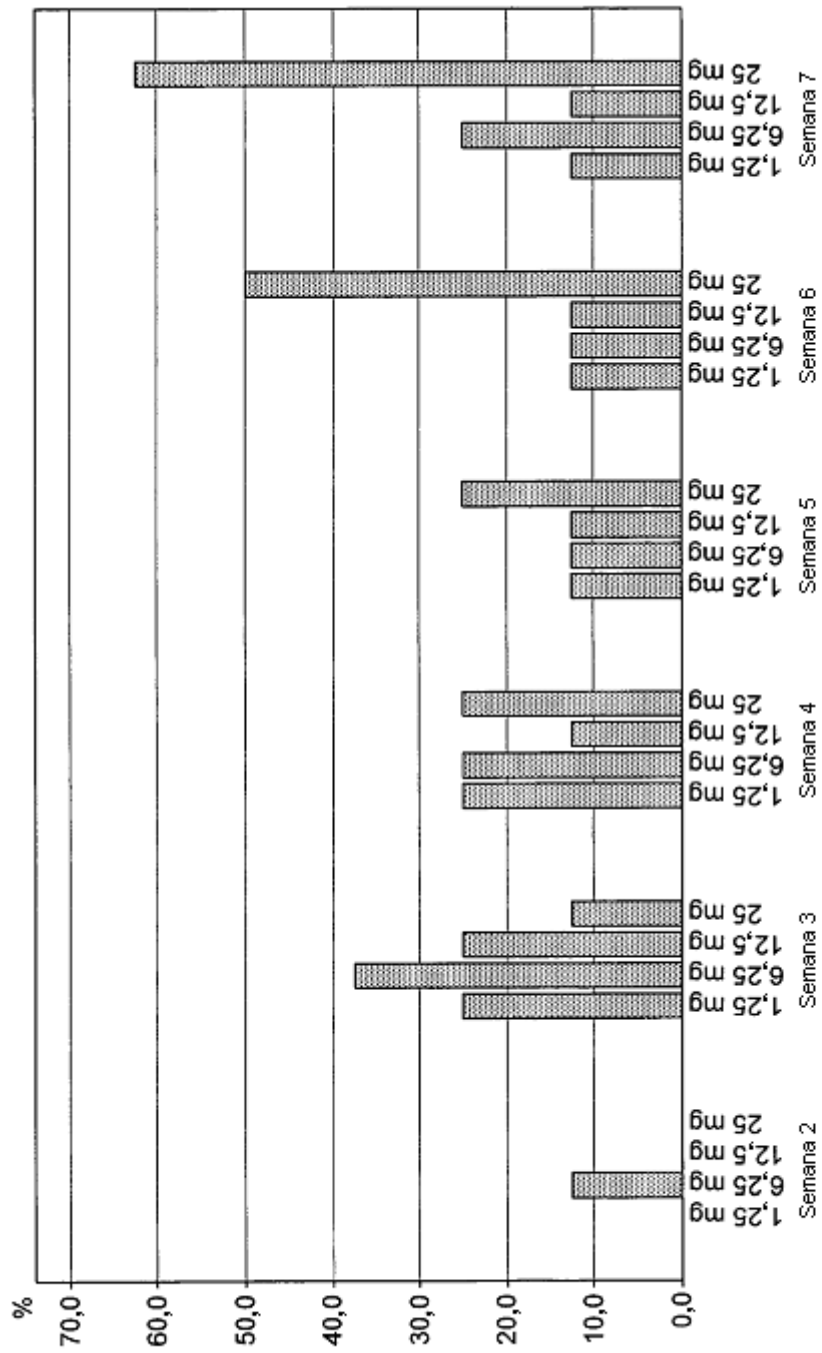


FIG. 15

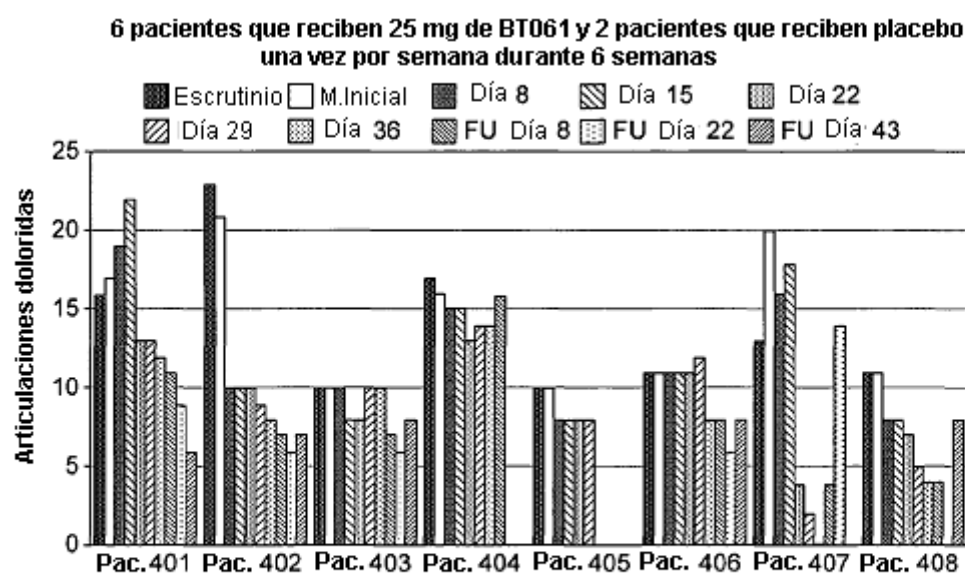


FIG. 16A

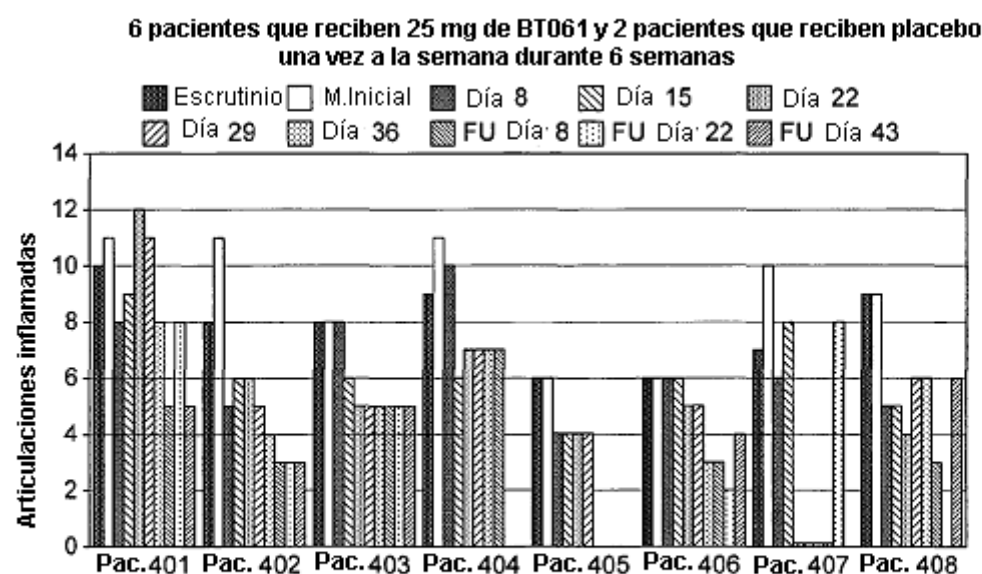


FIG. 16B

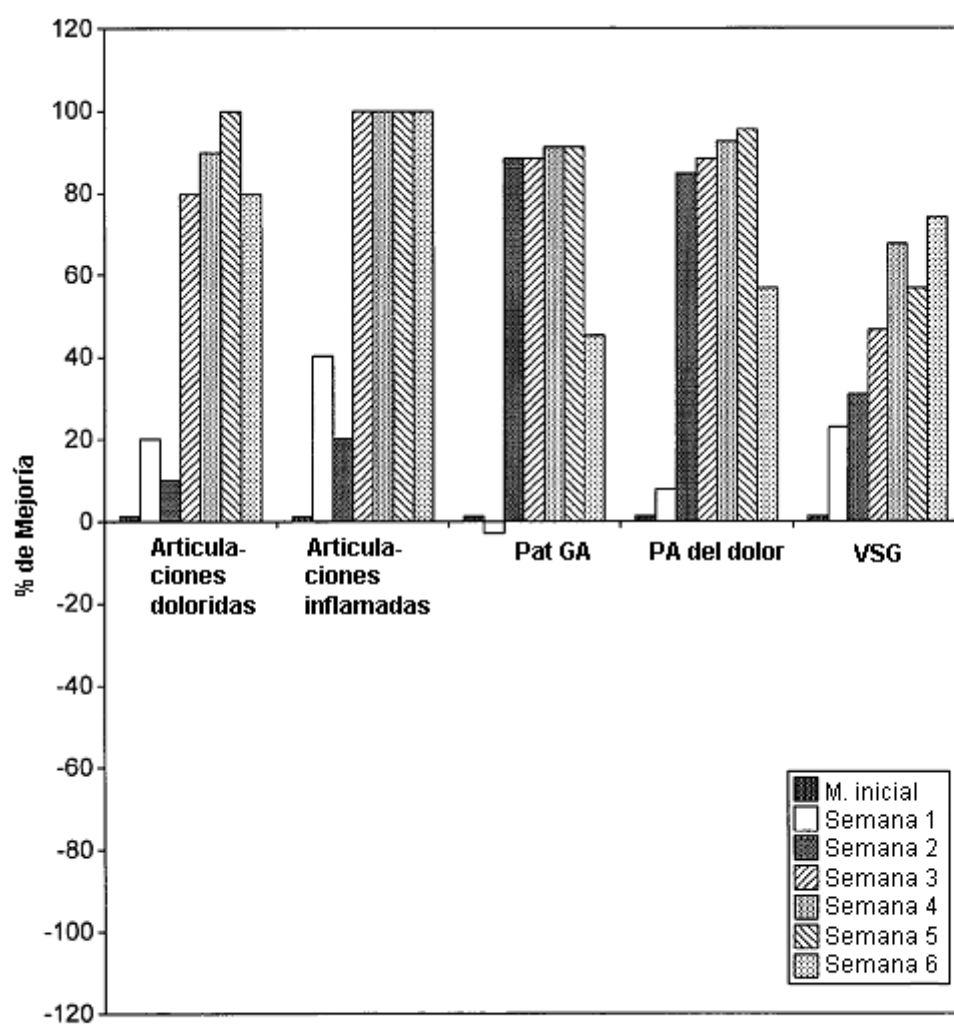


FIG. 17A

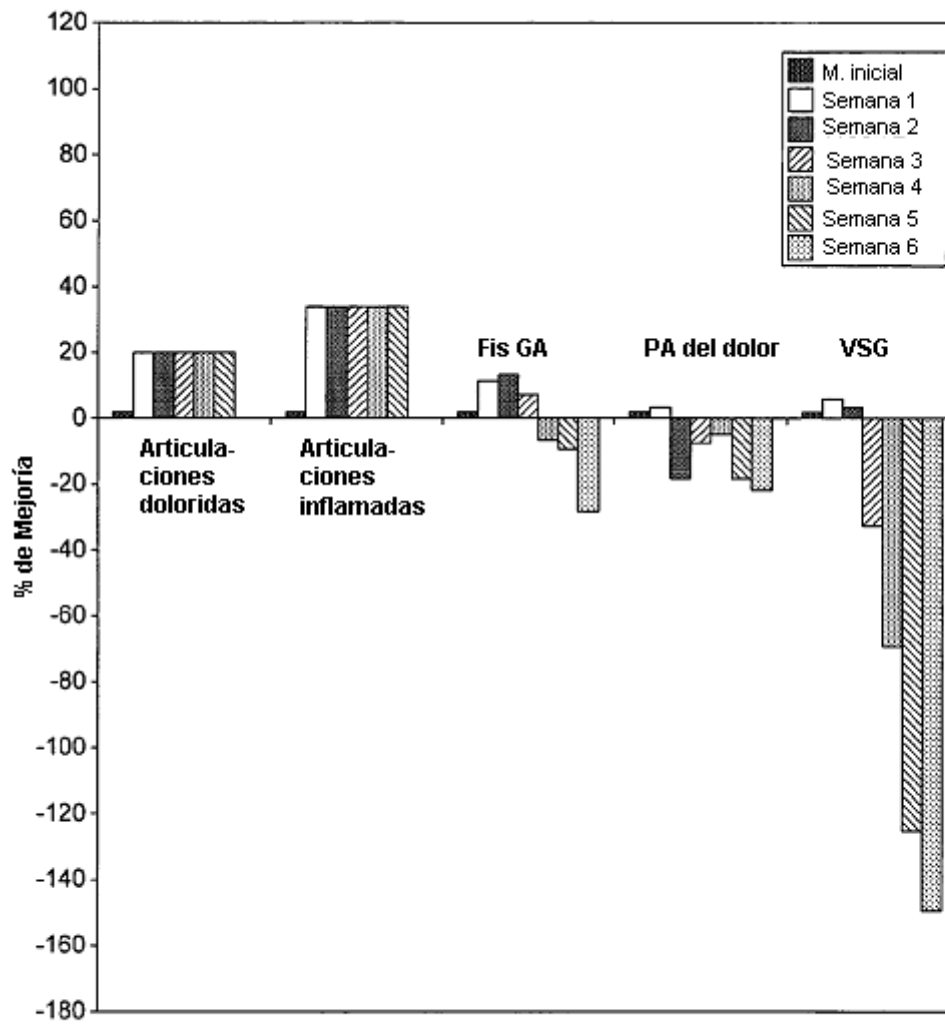


FIG. 17B

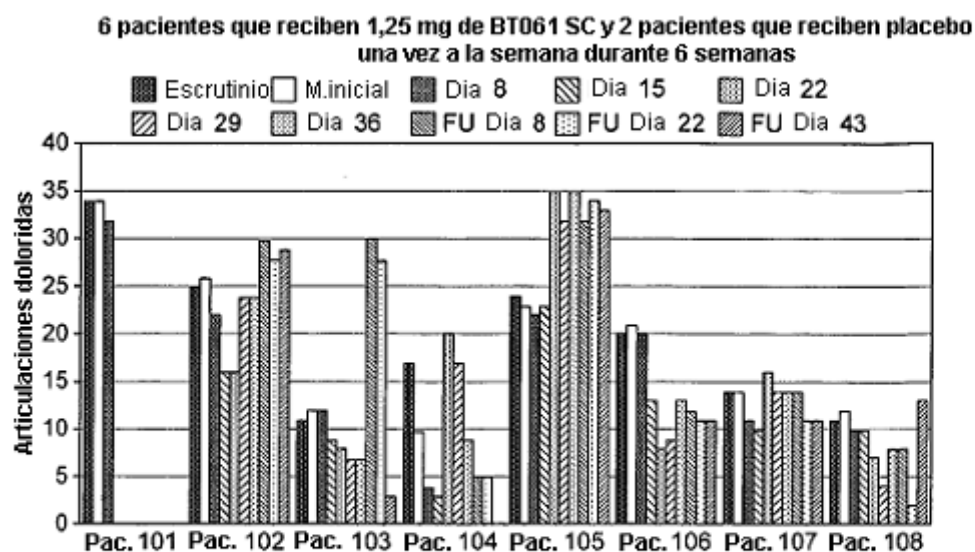


FIG. 18A

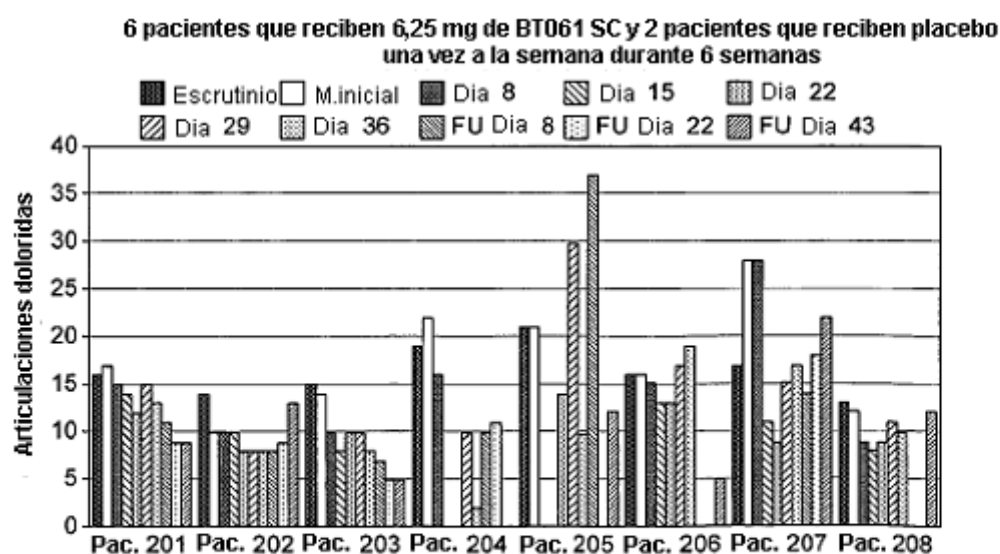


FIG. 18B

6 pacientes que reciben 50 mg de BT061 SC y 2 pacientes que reciben placebo una vez a la semana durante 6 semanas

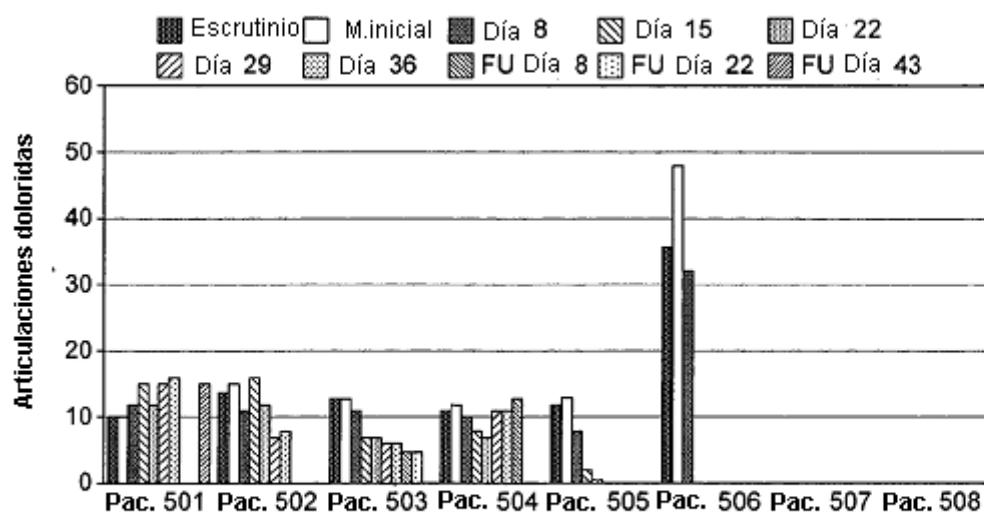


FIG. 19A

6 pacientes que reciben 6,25 mg de BT061 IV y 2 pacientes que reciben placebo una vez a la semana durante 6 semanas

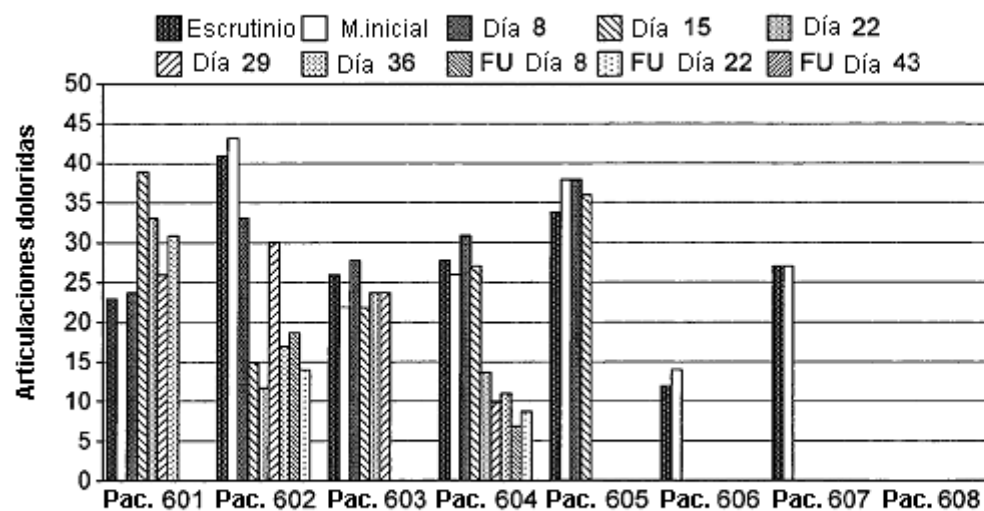


FIG. 19B

ES 2 610 327 T3

	FR1				CDR1				FR2																																													
	1				2				3																																													
	12345678901234567890123				456777778901234				567890123456789																																													
	ABCD																																																					
mB-F5	D	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	K	S	V	S	T	S	G	Y	S	Y	I	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	Y	I	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																															
	0123456				7890123456789012345678																															
mB-F5	L	A	S	I	L	E	S	G	V	P	C	R	F	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	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	C
hB-F5L4L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
FK-001								G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	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

FIG. 20

		FR1		CDR1		FR2	
	1	2	3		4		
	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789				
mB-F5	Q	EYLVETGGGLV	RPGNSLKLSCVTS	GFSFS	DCRM	Y	WLRQPPGKGLEWIG
hB-F5H37V	E	EQLVESGGGLV	KPGGSLRLSCAAS	GFSFS	DCRM	Y	WVRQAPGKGLEWIG
hB-F5H37L	-	-	-	-	-	-	L
M26	E	VQLVESGGGLV	KPGGSLRLSCAAS	GFTFS			WVRQAPGKGLEWVG
	•			•		•	•
		CDR2		FR3			
	5	6	7	8	9		
	0122223456789012345	67890123456789012222345678901234					
	ABC				ABC		
mB-F5	VISVKS	ENYGANYAESVRG	RFTISR	DDSKSSVYLQMSRL	REEDTATYYCSA		
hB-F5H37V	VISVKS	ENYGANYAESVRG	RFTISR	DDSKNTVYLQMN	SLKTEDTAVYYCSA		
hB-F5H37L	-	-	-	-	-	-	-
M26			RFTISR	DDSKNTLYLQMN	SLKTEDTAVYYCTT		
				•			••
		CDR3		FR4			
	10		11				
	5678900000012	34567890123					
	ABCDE						
mB-F5	SYYRYDVGAWFAY	WGQGT	LVTVSA				
hB-F5H37V	SYYRYDVGAWFAY	WGQGT	LVTVSS				
hB-F5H37L	-	-	-	-	-	-	-
M26		WGQGT	LVTVSS				

FIG. 21