

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 783 448**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2015 PCT/US2015/053233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16054218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015 E 15778559 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3201231**

54 Título: **Métodos de tratamiento del lupus eritematoso sistémico utilizando un anticuerpo de dominio dirigido contra CD28**

30 Prioridad:

30.09.2014 US 201462057981 P

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

17.09.2020

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**VALENCIA, XAVIER;
THROUP, JOHN P.;
NADLER, STEVEN G.;
SUCHARD, SUZANNE J.;
DUCHESNE, DOMINIQUE;
LIU, XIAONI;
SHI, RONG;
SHEVELL, DIANE E.;
XIE, JENNY H. y
HONCZARENKO, MAREK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 783 448 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

Métodos de tratamiento del lupus eritematoso sistémico utilizando un anticuerpo de dominio dirigido contra CD28

5 **Campo de la invención**

Se proporcionan anticuerpos de dominio único que se unen específicamente a CD28 humano para su uso en métodos de tratamiento del lupus eritematoso sistémico.

10 **Antecedentes**

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune progresiva crónica caracterizada por afectación de órganos/tejidos pleiotrópicos y manifestaciones clínicas. La progresión de la enfermedad está marcada por brotes, que, por definición, requieren modificación de la terapia. El LES no controlado conducirá a un daño en los órganos terminales con una mayor morbilidad y mortalidad. Las manifestaciones clínicas son variadas y, a menudo, en un solo paciente intervienen muchos órganos y tejidos. Los tejidos que con más frecuencia son objetivos son la piel (con la típica erupción malar o en alas de mariposa), las articulaciones y los riñones, pero prácticamente cualquier órgano y tejido puede ser un objetivo.

Los autoanticuerpos, tal como anti-ácido desoxirribonucleico bicatenario (anti-ADNbc) o los anticuerpos antinucleares (ANA), han ayudado a definir la naturaleza autoinmune del LES. Estos autoanticuerpos, sin embargo, no son patognomónicos. El LES, con sus manifestaciones clínicas pleiotrópicas y la falta de autoanticuerpos específicos, es el arquetipo de las enfermedades autoinmunes no específicas de órganos. El American College of Rheumatology (ACR) ha desarrollado un conjunto de pautas de 11 factores para diagnosticar LES. Esta complejidad intrínseca para el diagnóstico y el seguimiento de la progresión de la enfermedad ha obstaculizado la validación de nuevos tratamientos.

La cascada patogénica completa que conduce al LES, con todas sus facetas clínicas, es compleja y aún no está completamente definido. A pesar de ello, ahora está bien aceptado que los linfocitos T tienen un papel fundamental en el LES. El LES se caracteriza por linfocitos T hiperreactivos, producción excesiva de autoanticuerpos e hiperactivación de células presentadoras de antígeno (APC). Los autoanticuerpos (en particular, los anticuerpos antinucleares y los anticuerpos anti-ADNbc) en pacientes con LES dependen de la ayuda de los linfocitos T que proporcionan las citocinas y las moléculas coestimuladoras. Además de proporcionar ayuda con los linfocitos B, los linfocitos T pueden infiltrarse directamente en las articulaciones, la piel, los riñones y el cerebro, causando daños directamente a través de citotoxicidad o indirectamente a través del reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos.

Los linfocitos de pacientes con LES muestran signos de mayor activación; por ejemplo, el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CD25 aumenta al igual que la expresión de CD86 en los linfocitos B CD19+. Se cree que la mayor expresión de CD86 hace que los linfocitos B (autorreactivos) sean más susceptibles a la ayuda de los linfocitos T y, por lo tanto, facilita la producción de autoanticuerpos. De acuerdo con esta observación, el número de linfocitos B activados y los niveles de anticuerpos anti-ADNbc aumentan con la actividad enferma. Además, las células dendríticas (CD) de sangre periférica y las CD derivadas de monocitos de sangre periférica de pacientes con LES muestran una mayor expresión de CD86 y la proporción de CD86/CD80 es mayor en pacientes con LES en comparación con donantes sanos. A diferencia del CD86, la expresión de CD28 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con lupus parece ser más variable. Independientemente de los niveles de expresión de CD28, los linfocitos T de pacientes con LES parecen responder mejor a la activación mediada por anti-CD28 y los pacientes con enfermedad activa tienen mayor expresión génica de CD28 en comparación con los controles normales. CTLA4 (una molécula co-inhibidora) también se incrementa en los linfocitos T de pacientes con LES, pero esto no parece controlar la activación aberrante de los linfocitos T. Tomados en conjunto, Estos datos sugieren que la ruta de CD28-CD86/CD80 desempeña un papel central en la respuesta inmunitaria defectuosa observada en pacientes con LES.

Actualmente, los pacientes con LES son tratados, dependiendo de la gravedad de la enfermedad, con antipalúdicos, CS, tal como prednisona oral, y medicamentos inmunosupresores, tal como MTX, AZA, micofenolato de mofetilo y ciclofosfamida. Aunque los corticosteroides y los fármacos inmunosupresores son generalmente efectivos para controlar temporalmente los brotes y la progresión de la enfermedad, su eficacia reducida y efectos adversos graves limitan significativamente su uso prolongado. Esto ha llevado al uso no indicado de muchos medicamentos para tratar a pacientes con lupus. La escasez de opciones terapéuticas satisfactorias se destaca por la aprobación de un solo medicamento nuevo (Belimumab) para el LES en los últimos cincuenta años. A pesar de la aprobación de Belimumab, los pacientes con LES todavía tienen una necesidad médica insatisfecha muy alta y se necesitan nuevas terapias para tratar satisfactoriamente el LES.

La inhibición de la activación de linfocitos T mediada por CD28 podría inhibir las respuestas de linfocitos T no deseadas que se producen durante la autoinmunidad, rechazo de trasplantes o respuestas alérgicas. Por ejemplo, inhibir la activación de linfocitos T mediada por CD28 podría retrasar el rechazo del injerto, prevenir el rechazo agudo de aloinjerto, inducir tolerancia específica del donante y prevenir el desarrollo e interrumpir la progresión del

rechazo crónico de aloinjerto, así como prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped (GVH), es decir, cuando los linfocitos T trasplantados montan una respuesta inmunitaria enérgica contra aloantígenos de tejido del huésped (alama et al. (2001) J. Clin. Invest. 108: 943-48). La inhibición de la activación de linfocitos T mediada por CD28 no solo atenuaría la respuesta inmunitaria al negar la señalización de activación a través de CD28, no debería afectar a la interacción de CD86 y CD80 con CTLA4, preservando así la inhibición mediada por CTLA4 de la respuesta de linfocitos T. Por tanto, la inhibición de la activación de linfocitos T mediada por CD28 podría usarse para prevenir la inducción de autoinmunidad y moderar la progresión y/o la gravedad del lupus, así como otras enfermedades autoinmunes (Saloman et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 225-252).

Los documentos WO 2014/120916 y WO 2010/009391 describen anticuerpos de dominio anti-CD28 y el uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades inmunes. El documento WO 2015/143209 describe anticuerpos de dominio anti-CD40L solos o en combinación con una molécula mutante de CTLA4 y/o anticuerpos de dominio anti-CD28 para su uso en métodos de tratamiento de rechazo de trasplante renal. Además, se describen anticuerpos de dominio antagonistas del receptor CD28 anti-humano (dAb) que son específicos para CD28 humano (Suchard et al. (2013) J Immunol. 191: 4599-610). Se revisan las estrategias para la estimación del nivel mínimo de efecto biológico anticipado (MABEL) para la selección de la primera dosis humana en ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (Muller et al. (2009) Curr Opin Biotechnol. 20: 722-9).

En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos mejorados para tratar sujetos con LES sin la estimulación de las vías de señalización de CD28.

Sumario

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo de dominio anti-CD28 para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) en un paciente, que comprende un dominio variable, en el que el dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (1h-239-891(D70C)) o difiere de la SEQ ID NO: 12 en hasta 5 aminoácidos, en el que el anticuerpo de dominio anti-CD28 se administra por vía subcutánea a una dosis de 12,5 mg cada semana o cada dos semanas, en el que el dominio variable del anticuerpo de dominio anti-CD28 comprende: (1) una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (2) una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (3) una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. Preferentemente, el paciente es un paciente humano.

En ciertos aspectos adicionales, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento se administran a una dosis seleccionada entre aproximadamente 1,25 mg, aproximadamente 5 mg y aproximadamente 12,5 mg. Por ejemplo, la dosis es de al menos 1,25 mg o al menos 5 mg. Opcionalmente, la dosis es de aproximadamente 1,25 mg, aproximadamente 5 mg o aproximadamente 12,5 mg. Opcionalmente, la dosis se administra toas las semanas o cada dos semanas. Opcionalmente, se administran al menos 2 dosis, de modo que al menos 2 dosis son iguales o diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo para el uso según la invención se administra al menos 12 dosis. Por ejemplo, el anticuerpo para el uso según la invención se administra al menos 24 dosis.

En una realización, el anticuerpo de dominio anti-CD28 para su uso de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12. En una realización, el anticuerpo de dominio anti-CD28 para su uso de acuerdo con la invención comprende un polietilenglicol ramificado de 40 kDa. En determinadas realizaciones específicas, el anticuerpo de dominio anti-CD28 es BMS-931699.

En determinados aspectos, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento se administran por vía subcutánea. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio anti-CD28 se formulan en una composición farmacéutica para administración subcutánea. Como alternativa, los anticuerpos de dominio anti-CD28 se administran por vía intravenosa. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio anti-CD28 se formulan en una composición farmacéutica para administración intravenosa.

En determinados aspectos, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención, comprende además administrar al paciente un agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio. Opcionalmente, el agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio se administra antes que el anticuerpo de dominio anti-CD28. Opcionalmente, el agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio se administra después del anticuerpo de dominio anti-CD28. Opcionalmente, el agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio se administra simultáneamente con el anticuerpo de dominio anti-CD28.

En el presente documento se desvela un método para antagonizar CD28, que comprende administrar una cantidad eficaz de un dAb anti-CD28 descrito en el presente documento a un individuo. También se desvela en el presente documento un método para antagonizar la unión de CD28 que comprende administrar una cantidad eficaz del dAb anti-CD28 descrito en el presente documento a un individuo, en el que el dAb anti-CD28 antagoniza la unión de CD28 a CD80 y/o CD86 en el individuo.

Además, en el presente documento se desvela un método de tratamiento, alivio o prevención de un síntoma de una enfermedad inmunológica, tal como una enfermedad autoinmune o una enfermedad relacionada con el injerto, que

comprende administrar una cantidad eficaz de un dAb anti-CD28 desvelado en el presente documento a un individuo que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad inmunológica. En el presente documento se desvela un método de tratamiento, alivio o prevención de una enfermedad inmunológica, que comprende administrar una cantidad eficaz de un dAb anti-CD28 desvelado en el presente documento a un individuo que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad inmunológica.

En el presente documento se desvela el uso de un dAb anti-CD28 desvelado en el presente documento en el presente documento para preparar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad inmunológica en un paciente que lo necesita. También se desvela el uso de un dAb anti-CD28 desvelado en el presente documento para preparar un medicamento para tratar o prevenir un síntoma de una enfermedad inmunológica en un paciente que lo necesite. Adicionalmente, en el presente documento se desvela el uso de un dAb anti-CD28 desvelado en el presente documento para preparar un medicamento para aliviar al menos un síntoma de una enfermedad inmunológica en un paciente que lo necesita.

Adicionalmente, se desvela un anticuerpo de dominio anti-CD28 formulado en una composición farmacéutica para administración subcutánea. La composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo de dominio puede administrarse por vía subcutánea.

También se desvela un kit para tratar una enfermedad inmunológica en un paciente, comprendiendo el kit: (a) una dosis de anticuerpo de dominio que comprende un anticuerpo de dominio anti-CD28 e (b) instrucciones para usar el anticuerpo de dominio en los métodos desvelados.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la Parte 1 de un estudio de la FDA, internacional, multicéntrico, doble ciego, aleatorizado y de brazos paralelos de fase 2, de esquema de diseño adaptativo para BMS-931699.

La Figura 2 muestra la Parte 2 de un estudio de la FDA, internacional, multicéntrico, doble ciego, aleatorizado y de brazos paralelos de fase 2, de esquema de diseño adaptativo para BMS-931699.

La Figura 3 muestra el esquema de diseño de extensión a largo plazo (LTE).

La Figura 4 demuestra la ocupación esperada del receptor para BMS-931699 en estado estacionario para 12,5 mg semanales (QW), 12,5 mg cada 2 semanas (QOW), 5 mg cada 2 semanas (QOW) y 1,25 mg cada 2 semanas (QOW).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a anticuerpos de dominio anti-CD28 para su uso en métodos de tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES). Los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento pueden estar unidos a polímeros para mejorar las propiedades farmacocinéticas, tal como la estabilidad y la semivida. En el presente documento se desvelan composiciones y métodos para la unión de moléculas de polímero (por ejemplo, polietilenglicol; PEG) a proteínas para modular las propiedades farmacocinéticas de las proteínas modificadas. Por ejemplo, se ha demostrado que la modificación con PEG de las proteínas altera la semivida circulante *in vivo*, la antigenicidad, la solubilidad y la resistencia a la proteólisis de la proteína (Abuchowski et al. (1977) J. Biol. Chem., 252: 3578; Nucci et al. (1991) Adv. Drug Delivery Reviews 6: 133; Francis P et al., Pharmaceutical Biotechnology Vol. 3 (Borchardt, R. T. ed.); y Stability of Protein Pharmaceuticals: in vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization 1991 pp235-263, Plenum, NY).

Los anticuerpos de dominio desvelados, incluyendo BMS-931699 (también conocido como lizumab o 1h-239-891 (D70C) formateado con un polietilenglicol ramificado de 40 kDa), se unen monovalentemente a CD28 e inhiben la interacción de CD80 y CD86 con CD28, el receptor coestimulador clave de los linfocitos T. En última instancia, dirigir a CD28 los anticuerpos de dominio puede proporcionar la oportunidad de inhibir procesos autoinmunes que conducen al lupus eritematoso sistémico entre otras enfermedades autoinmunes o relacionadas con el injerto. Tales anticuerpos de dominio monovalente también pueden evitar posibles efectos indeseables que pueden ocurrir con anticuerpos capaces de unirse de forma divalente o multivalente de CD28. Los anticuerpos de dominio descritos en el presente documento tampoco bloquean la interacción de CD80 y CD86 con CTLA4. Los anticuerpos de dominio descritos en el presente documento no reaccionan de forma cruzada con CTLA4 y, por lo tanto, no se unen al motivo común en CTLA4 y CD28 que se une a CD80/86. De este modo, los anticuerpos de dominio pueden proporcionar beneficios terapéuticos mejorados y efectos secundarios reducidos para pacientes con enfermedades autoinmunes. El anticuerpo de dominio ofrece así una nueva modalidad terapéutica, actualmente no disponible para los pacientes. Dada la falta de opciones terapéuticas para el lupus eritematoso sistémico y los sujetos con enfermedades autoinmunes que han fallado en todas las terapias convencionales, el anticuerpo de dominio con su mecanismo de acción distinto y su perfil de seguridad conocido demuestra un perfil favorable de riesgo/beneficio.

1. Definiciones

De acuerdo con esta descripción detallada, se aplicarán las siguientes abreviaturas y definiciones. Se debe indicar que, tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/a", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y la referencia al término "la dosis" incluye la referencia a una o más dosis y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por alguien con una habilidad habitual en la técnica. Salvo que se indique de otra forma, todos los intervalos descritos en el presente documento incluyen los criterios de valoración específicos. Los siguientes términos se proporcionan a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, una "dosis fija" es una dosis administrada independientemente del peso corporal de los sujetos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "humano" cuando se aplica a un anticuerpo de dominio o a un dominio variable de inmunoglobulina significa que el polipéptido tiene una secuencia derivada de una inmunoglobulina humana. Una secuencia está "derivada de" una secuencia codificante de una inmunoglobulina humana cuando la secuencia: a) aislada de un individuo humano o de células o una línea celular de un individuo humano; b) aislada de una biblioteca de secuencias de genes de anticuerpos humanos clonados (o una biblioteca de secuencias de dominio V de anticuerpos humanos); o c) cuando una secuencia del gen del anticuerpo humano clonado (o una secuencia de la región V humana clonada (que incluye, por ejemplo, un segmento del gen V de la línea germinal)) se utilizó para generar una o más secuencias diversificadas que luego se seleccionaron para unirse al antígeno diana deseado.

Como mínimo, un anticuerpo de dominio humano tiene al menos un 70 % de identidad, al menos un 75 % de identidad, al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad de aminoácidos (incluidos, por ejemplo, 87 %, 90 %, 93 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor identidad) con una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina humana de origen natural, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina humana de origen natural desvelada en Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, 1991).

Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una estructura proteica plegada que conserva su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas y, en muchos casos, se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin pérdida de la función del resto de la proteína y/o del dominio.

Por "anticuerpo de dominio" se entiende un dominio de polipéptido plegado que comprende una secuencia característica de dominios variables de inmunoglobulina y que se une específicamente a un antígeno (por ejemplo, constante de disociación de 500 nM o menos). Por lo tanto, un "anticuerpo de dominio" incluye dominios variables de anticuerpos completos así como dominios variables modificados, por ejemplo, en el que uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpos, o dominios variables de anticuerpos que se han truncado o comprenden extensiones en N o C-terminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que retienen una constante de disociación de 500 nM o menos (por ejemplo, 450 nM o menos, 400 nM o menos, 350 nM o menos, 300 nM o menos, 250 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos) y la especificidad del antígeno objetivo del dominio de longitud completa. Cuando sea necesario o en caso de duda, la convención de numeración y los límites establecidos por Kabat et al. (Kabat et al. (1991) Sequences of Immunological Interest, 5ª ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.) son aplicables a los dominios variables y constantes de inmunoglobulina mencionados en el presente documento.

Un "dAb" se usa indistintamente con "anticuerpo de dominio" en el presente documento. Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" o "anticuerpo de dominio anti-CD28" usado en la presente invención se refiere a un "anticuerpo de dominio variable de inmunoglobulina única anti-CD28".

Tal como se usa en el presente documento, la frase "secuencia característica de los dominios variables de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que es idéntica, más de 20 o más, 25 o más, 30 o más, 35 o más, 40 o más, 45 o más, o incluso 50 o más aminoácidos contiguos, a una secuencia compuesta por una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Secuencias similares o idénticas (por ejemplo, al menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia) a las secuencias desveladas en el presente documento también se incluyen en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad" se refiere al grado en que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se parecen estructuralmente entre sí. Tal como se usa en el presente documento, la secuencia de "similitud" es una medida del grado en que las secuencias de aminoácidos comparten restos de aminoácidos similares en las posiciones correspondientes en una alineación de las secuencias. Los aminoácidos son similares entre sí donde sus cadenas laterales son similares. Específicamente, "similitud" abarca aminoácidos

que son sustitutos conservadores entre sí. A "conservative" substitution is any substitution that has a positive score in the blosum62 substitution matrix (Hentikoff and Hentikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Por la declaración "secuencia A es n % similar a la secuencia B" se entiende que n % de las posiciones de una alineación global óptima entre las secuencias A y B consiste en aminoácidos idénticos o sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras típicas son intercambios entre Met, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los restos Asp, Glu y Asn; entre los restos Gln, Lys y Arg; o los restos aromáticos Phe y Tyr.

Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a una unidad de estructura unida convencionalmente por una par V_H/V_L de inmunoglobulina. Los epítipos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por lo tanto, representan la diana de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio, un epítipo representa la unidad de estructura unida por un anticuerpo de dominio de forma aislada. Esto es, el sitio de unión es proporcionado por un único dominio variable de inmunoglobulina simple. Los epítipos pueden ser lineales o conformacionales, y pueden ser tan pequeños como de tres aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, la "actividad CD28" es una actividad que implica o resulta de la unión de CD80, CD86 y/u otro ligando a CD28, e incluye, aunque no de forma limitativa, la activación de la señalización celular mediada por CD28. La actividad de CD28 también incluye la inducción de proliferación de linfocitos T y la inducción de la secreción de citocinas, por ejemplo, interleucina 2 (IL-2), por linfocitos T.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "no agoniza sustancialmente" significa que un agente dado, por ejemplo, un anticuerpo de dominio, no activa sustancialmente una o más de las actividades de CD28 ya que el término "activar" se define en el presente documento. Específicamente, un agente que "no agoniza sustancialmente" significa que el agente no activa más del 20 % de la actividad que se activa mediante la unión de CD80 y/o CD86 a CD28, y, en un aspecto, el agente no activa más de aproximadamente el 10 %, 8 %, 5 %, 3 % o 2 % o menos, incluyendo activación cero, de la actividad que se activa mediante la unión de CD80 y/o CD86 a CD28. A modo de ejemplo no limitativo, un anticuerpo de dominio expuesto en el presente documento que no agoniza sustancialmente la actividad de CD28 no agoniza la actividad de CD28 más del 5 % de la actividad obtenida tras el agonismo de la actividad de CD28 por el mAb 9.3 anti-CD28 (Gibson, et al. (1996) JBC, 271: 7079-7083) en condiciones de ensayo por lo demás idénticas.

Tal como se usa en el presente documento, Los términos "inhibir", "inhibe" e "inhibido" se refieren a una disminución en una actividad mensurable dada (por ejemplo, actividad de unión) en al menos un 10 % con respecto a una referencia. Cuando se desea la inhibición, tal inhibición es al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, hasta el 100 %, incluido, es decir, inhibición completa o ausencia de la actividad dada. La inhibición de la unión de CD28 a CD80 o CD86 se puede medir como se describe en los ejemplos de trabajo en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe sustancialmente" se refiere a una disminución en una actividad mensurable dada (por ejemplo, la unión de CD28 a CD80 o CD86) en al menos un 50 % con respecto a una referencia. Por ejemplo, "inhibe sustancialmente" se refiere a una disminución en una actividad mensurable dada de al menos aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, y hasta 100 %, incluido, con respecto a una referencia. Tal como se usa en el presente documento, "inhibe la unión", con referencia a la unión de un anticuerpo de dominio que se une a CD28, o la unión de CD80 a CD28, o la unión de CD86 a CD28, se refiere a una disminución de la unión en al menos un 10 % con respecto a una referencia. "Inhibe la unión" se refiere a una disminución en la unión de al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, hasta 100 %, incluido.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "activar", "activa" y "activado" se refieren a un aumento en una actividad mensurable dada en al menos un 5 % en relación con una referencia, por ejemplo, al menos un 10 %, 25 %, 50 %, un 75 % o incluso un 100 % o más.

Tal como se usa en el presente documento, el término "monovalente" significa que un anticuerpo de dominio dado puede unirse solo a una molécula de su objetivo. Los anticuerpos de origen natural son, generalmente, divalentes, en el sentido de que tienen dos bucles de unión a antígeno funcionales, cada uno de los cuales comprende un dominio V_H y un dominio V_L . Cuando el impedimento estérico no es un problema, un anticuerpo divalente puede unir dos moléculas separadas del mismo antígeno. Por el contrario, un anticuerpo "monovalente" tiene la capacidad de unirse solo a una de esas moléculas de antígeno. Tal como se usa el término en el presente documento, un anticuerpo "monovalente" también puede comprender más de un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, dos sitios de unión a antígeno, pero los sitios de unión deben ser para diferentes antígenos, de manera que el anticuerpo solo puede unirse a una molécula de CD28 a la vez. El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monovalente puede comprender un dominio V_H y un dominio V_L , pero en un aspecto, comprende solo un único dominio variable de inmunoglobulina, es decir, un dominio V_H o un dominio V_L , que tiene la capacidad de unirse a CD28 sin la necesidad de un dominio V_L o V_H correspondiente, respectivamente. Un anticuerpo monovalente carece de la capacidad de cruzar moléculas de un solo antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "dominio V_H " y "dominio V_L " se refieren a regiones variables de inmunoglobulina como definen Kabat et al. (Kabat et al. (1991) Sequences of Immunological Interest, 5ª ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.).

Tal como se usa en el presente documento, "unido" se refiere a la unión de un resto polimérico, tal como PEG, a un resto de aminoácido de un anticuerpo de dominio. Unión de un polímero PEG a un resto de aminoácido de un anticuerpo de dominio, por ejemplo, un anticuerpo de dominio, se conoce como "PEGilación" y se puede lograr utilizando varios restos de unión a PEG, que incluyen, pero sin limitaciones, éster activo de N-hidroxilsuccinimida (NHS), propionato de succinimidilo (SPA), maleimida (MAL), vinilsulfona (VS) o tiol. Un polímero PEG, u otro polímero, se puede unir a un anticuerpo de dominio en una posición predeterminada o se puede unir aleatoriamente a la molécula de anticuerpo de dominio. El polímero PEG puede estar unido a un anticuerpo de dominio en una posición predeterminada. Un polímero PEG puede estar el resto PEG puede unirse a cualquier resto en un anticuerpo de dominio, sin embargo, es preferente que el polímero esté unido a lisina o cisteína, que es de origen natural en el anticuerpo de dominio o que se ha modificado por ingeniería en el anticuerpo de dominio, por ejemplo, mediante mutagénesis de un resto de origen natural en el anticuerpo de dominio a cisteína o lisina. La unión-PEG también puede estar mediada a través de un enlazador peptídico unido a un anticuerpo de dominio. Esto es, el resto de PEG puede unirse a un enlazador peptídico fusionado con un anticuerpo de dominio, en el que el enlazador proporciona el sitio, por ejemplo, una cisteína o lisina libre, para la unión a PEG. Tal como se usa en el presente documento, "unido" también puede hacer referencia a la asociación de dos o más anticuerpos de dominio, por ejemplo, monómeros de dAb, para formar un dímero, trímero, tetrámero u otro multímero. Los monómeros de anticuerpo de dominio se pueden unir para formar un multímero mediante varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, la expresión de los monómeros de anticuerpo de dominio como una proteína de fusión, unión de dos o más monómeros a través de un enlazador peptídico entre monómeros, o mediante la unión química postraducciona de monómeros, ya sea directamente entre sí, o a través de un enlazador por enlaces disulfuro, o por enlace a un resto de unión divalente, trivalente o multivalente (por ejemplo, un PEG-multi-brazos). Aunque los multímeros de dAb se contemplan específicamente en el presente documento, por ejemplo, en el contexto de construcciones de anticuerpo de dominio doble o multiespecífico, se subraya que para cualquier construcción de anticuerpo de dominio, la construcción no solo debe ser capaz de unirse a una molécula de CD28, es decir, las construcciones deben tener solo un elemento de unión a CD28 y no debe reticular CD28.

Tal como se usa en el presente documento, "polímero" se refiere a una macromolécula compuesta por unidades monoméricas repetitivas y puede referirse a un polímero sintético o de origen natural, tal como un polialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, polímero de polialquilenilo o polioxilquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado. Un "polímero" como se usa en el presente documento, se refiere específicamente a un poli(etilenglicol) de cadena ramificada u opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol) o alcohol polivinílico y derivados de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, "PEG" o "polímero de PEG" se refiere a polietilenglicol y, más específicamente, puede referirse a una forma derivatizada de PEG, incluyendo, pero sin limitaciones, ésteres activos de N-hidroxilsuccinimida (NHS) de PEG, tales como el propionato de succinimidilo, ésteres activos de benzotriazol, PEG derivatizado con maleimida, vinilsulfonas o grupos tiol. Por ejemplo, las formulaciones de PEG pueden incluir PEG-O-CH₂CH₂CH₂-CO₂-NHS; PEG-O-CH₂-NHS; PEG-O-CH₂CH₂-CO₂-NHS; PEG-S-CH₂CH₂-CO-NHS; PEG-O₂CNH-CH(R)-CO₂-NHS; PEG-NHCO-CH₂CH₂-CO-NHS; y PEG-O-CH₂-CO₂-NHS; cuando R es (CH₂)₄NHCO₂(mPEG). Los polímeros de PEG expuestos en el presente documento pueden ser moléculas lineales o pueden ser ramificadas en las que están presentes múltiples restos de PEG en un solo polímero.

La unión de PEG u otro agente, por ejemplo, HSA, a un anticuerpo de dominio como se describe en el presente documento en una realización de ejemplo, no afectará a la capacidad del polipéptido para unirse específicamente a CD28. Esto es, el anticuerpo de dominio unido a PEG retendrá su actividad de unión con respecto a un homólogo no unido a PEG. Tal como se usa en el presente documento, "retiene la actividad" se refiere a un nivel de actividad de un anticuerpo de dominio unido a PEG que es al menos el 10 % del nivel de actividad de un anticuerpo de dominio no unido a PEG, incluyendo al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % y hasta 90 %, incluyendo hasta aproximadamente el 95 %, 98 % y hasta el 100 % de la actividad de un anticuerpo de dominio no unido a PEG que comprende el mismo dominio o dominios de unión a antígeno. De manera más específica, la actividad de un anticuerpo de dominio unido a PEG en comparación con un anticuerpo de dominio no unido a PEG debe determinarse sobre una base molar; es decir, se debe usar un número equivalente de moles de cada uno de los anticuerpos de dominio unidos a PEG y no unidos a PEG en cada ensayo. Al determinar si un anticuerpo de dominio unido a PEG particular "retiene actividad", la actividad de un anticuerpo de dominio unido a PEG puede compararse con la actividad del mismo anticuerpo de dominio en ausencia de PEG.

Tal como se usa en el presente documento, el término "CI₅₀" se refiere a la concentración de un inhibidor necesaria para inhibir una actividad dada en aproximadamente un 50 %. La CI₅₀ se determina analizando una actividad dada, por ejemplo, la unión de CD28 a CD80 o CD86, en presencia de cantidades variables del inhibidor (p. ej., anticuerpo de dominio) y trazar la concentración del inhibidor frente a la actividad objetivo. La unión de CD28 a CD80 o CD86 se mide en el presente documento mediante el método descrito en los ejemplos de trabajo. Como alternativa, se puede utilizar resonancia de plasmón superficial (SPR).

Tal como se usa en el presente documento, el término "CE₅₀" se refiere a la concentración de compuesto o anticuerpo de dominio que provoca una respuesta en un sujeto, en el que la respuesta está a medio camino entre la

respuesta basal y máxima. Las respuestas basales y máximas de un sujeto, con respecto a un compuesto o anticuerpo de dominio, se pueden determinar mediante cualquier técnica conocida en la materia.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "fusionado a un anticuerpo de dominio" generalmente significa que un polipéptido se fusiona a un anticuerpo dado mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, aunque la fusión puede producirse químicamente a nivel de proteína. Por tanto, un anticuerpo "fusionado con" otro polipéptido, por ejemplo, con otro anticuerpo de diferente especificidad de unión, no existe en la naturaleza y se genera por medios recombinantes. La expresión "fusionado con un anticuerpo de dominio" también abarca el enlace de un polipéptido a un anticuerpo de dominio dado a través de, por ejemplo, disulfuro u otros enlaces químicos, cuando el polipéptido fusionado no se encuentra fusionado de forma natural con el anticuerpo de dominio. Los métodos recombinantes y químicos para fusionar un polipéptido a otro polipéptido, por ejemplo, a un anticuerpo, son bien conocidos en la técnica.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio Fc" se refiere a las secuencias de anticuerpos de región constante que comprenden dominios constantes CH2 y CH3 delimitados de acuerdo con Kabat et al, *citado anteriormente*. La porción Fc del polipéptido de la cadena pesada tiene la capacidad de autoasociarse, una función que facilita la formación de anticuerpos divalentes. La expresión "carece de un dominio Fc" significa que un anticuerpo de dominio dado carece al menos de la porción de un dominio Fc de inmunoglobulina (como dichos dominios se definen de acuerdo con Kabat et al., 1991, *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.) suficiente para mediar la dimerización de los anticuerpos de dominio que contiene Fc. Se mide la dimerización de los anticuerpos de dominio que contiene Fc, por ejemplo, por métodos cromatográficos o por resonancia de plasmón superficial. Un anticuerpo de dominio que carece de un dominio Fc evita las interacciones Fc-plaquetas y, por lo tanto, evita la inducción de la agregación plaquetaria.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "marco universal" se refiere a una secuencia de marco de anticuerpo único que corresponde a las regiones de un anticuerpo conservado en secuencia según lo definido por Kabat (Kabat et al. (1991) *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.) o correspondiente al repertorio o estructura de inmunoglobulina de la línea germinal humana según lo definido por Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 910-917. El uso de un marco único, o un conjunto de dichos marcos, que se ha descubierto que permite la derivación de prácticamente cualquier especificidad de unión a través de la variación solo en las regiones hipervariables, se incluye en el presente documento.

35 El término "aproximadamente" será entendido por personas expertas en la materia y variará hasta cierto punto en función del contexto en el que se utilice. En general, aproximadamente engloba un intervalo de valores que son más/menos el 10 % de un valor de referencia.

2. Anticuerpos de dominio anti-CD28

40 La presente divulgación se refiere a anticuerpos de dominio que se unen e inhiben específicamente a CD28 humano ("anticuerpos de dominio anti-CD28") y que son útiles en el tratamiento de enfermedades que implican la ruta de CD28. En consecuencia, se proporciona un método para tratar una enfermedad inmunológica en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de dominio anti-CD28.

45 Se desvelan anticuerpos de dominio que son monovalentes para unirse a CD28. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la monovalencia para la unión a CD28 elimina la posibilidad de reticulación de los receptores de la superficie celular que se produce con los anticuerpos de la técnica anterior. Por tanto, en un aspecto, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento no solo inhiben o antagonizan la unión de CD80 o CD86 a CD28, no agonizan sustancialmente la actividad de CD28.

50 En un aspecto desvelado en el presente documento, los anticuerpos monovalentes para la unión a CD28 son anticuerpos de dominio humanos. Los anticuerpos de dominio humanos pueden administrarse a pacientes humanos evitando en gran medida la respuesta inmunitaria anti-anticuerpo, a menudo provocada por la administración de anticuerpos de otras especies, por ejemplo, de ratón. Mientras que los anticuerpos murinos pueden "humanizarse" injertando dominios constantes humanos en los dominios de unión a antígeno murino, los anticuerpos humanos como se desvelan en el presente documento se producen sin la necesidad de una manipulación genética laboriosa y lenta de una secuencia de anticuerpos murinos.

60 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de dominio pueden incluir una o más de las siguientes CDR:

CDR1: **RASRPIWPFLE** (SEQ ID NO: 1)

CDR2: **FTSRLRH** (SEQ ID NO: 2)

CDR3: **LQNVANPAT** (SEQ ID NO: 3)

En una realización, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento tienen una

secuencia CDR1 que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la CDR1 desvelada en el presente documento difiere de la SEQ ID NO: 1 en hasta 5 aminoácidos (por ejemplo, en 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos).

- 5 En una realización, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento tienen una secuencia CDR2 que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. En otra realización, la CDR2 desvelada en el presente documento difiere de la SEQ ID NO: 2 en hasta 5 aminoácidos (por ejemplo, en 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos).
- 10 En una realización, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento tienen una secuencia CDR3 que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3. En otra realización, la CDR3 desvelada en el presente documento difiere de la SEQ ID NO: 3 en hasta 5 aminoácidos (por ejemplo, en 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos).
- 15 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 4-15. En otra realización, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento difieren de la secuencia de aminoácidos seleccionada en hasta 5 aminoácidos. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio difiere de la SEQ ID NO: 12 en hasta 5 aminoácidos (por ejemplo, en 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos).
- 20

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 4-15. En una realización específica, el anticuerpo de dominio anti-CD28 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.

- 25 Ciertas secuencias de ejemplo de los anticuerpos de dominio anti-CD28 se proporcionan a continuación.

1h-239-891 (SEQ ID NO: 4):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASRPIWPFLEWY**QQKPGKAPKLLIY**FTSRLRHGVP**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCLQNVANPAT**FSQGTKVEIKR

30

1h-239-891(Q3C) (SEQ ID NO: 5):

DI**C**MTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASRPIWPFLEWY**QQKPGKAPKLLIY**FTSRLRHGVP**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCLQNVANPAT**FSQGTKVEIKR

1h-239-891(S9C) (SEQ ID NO: 6):

DIQMTQSP**S**LSASVGDRVTITC**RASRPIWPFLEWY**QQKPGKAPKLLIY**FTSRLRHGVP**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCLQNVANPAT**FSQGTKVEIKR

35

1h-239-891(R18C) (SEQ ID NO: 7):

DIQMTQSPSSLSASVGDCVTITC**RASRPIWPFLEWY**QQKPGKAPKLLIY**FTSRLRHGVP**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCLQNVANPAT**FSQGTKVEIKR

40

1h-239-891(G41C) (SEQ ID NO: 8):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASRPIWPFLEWY**QQK**P**CKAPKLLIY**FTSRLRHGVP**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCLQNVANPAT**FSQGTKVEIKR

1h-239-891 (K42C) (SEQ ID NO: 9):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASRPIWPFLEWY**QQKPG**C**APKLLIY**FTSRLRHGVP**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYCLQNVANPAT**FSQGTKVEIKR

45

1h-239-891 (K45C) (SEQ ID NO: 10):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP**IWP**FLEWYQQKPGKAPCLLIY**FTSRLRH**GVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQNVANPATFSQGTKVEIKR

1h-239-891(S60C) (SEQ ID NO: 11):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP**IWP**FLEWYQQKPGKAPKLLIY**FTSRLRH**GVP
CRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQNVANPATFSQGTKVEIKR

5

1h-239-891(D70C) (SEQ ID NO: 12):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP**IWP**FLEWYQQKPGKAPKLLIY**FTSRLRH**GVP
 SRFSGSGSGTCFTLTISSLQPEDFATYYCLQNVANPATFSQGTKVEIKR

1h-239-891(T74C) (SEQ ID NO: 13):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP**IWP**FLEWYQQKPGKAPKLLIY**FTSRLRH**GVP
 SRFSGSGSGTDFTLCISSLQPEDFATYYCLQNVANPATFSQGTKVEIKR

10

1h-239-891(Q79C) (SEQ ID NO: 14):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP**IWP**FLEWYQQKPGKAPKLLIY**FTSRLRH**GVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLCPEDFATYYCLQNVANPATFSQGTKVEIKR

15

1h-239-891(K103C) (SEQ ID NO: 15):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP**IWP**FLEWYQQKPGKAPKLLIY**FTSRLRH**GVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQNVANPATFSQGTCVEIKR

En determinadas realizaciones específicas, el anticuerpo de dominio anti-CD28 puede comprender 1h-239-891 (D70C) (SEQ ID NO:543). El anticuerpo de dominio anti-CD28 puede comprender un polietilenglicol ramificado de 40 kDa. El anticuerpo de dominio anti-CD28 puede ser BMS-931699. Por ejemplo, BMS-931699 es un potente inhibidor de la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas, con una CE₅₀ de 35 ± 14 ng/ml y 25 ± 6 ng/ml, respectivamente. BMS-908613-P40B (un sustituto de macaco para BMS-931699) es equipotencial en la inhibición de la proliferación de linfocitos T impulsadas tanto por CD80 como por CD86. Es importante destacar que, con BMS-931699 se observó ausencia de actividad agonista o coagonista, medida por la proliferación de linfocitos T o la liberación de citocinas.

En una realización, la unión de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento a CD28 no agoniza sustancialmente la actividad de CD28. En particular, los dAb desvelados en el presente documento no agonizan la señalización de CD28 en combinación con la señalización del receptor de linfocitos T. En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD28 a CD80. En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD28 a CD80, y no agonizan sustancialmente la señalización por CD28. En otra realización más, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD28 a CD86. En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD28 a CD86, y no agonizan sustancialmente la señalización por CD28.

En un aspecto, los dAb desvelados en el presente documento no inducen sustancialmente la proliferación de linfocitos T en combinación con la señalización del receptor de linfocitos T. En otro aspecto, los dAb desvelados en el presente documento no inducen sustancialmente la secreción de citocinas por las linfocitos T en combinación con la señalización del receptor de linfocitos T. En una realización desvelada en el presente documento, una citocina es al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 IL-13, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, IL-24, TGFβ, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ.

En un aspecto desvelado en el presente documento, porque los anticuerpos humanos evitarán la generación de una respuesta inmunológica a los anticuerpos cuando se administran a sujetos humanos para el tratamiento o prevención de enfermedades, el anticuerpo de dominio es un anticuerpo de dominio humano que se une

monovalentemente a CD28, y en una realización de ejemplo, sin agonizar sustancialmente la actividad de CD28.

En una realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento interactúan con CD28 humano con una K_d en el intervalo de 50 nM a 1 pM, incluidos, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, la K_d para CD28 humano puede ser de 25 nM a 20 pM, de 10 nM a 20 pM, de 5 nM a 20 pM, de 1 nM a 20 pM, de 0,5 nM a 20 pM, de 0,1 nM a 20 pM, de 0,1 nM a 50 pM, de 75 pM a 20 pM, o incluso de 50 pM a 20 pM. En una realización desvelada en el presente documento, la K_d para CD28 humano es de aproximadamente 50 pM.

En una realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD80 a CD28 con una CE_{50} de 50 nM o menos. En una realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD86 a CD28 con una CE_{50} de 50 nM o menos. En una realización adicional, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento tienen especificidad de unión a CD28 con una constante de disociación K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, o $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ o menos, tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial. En una realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento neutralizan CD28 en un ensayo estándar con una CE_{50} de 50 nM o menos.

En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento comprenden un dominio variable de inmunoglobulina único que se une a CD28. En una realización, el dominio variable de inmunoglobulina sencilla desvelado en el presente documento es un dominio de V_H o V_L . En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento comprenden un homomultímero o heteromultímero de dos dominios variables, por ejemplo, un dominio V_H y V_L , pero uno de los dominios variables tiene la capacidad de unirse a CD28 sin la necesidad de un dominio V_L o V_H correspondiente. Esto es, el dAb se une a un antígeno independientemente de los dominios V_H o V_L adicionales. Los dominios variables en estas realizaciones pueden comprender tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento están libres de un dominio Fc. Los límites de un dominio Fc se establecen en Kabat et al. (1991, *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed. U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C.). Como alternativa, un dominio Fc consiste en las regiones CH2-CH3, que opcionalmente incluyen una región bisagra unida a CH2.

En un aspecto, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento comprenden un marco universal. En este aspecto, un anticuerpo de dominio desvelado en el presente documento puede comprender una o más regiones marco que comprenden una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos de una región marco correspondiente (FW) codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o la secuencia de aminoácidos de uno o más de dichas regiones marco que comprenden colectivamente hasta 5, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4 o 5, diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha región marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana.

En una realización, los dAb desvelados en el presente documento comprenden secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 que corresponden a FW1, FW2, FW3 y FW4 de un anticuerpo humano, por ejemplo, un anticuerpo de línea germinal humana. En una realización adicional, algunas o todas las secuencias de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por segmentos génicos de anticuerpos de línea germinal humana. Por ejemplo, FW2 puede ser idéntica a la FW2 de un anticuerpo humano. En otra realización desvelada en el presente documento, las secuencias de aminoácidos de las regiones FW1, FW2, FW3 y FW4 contienen colectivamente hasta 10 diferencias de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por dicho segmento génico de anticuerpo de línea germinal humana. En una realización más de lo anterior, el segmento génico del anticuerpo de la línea germinal humana se puede seleccionar del grupo que consiste en DP47, DP45, DP48 e DPK9. En una realización desvelada en el presente documento, el marco universal comprende un marco V_H seleccionado del grupo que consiste en DP47, DP45 y DP38, y/o el marco V_L es DPK9.

En un aspecto, un anticuerpo de dominio desvelado en el presente documento está formateado para aumentar su semivida *in vivo*. En particular, el anticuerpo de dominio tiene una semivida *in vivo* aumentada de t- α o t- β en relación con el mismo anticuerpo de dominio sin formatear.

En una realización, la semivida de t α de la composición de anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en un 10 % o más en comparación con una proteína no modificada analizada en condiciones idénticas. En otra realización, la semivida de t α de la composición de anticuerpos de dominio desvelada en el presente documento aumenta en un 50 % o más. En otra realización, la semivida de t α de la composición de anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en 2X o más. En otra realización, la semivida de t α de la composición del anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en 5X o más, por ejemplo, 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X, 50X o más. En otra realización, la semivida de t α de la composición del anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en 100X, 200X, 300X, 400X, 500X o más.

En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento tienen una semivida de t α de

0,25 a 6 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{α} está en el intervalo de 30 minutos a 12 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{α} del anticuerpo de dominio está en el intervalo de 1 a 6 horas.

5 En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento aumenta en un 10 % o más en comparación con una proteína no modificada analizada en condiciones idénticas. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento aumenta en un 50 % o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio de anticuerpos desvelados en el presente documento aumenta en 2X o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento aumenta en 5X o más, por ejemplo, 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento aumenta en 50X o más.

15 En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento tienen una semivida de t_{β} de 1 hora a 744 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{β} está en el intervalo de 12 a 48 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{β} está en el intervalo de 12 a 26 horas, inclusive. En otra realización más desvelada en el presente documento, la semivida de t_{β} es de aproximadamente 336 horas.

20 Además de, o como alternativa a los criterios anteriores, en el presente documento se desvela una composición que contiene anticuerpo de dominio que comprende un ligando que tiene un valor de AUC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg/ml o más. En una realización desvelada en el presente documento, el extremo inferior del intervalo es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mgmin/ml. Además, o como alternativa, un ligando o composición tiene un AUC en el intervalo de hasta 600 mgmin/ml. En una realización desvelada en el presente documento, el extremo superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mgmin/ml. Ventajosamente, un ligando tendrá una AUC en el intervalo seleccionado del grupo que consiste en los siguientes: de 15 a 150 mgmin/ml, de 15 a 100 mgmin/ml, de 15 a 75 mgmin/ml y de 15 a 50 mgmin/ml.

30 En otra realización desvelada en el presente documento, el formateo comprende la PEGilación del dAb. En una realización desvelada en el presente documento, el PEG se une covalentemente. En otra realización, el PEG está unido a los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento en un resto de cisteína o lisina. En otra realización más, los anticuerpos de dominio unidos a PEG desvelados en el presente documento tienen un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD. En otra realización más desvelada en el presente documento, el tamaño total del PEG es de 20 a 60 kD, inclusive. En otra realización más desvelada en el presente documento, el anticuerpo de dominio ligado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD.

40 En otra realización, los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento tienen una semivida *in vivo* aumentada en relación con la misma composición de polipéptido que carece de polietilenglicol ligado. En otra realización, la semivida de t_{α} de la composición de anticuerpos de dominio desvelada en el presente documento aumenta en un 10 % o más. En otra realización, la semivida de t_{α} de la composición de anticuerpos de dominio desvelada en el presente documento aumenta en un 50 % o más. En otra realización, la semivida de t_{α} de la composición de anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en 2X o más. En otra realización, la semivida de t_{α} de la composición del anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en 5X o más, por ejemplo, 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X, 50X o más. En otra realización, la semivida de t_{α} de la composición del anticuerpo de dominio desvelada en el presente documento aumenta en 100X, 200X, 300X, 400X, 500X o más.

50 En otra realización, los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento tienen una semivida t_{α} de 0,25 a 6 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{α} está en el intervalo de 30 minutos a 12 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{α} del anticuerpo de dominio está en el intervalo de 1 a 6 horas.

55 En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento aumenta en un 10 % o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento aumenta en un 50 % o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento aumenta en 2X o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento aumenta en 5X o más, por ejemplo, 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 40X o más. En otra realización, la semivida de t_{β} de los anticuerpos de dominio ligado a PEG desvelados en el presente documento aumenta en 50X o más.

60 En otra realización, los anticuerpos de dominio ligados a PEG desvelados en el presente documento tienen una semivida de t_{β} de 1 a 170 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{β} está en el intervalo de 12 a 48 horas, inclusive. En otra realización desvelada en el presente documento, la semivida de t_{β} está en el intervalo de 12 a 26 horas, inclusive.

65 En otra realización, los anticuerpos de dominio ligados a PEG desvelados en el presente documento tienen un valor

de AUC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg.min/ml o más. En una realización desvelada en el presente documento, el extremo inferior del intervalo es aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mgmin/ml. Además, o como alternativa, un ligando o composición tiene un AUC en el intervalo de hasta aproximadamente 600 mg/ml. En una realización desvelada en el presente documento, el extremo superior del intervalo es de

5 aproximadamente 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mgmin/ml. Ventajosamente, un ligando tendrá una AUC en el intervalo seleccionado del grupo que consiste en los siguientes: de aproximadamente 15 a 150 mgmin/ml, de aproximadamente 15 a 100 mgmin/ml, de aproximadamente 15 a 75 mgmin/ml y de aproximadamente 15 a 50 mgmin/ml.

10 Los dAb desvelados en el presente documento pueden inhibir la unión de CD28 a CD80 y/o CD86 con una CE₅₀ de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 1 pM. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD28 a CD80 con una CE₅₀ en el intervalo de 1 pM a 1,5 µM, ambos incluidos; una CE₅₀ para la inhibición

15 de CD28 a CD80. La CE₅₀ puede estar en el intervalo de 1 pM a 1 µM, de 1 pM a 900 nM, de 1 pM a 800 nM, de 1 pM a 700 nM, de 1 pM a 600 nM, de 1 pM a 500 nM, de 1 pM a 400 nM, de 1 pM a 300 nM, de 1 pM a 200 nM, de 1 pM a 100 nM, de 1 pM a 50 nM, de 1 pM a 10 nM, de 1 pM a 1 nM, de 1 pM a 500 pM, de 1 pM a 100 pM, de 1 pM a 50 pM, de 1 pM a 10 pM o de 1 pM a 5 pM. Otros intervalos aceptables incluyen, por ejemplo, de 50 pM a 1 µM, de 100 pM a 500 nM, de 125 pM a 250 nM, de 150 pM a 200 nM, de 150 pM a 100 nM y de 200 pM a 50 nM.

20 En otra realización, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento inhiben la unión de CD28 a CD86 con una CE₅₀ en el intervalo de 1 pM a 1,5 µM, ambos incluidos; una CE₅₀ para la inhibición de CD28 a CD86. La CE₅₀ puede estar en el intervalo de 1 pM a 1 µM, de 1 pM a 900 nM, de 1 pM a 800 nM, de 1 pM a 700 nM, de 1 pM a 600 nM, de 1 pM a 500 nM, de 1 pM a 400 nM, de 1 pM a 300 nM, de 1 pM a 200 nM, de 1 pM a 100 nM, de 1 pM a 50 nM, de 1 pM a 10 nM, de 1 pM a 1 nM, de 1 pM a 500 pM, de 1 pM a 100 pM, de 1 pM a 50 pM, de 1 pM a 10 pM o de 1 pM a 5 pM. Otros intervalos aceptables incluyen, por ejemplo, de 50 pM a 1 µM, de 100 pM a 500 nM, de 125 pM a 250 nM, de 150 pM a 200 nM, de 150 pM a 100 nM y de 200 pM a 50 nM.

25 Los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento pueden comprender una o más regiones marco que comprenden una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos de una región marco correspondiente codificada por un segmento génico de anticuerpo de la línea germinal humana, o las secuencias de aminoácidos de uno o más de dichas regiones marco colectivamente comprenden hasta 5 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha región marco correspondiente codificada por un segmento génico de anticuerpo de la línea germinal humana.

30 En una realización, las secuencias de aminoácidos de las regiones FW1, FW2, FW3 y FW4 de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por un segmento génico de anticuerpo de línea germinal humana o las secuencias de aminoácidos de las regiones FW1, FW2, FW3 y FW4 contienen colectivamente hasta 10 diferencias de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por dicho segmento génico de anticuerpo de línea germinal humana.

35 En una realización, las secuencias de aminoácidos de dichas regiones FW1, FW2 y FW3 de los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones marco correspondientes codificadas por segmentos génicos de anticuerpos de línea germinal humana. Los segmentos génicos del anticuerpo de la línea germinal humana pueden seleccionarse del grupo que consiste en DP47, DP45, DP48 e DPK9.

3. Usos de anticuerpos de dominio

40 Los anticuerpos de dominio como se describen en el presente documento son útiles para antagonizar la actividad de CD28. Por lo tanto, los anticuerpos de dominio como se describen en el presente documento pueden usarse para tratar a un paciente que tiene una afección, enfermedad o trastorno mediado en todo o en parte por la actividad de CD28. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio como se describen en el presente documento son útiles para el

45 tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en los que está implicada la activación inapropiada de una ruta mediada por CD28, tal como lupus eritematoso sistémico (LES).

50 Tal como se usa en el presente documento "tratar", "reducir", "prevenir" o "aliviar" en lo que se refiere a un síntoma de enfermedad se refiere a una disminución de un síntoma en al menos un 10 % en función de un parámetro clínicamente mensurable, o en al menos un punto en una escala de enfermedad clínicamente aceptada o gravedad de los síntomas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "síntoma(s) de lupus eritematoso sistémico" se refiere a cualquiera de los síntomas clínicamente relevantes de LES conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, aunque no de forma limitativa, BICLA (evaluación de lupus compuesto basado en BILAG), SRI (Índice de respuesta al lupus eritematoso sistémico). Los ejemplos no limitantes incluyen la acumulación de autoanticuerpos IgG (por ejemplo, contra antígenos nucleares, tales como cromatina, snRNP (especialmente U1, Sm, Ro/SSA y La/SSB), fosfolípidos y moléculas de la superficie celular), anemia hemolítica, trombocitopenia,

leucopenia, glomerulonefritis, vasculitis, artritis y serositis). Una reducción en tal síntoma de un paciente es una reducción de al menos un 10 % en un parámetro clínicamente mensurable o en al menos un punto en una escala clínicamente aceptada de gravedad de la enfermedad, en comparación con un paciente tratado con un placebo.

5 En un aspecto, las enfermedades autoinmunes implican frecuentemente una regulación o actividad inapropiada de las rutas de CD28. La administración de un anticuerpo de dominio como se describe en el presente documento a un individuo que padece dicha enfermedad, incluyendo una enfermedad autoinmune, puede reducir uno o más síntomas de la enfermedad. Los ejemplos no limitantes de enfermedades para las que los anticuerpos de dominio descritos en el presente documento pueden ser terapéuticamente útiles incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Addison, alergia, espondilitis anquilosante, asma, aterosclerosis, enfermedades autoinmunitarias del oído, enfermedades autoinmunitarias del ojo, gastritis atrófica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, anititis linfocítica benigna, colitis, arteriopatía coronaria, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), diabetes, incluyendo la diabetes tipo 1 y/o tipo 2, epididimitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), respuesta inmunitaria a productos farmacéuticos recombinantes, por ejemplo, factor VII en la hemofilia, lupus eritematoso sistémico, nefritis por lupus, infertilidad masculina, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, mixedema primario, pénfigo, anemia perniciosa, polimiositis, psoriasis, artritis psoriásica, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, oftalmia del simpático, linfoma de linfocitos T, Leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, linfoma de linfocitos T antiocéntrico testicular, tiroiditis, rechazo de trasplantes, colitis ulcerosa, uveítis autoinmune y vasculitis. Las afecciones autoinmunitarias incluyen, aunque sin limitación, afecciones en las que el tejido afectado es la diana principal y, en algunos casos, la diana secundaria. Dichas afecciones incluyen, aunque sin limitación, SIDA, alergia atópica, asma bronquial, eccema, lepra, esquizofrenia, depresión hereditaria, trasplante de tejidos y órganos, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, infarto de miocardio, ictus, autismo, epilepsia, fenómeno de Arthus, anafilaxia y adicción al alcohol y las drogas.

Los anticuerpos de dominio descritos en el presente documento también pueden ser terapéuticamente útiles en enfermedades relacionadas con el injerto, tal como la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), rechazo agudo de un trasplante y rechazo crónico de un trasplante.

La presente invención se refiere a un anticuerpo de dominio anti-CD28 para usar en un método de tratamiento del lupus eritematoso sistemático (LES) en un paciente. El paciente que recibe un anticuerpo de dominio anti-CD28 puede tener síntomas de LES disminuidos en comparación con un paciente que recibe placebo. Por ejemplo, el paciente que recibe un anticuerpo de dominio anti-CD28 puede tener niveles más bajos de C3, C4, anti-ADNbc y/o anti-ANA en comparación con un paciente que recibe placebo. Por ejemplo, el paciente que recibe un anticuerpo de dominio anti-CD28 puede tener síntomas de artritis disminuidos en comparación con un paciente que recibe placebo. Por ejemplo, el paciente que recibe un anticuerpo de dominio anti-CD28 puede tener síntomas de enfermedad inflamatoria de la piel disminuidos en comparación con un paciente que recibe placebo.

Un tratamiento desvelado en el presente documento puede comprender además administrar un agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio. Un tratamiento desvelado en el presente documento puede administrarse en combinación con un agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio. Tales agentes o terapias inmunosupresores/inmunomoduladores y/o antiinflamatorios adicionales pueden comprender un inhibidor de la calcineurina, ciclosporina, citoxano, prednisona, azatioprina, metotrexato, corticoesteroides, antiinflamatorios no esteroideos/inhibidores de la Cox-2, hidroxiclороquina, sulfasalazoprina, sales de oro, etanercept, infliximab, anakinra, mizoribina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetilo, interferón beta-la, interferón beta-lb, acetato de glatiramer, clorhidrato de mitoxantrona y/u otros agentes biológicos como anti-TNF. Los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento también pueden administrarse en combinación con uno o más de los siguientes agentes para regular una respuesta inmunitaria: CTLA4, gp39 soluble (también conocido como ligando de CD40 (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), CD29 soluble, CD40 soluble, CD80 soluble, CD86 soluble, CD56 soluble, Thy-1 soluble, CD3 soluble, TCR soluble, VLA-4 soluble, VCAM-1 soluble, LECAM-1 soluble, ELAM-1 soluble, CD44 soluble, anticuerpos reactivos con gp39, anticuerpos reactivos con CD40, anticuerpos reactivos con B7, anticuerpos reactivos con CD28, anticuerpos reactivos con LFA-1, anticuerpos reactivos con LFA-2, anticuerpos reactivos con IL-2, anticuerpos reactivos con IL-12, anticuerpos reactivos con IFN-gamma, anticuerpos reactivos con CD2, anticuerpos reactivos con CD48, anticuerpos reactivos con cualquier ICAM (por ejemplo, ICAM-2), anticuerpos reactivos con CTLA4, anticuerpos reactivos con Thy-1, anticuerpos reactivos con CD56, anticuerpos reactivos con CD3, anticuerpos reactivos con CD29, anticuerpos reactivos con TCR, anticuerpos reactivos con VLA-4, anticuerpos reactivos con VCAM-1, anticuerpos reactivos con LECAM-1, anticuerpos reactivos con ELAM-1, anticuerpos reactivos con CD44, anticuerpos monoclonales frente a los receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos.

Cuando los anticuerpos de dominio para su uso según la invención se administran en combinación con otro agente o terapia inmunosupresor/inmunomodulador o antiinflamatorio, por ejemplo, como se ha especificado anteriormente, la administración puede hacerse concomitantemente o en secuencia. Cuando los dAb se administran

concomitantemente con otro agente, tal como un agente especificado anteriormente, el dAb y el agente pueden administrarse en la misma composición farmacéutica.

5 Un tratamiento desvelado en el presente documento puede producir al menos un efecto terapéutico mensurable por un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en: ocupación del receptor CD28 en linfocitos T, C3, C4, anti-ADNbc, anti-ANA, autoanticuerpos anti-Ro, autoanticuerpos anti-La, autoanticuerpos anti-RNP, autoanticuerpos anti-Sm, autoanticuerpos anti-APL, CRP, IgG total, IgM total, transcritos de ARN en sangre completa, NGAL en orina, TWEAK en orina, MCP-1 en orina, IL-18 en orina, IL-1 en orina, CD28 soluble total, Activación de linfocitos T, CD4 de superficie de leucocitos, CD8 de superficie de leucocitos, CD28 de superficie de leucocitos, CD57 de superficie de leucocitos y granzima B intracelular de leucocitos, IL-6 sérica, IL-18 sérica, TNF- α sérico, α -interferón sérico, BLYS sérico (BAFF), CD154, sCD28 y microvesículas.

4. Composiciones farmacéuticas, Dosificación y administración

15 Los anticuerpos de dominio anti-CD28 desvelados en el presente documento pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Por lo general, la composición farmacéutica comprende el anticuerpo de dominio y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" excluye el medio de cultivo de tejidos que comprende suero bovino o equino. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Las sustancias farmacéuticamente aceptables incluyen cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la efectividad del anticuerpo de dominio.

30 Las composiciones como se describen en el presente documento pueden estar en diversas formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tal como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. Un modo de administración es parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular).

40 Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen el secado al vacío y el secado en frío que producen un polvo del principio activo más cualquier principio activo adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. Se puede mantener la fluidez adecuada de una solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

50 Los anticuerpos de dominio descritos en el presente documento pueden administrarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas. El polipéptido puede administrarse por vía intravenosa (IV), inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC).

55 Como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En determinadas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un transportador que protegerá al compuesto contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Los anticuerpos de dominio son muy adecuados para la formulación como preparaciones de liberación prolongada debido, en parte, a su pequeño tamaño, el número de moles por dosis puede ser significativamente mayor que la dosis de, *por ejemplo*, anticuerpos de tamaño completo. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Se puede lograr la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Se describen métodos

adicionales aplicables a la liberación controlada o extendida de agentes polipeptídicos, tales como los anticuerpos de dominio monovalente desvelados en el presente documento, en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.306.406 y 6.346.274, así como, por ejemplo, en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º US20020182254 y US20020051808. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio desvelados en el presente documento
5 pueden formularse en una composición farmacéutica para administración subcutánea, que puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además 12,5 mg/ml de BMS-931699 en fosfato 20 mM, pH 5,9, con 5 % (p/v) de sorbitol.

También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. En determinadas
10 realizaciones, un anticuerpo de dominio desvelado en el presente documento se formula junto con y/o se administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, un anticuerpo de dominio desvelado en el presente documento puede formularse conjuntamente y/o administrarse conjuntamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular), o, por ejemplo, una o más citocinas. Dichas terapias combinadas
15 pueden utilizar dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo de dominio. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de dominio puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad del anticuerpo de dominio para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte del anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Por lo general, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.
20
25
30

Pueden ajustarse las pautas posológicas para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario.
35
40

Un intervalo no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo de dominio desvelado en el presente documento es 0,1-20 mg/kg, y, en un aspecto, 1-10 mg/kg. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio puede administrarse a una dosis de aproximadamente 1,25 mg a aproximadamente 12,5 mg; es decir, la dosis puede ser al menos 1,25 mg, al menos 5 mg, al menos 12,5 mg, aproximadamente 1,25 mg, aproximadamente 5 mg o aproximadamente 12,5 mg. Se pueden administrar de 1,25 mg a aproximadamente 12,5 mg del anticuerpo de dominio por vía subcutánea. La dosis puede administrarse en un programa fijo o variado. Por ejemplo, la dosis puede administrarse semanalmente o quincenalmente. La dosis puede administrarse durante un régimen de tratamiento establecido, tal como una vez cada dos semanas durante 24 semanas (12 dosis en total) o una vez a la semana durante 24 semanas (24 dosis en total). Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar dependiendo del tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Además, hay que entender que, para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional del médico administrador.
45
50

La eficacia del tratamiento con un anticuerpo de dominio como se describe en el presente documento es juzgada por el médico experto en función de la mejora en uno o más síntomas o indicadores del estado de enfermedad o trastorno que se está tratando. Una mejora de al menos 10 % (aumento o disminución, dependiendo del indicador que se esté midiendo) en uno o más indicadores clínicos se considera "tratamiento efectivo", aunque se incluyen mejoras mayores, tal como aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 90 %, o incluso 100 %, o, dependiendo del indicador que se esté midiendo, más del 100 % (por ejemplo, el doble, el triple, diez veces, etc., hasta e incluyendo el logro de un estado libre de enfermedad. Los indicadores pueden ser medidas físicas, por ejemplo, los niveles de enzima, citocina, factor de crecimiento o de metabolitos, la tasa de crecimiento celular o de muerte celular, o la presencia o cantidad de células anormales. También se pueden medir, por ejemplo, diferencias en la cantidad de tiempo entre brotes de síntomas de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, para enfermedades remitentes/recurrentes, tal como esclerosis múltiple). Como alternativa, se puede confiar en las mediciones no físicas, tal como una reducción indicada del dolor o la incomodidad u otro indicador del estado de la enfermedad para medir la efectividad del tratamiento. Cuando se realizan mediciones no físicas, se pueden usar varias escalas o
55
60
65

índices clínicamente aceptables, por ejemplo, el índice de actividad de la enfermedad de Crohn o CDAI (Best et al. (1976) Gastroenterology 70: 439), que combina ambos indicadores físicos, tales como el hematocrito y la cantidad de heces líquidas o muy blandas, entre otros, con factores informados por el paciente, tal como la gravedad del dolor abdominal o los calambres y el bienestar general, para asignar una puntuación de la enfermedad.

Tal como se usa el término en el presente documento, la "profilaxis" realizada usando una composición como se describe en el presente documento es "eficaz" si el inicio o la gravedad de uno o más síntomas se retrasa o reduce en al menos un 10 %, o se suprime, en relación con tales síntomas en un individuo similar (modelo humano o animal) no tratado con la composición.

Mientras que los anticuerpos de dominio descritos en el presente documento se unen a CD28 humano, donde se debe evaluar su efecto en un sistema modelo animal, el polipéptido debe reaccionar de forma cruzada con uno o más antígenos en el sistema de modelo animal, en un aspecto, con gran afinidad. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si esta condición se satisface para un sistema de modelo animal dado y un anticuerpo de dominio dado. Si se cumple esta condición, la eficacia del anticuerpo de dominio puede examinarse administrándolo a un modelo animal en condiciones que imiten un estado de enfermedad y monitorizando uno o más indicadores de ese estado de enfermedad para al menos una mejora del 10 %.

Ejemplos

Ejemplo 1: Farmacocinética de 1h-239-891 PEGilado (D70C) en monos Cynomolgus

Se realizaron estudios en los monos cinomolgos para evaluar la farmacocinética de 1h-239-891 (D70C) PEGilado con un PEG lineal de 30 kDa (P30L) o un PEG ramificado de 40 kDa (P40B), después de dosis intravenosas (IV) únicas de 0,05 y 5 mg/kg, o dosis subcutáneas (SC) de 0,05, 0,5 y 5 mg/kg (mpk).

Las tablas 1 y 2 resumen los parámetros de PK IV y SC de 1h-239-891 (D70C) -P30L y -P40B, respectivamente. Se observó farmacocinética no lineal para los formatos P30L y P40B PEG. Las semividas terminales (T1/2) de P30L y P40B fueron de 1,6 y 2,5 días, respectivamente. La absorción de 1h-239-891 (D70C) fue casi completa después de la administración SC para P30L a 0,05 mg/kg y para P40B a 0,05 y 5 mg/kg (biodisponibilidad F > 90 %), pero se redujo al 70 % para P30L a 5 mg/kg. El volumen de distribución en estado estacionario (Vss) fue comparable entre los dos formatos de PEG. Sin embargo, el aclaramiento sistémico (CL) de P40B fue 3 veces menor que el de 30L, lo que explica en gran medida las diferencias en el AUC y la T1/2 observadas entre los dos formatos. A 0,05 mg/kg, por ejemplo, la T1/2 no se pudo determinar con precisión porque la concentración del fármaco en la fase terminal estaba por debajo del nivel de cuantificación (LLQ).

Tabla 1: Parámetros PK de 1h-239-891 (D70C)-P30L

IV				SC				
Dosis	upk	0,05 (n=1)	5 (n=1)	Dosis	mpk	0,05 (n = 2)	0,5 (n=3)	5 (n = 2)
AUC _{tot}	nM*h	996	182161	C _{máx}	nMolar	21	225	1980
T _{1/2}	h	nd*	39	T _{máx}	h	8	8	16
TMR	h	15,3	20,1	AUC _{tot}	nM*h	905	12774	125742
CL	ml/min/kg	0,069	0,038	T _{1/2}	h	33	34	36
V _{ss}	l/kg	0,063	0,045	TMR	h	48	56	56
				F	%	91		69

*No se puede determinar con precisión porque las concentraciones del fármaco en la fase terminal estaban por debajo de LLQ.

Tabla 2: Parámetros PK de 1h-239-891 (D70C)-P40B

i.v.				SC				
Dosis	mpk	0,05 (n=1)	5 (n=1)	Dosis	mpk	0,05 (n = 2)	0,5 (n=3)	5 (n = 2)
AUC _{tot}	nM*h	3704	499857	C _{máx}	nMolar	27	410	5075
T _{1/2}	h	49	70	T _{máx}	h	36	27	36
TMR	h	61	65	AUC _{tot}	nM*h	3561	52646	556918
CL	ml/min/kg	0,018	0,014	T _{1/2}	h	56	65	61
V _{ss}	l/kg	0,067	0,054	TMR	h	96	107	94
				F	%	96		100

*No se puede determinar con precisión porque las concentraciones del fármaco en la fase terminal estaban por debajo de LLQ.

Ejemplo 2: Farmacología sustituta de BMS-931699

Los dAb de CD28 sustitutos que reconocen el CD28 de ratón, con potencias similares a BMS-931699, se utilizaron para evaluar el impacto de la inhibición directa de CD28 en modelos de eficacia murina. En un modelo de respuesta de anticuerpos KLH de ratón, BMS1m-74-14982-P40B (un sustituto murino para BMS-931699) suprimió completamente los títulos de IgG a 0,1 mg/kg en ratones, con una CE₅₀ *in vivo* de 18 ng/ml. Se requirió una ocupación del receptor CD28 (RO) de ~ 100 % 24 horas después de la dosis para una eficacia máxima. En el mismo modelo, mCTLA4lg suprimió completamente la respuesta de IgG a 3 mg/kg, con una CE₅₀ *in vivo* de 1656 ng/ml.

El tratamiento con BMS1m-74-14982-P40B después del inicio de la enfermedad (modo terapéutico) en el modelo de lupus NZB/NZW F1, fue eficaz para reducir la proteinuria, los títulos de autoanticuerpos en suero, la expresión de genes de citocinas locales y la deposición de complejos inmunes/glomerulonefritis. La mayoría de los criterios de evaluación se vieron totalmente afectados a la dosis de 0,5 mg/kg, con supervivencia y anti-ADNbc que requieren concentraciones más altas de 2 y 8 mg/kg, respectivamente. Tomados como un conjunto, los estudios *in vitro* e *in vivo* proporcionan una prueba de concepto para la tecnología de dAb y la confianza de que un dAb de CD28 debería ser eficaz en enfermedades autoinmunes en la clínica.

La evaluación de seguridad no clínica que respalda el desarrollo clínico de BMS-931699 incluye: 1) estudios de PK/PD de dosis única realizados con BMS-908613-P40B en monos para respaldar la justificación de dosis mínima esperada del nivel de efecto biológico (MABEL); 2) un estudio exploratorio de toxicidad de dosis única en ratones con BMS1m-74-14982-S60C-P40B para evaluar la toxicidad potencial del antagonismo de CD28 en un modelo de roedor; 3) estudios pivotaes de toxicidad de dosis repetida de GLP a 1 y 6 meses de BMS-931699 en monos cynomolgus; 4) un estudio exploratorio *in vitro* de posibles efectos relacionados con BMS-931699 (liberación de citocinas, activación/proliferación de linfocitos T) en linfocitos T humanos; y 5) un estudio de reactividad cruzada de tejidos humanos de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) para demostrar la distribución objetivo e informar sobre cualquier posible unión inesperada del epítipo.

El mono cynomolgus se seleccionó como la especie de toxicología porque BMS-931699 se une de manera comparable al CD28 de macaco, es farmacológicamente activo en monos y no reacciona de forma cruzada con el CD28 de roedor.

Los efectos de PD previstos en monos cynomolgus se han demostrado *in vivo* con BMS-908613-P40B (inhibición de TDAR) y con BMS-931699 (disminución de linfocitos corticales en varios ganglios linfáticos que refleja la disminución de la actividad del centro germinal). *In vitro*, BMS-931699 y BMS-908613-P40B mostraron afinidades de unión similares para CD28 humano y potencia similar en ensayos de reacción de linfocitos mixtos *in vitro* (MLR). El sustituto de roedor de BMS-931699, BMS1m-74-14982-S60C-P40B, se utilizó para evaluar el potencial de toxicidad en ratones.

En el estudio exploratorio de toxicidad de dosis única en ratones, BMS1m-74-14982-S60C-P40B a dosis SC de hasta 18 mg/kg (AUC ≤ 5184 µg • h/ml) no se asoció con ningún hallazgo adverso relacionado con el medicamento. En los estudios exploratorios de PK/PD de dosis única en monos, BMS-908613-P40B a dosis SC de hasta 5 mg/kg (AUC ≤ 6793 µg • h/ml) no se asoció con ningún hallazgo adverso relacionado con el fármaco, incluidos los efectos sobre las citocinas plasmáticas. Los efectos relacionados con BMS-908613-P40B a dosis ≥ 0,5 mg/kg se limitaron a la supresión reversible dependiente de la dosis de TDAR primarios a KLH (IgG), cuando se administró KLH 24 horas después de la dosis, un efecto farmacológico esperado.

En un estudio de toxicidad de dosis intermitente de 5 semanas en monos cynomolgus con una recuperación de 8 semanas, dosis IV de BMS-931699 de hasta 15 mg/kg (AUC media sexual combinada desde el tiempo cero a 168 horas [AUC (0-168 h)] ≤ 16.700 µg • h/ml) o una dosis SC de 3,5 mg/kg (AUC media ≤ 3520 µg • h/ml) administrado una vez a la semana durante 5 semanas fueron clínicamente bien tolerados. De forma notable, los efectos relacionados con BMS-931699 en todas las dosis (media [AUC (0-168h)] ≥ 1860 µg • h/ml el día 22) incluyeron reducciones no adversas en los linfocitos T reguladores de sangre periférica (Treg), disminuciones de mínimas a leves de los linfocitos corticales en los ganglios linfáticos, y una vacuolación de células epiteliales y macrófagos de leve a leve en varios tejidos que no se asociaron con inflamación o cambios necróticos o función orgánica alterada. Las reducciones en los Treg y linfocitos corticales en los ganglios linfáticos fueron efectos farmacológicos esperados, mientras que la vacuolación en varios tejidos se atribuyó al resto de PEG de BMS-931699. Todos los efectos relacionados con BMS-931699 mostraron una resolución parcial a completa después de un período de recuperación de 8 semanas con la excepción de la vacuolación en el epitelio del plexo coroideo y la glándula pituitaria. Según la baja gravedad y la falta de cambios inflamatorios o degenerativos asociados, se consideró que el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) era de 15 mg/kg/semana IV AUC media [0-168h] de 15.200 µg • h/ml el día 22) y 3,5 mg/kg/semana SC (AUC media [0-168 h] de 3330 µg • h/ml el día 22).

En un estudio de toxicidad de dosis intermitente de 6 meses con una recuperación de 6 meses, BMS-931699 fue clínicamente bien tolerado por los monos cynomolgus durante ≤ 6 meses cuando se administró como dosis SC semanales de ≤ 10 mg/kg (AUC [[0-168h] 12.100 µg • h/ml). Los hallazgos primarios relacionados con BMS-931699 en todas las dosis fueron disminuciones mediadas farmacológicamente en las Treg de sangre periférica, linfocitos B, IgG sérica y linfocitos corticales en ganglios linfáticos o bazo. Dado que los cambios en los Treg fueron mínimos, reversibles y no asociados con ningún otro hallazgo adverso correlativo, no se consideraron adversos. Otros

- hallazgos microscópicos no adversos a ≥ 1 mg/kg/semana (AUC [0-168h] 1.350 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$) incluyeron la vacuolación relacionada con PEG de macrófagos y/o células epiteliales en varios tejidos (plexo coroideo del cerebro, riñón, ganglio linfático axilar y sitios de inyección), y aumento del grosor del intersticio renal. A $\geq 3,5$ mg/kg/semana (AUC [0-168h] de 4.450 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$), Se observó vacuolación de macrófagos relacionada con PEG en la glándula pituitaria y se observó una mayor incidencia y gravedad de la inflamación y hemorragia en los sitios de inyección subcutánea. Los hallazgos adicionales a 10 mg/kg/semana incluyeron vacuolación de macrófagos relacionada con PEG en los ganglios linfáticos mandibulares y mesentéricos, órganos circunventriculares del cerebro, vejiga urinaria, ovarios, útero y bazo. Todos los hallazgos mencionados anteriormente mostraron evidencia de reversibilidad (parcial o completa) con la excepción del aumento del grosor del intersticio renal y la vacuolación de los macrófagos en la glándula pituitaria, órganos circunventriculares del cerebro, vejiga urinaria y útero. Estos hallazgos no se acompañaron de cambios degenerativos o inflamatorios y se consideraron no adversos. Se observó linfoma en 1 hembra a 1 mg/kg/semana que se consideró secundaria a la inmunosupresión inducida por BMS-931699 en monos cynomolgus infectados de forma latente con LCV; según este hallazgo, no se determinó un NOAEL en este estudio.
- 15 Tanto en los estudios exploratorios de PK y PD de dosis única como en los estudios de toxicidad de monos en dosis repetidas, la inmunogenicidad se produjo con una incidencia baja. Asimismo, la presencia de los anticuerpos anti-fármacos (ADA) no afectó a la PK, la PD o la toxicocinética de BMS-931669 en monos. No se observó irritación adversa ni intolerancia local en los sitios de inyección SC o IV de BMS-931699 en los estudios de 5 semanas o 6 meses en monos que usan concentraciones de BMS-931699 y tasas de inyección mayores o iguales a las recomendadas para uso humano. En un sistema de ensayo *in vitro*, los linfocitos T humanos purificados se incubaron con BMS-931699 o el anticuerpo monoclonal anti-CD28 superagonista (mAb) TGN 5.11A1 para controlar los posibles efectos sobre la activación de linfocitos T, proliferación y liberación de citocinas. No hubo efectos relacionados con BMS-931699, mientras que TGN 5.11A1 indujo tanto la liberación de citocinas como la activación celular. En el estudio de reactividad cruzada tisular de GLP utilizando un panel completo de 23 tejidos humanos, la unión de BMS-931699 se limitó a células mononucleares en la mayoría de los tejidos humanos. Como CD28 se expresa principalmente en los linfocitos T, la tinción de los linfocitos sanguíneos y las células mononucleares en todo el panel de tejido humano fue de la reactividad esperada. En general, BMS-931699 ha demostrado propiedades farmacológicas, PK no clínica, PD y toxicológicas aceptables que apoyan el desarrollo clínico continuo.
- 30 Las evaluaciones de los posibles efectos de la administración IV y/o SC de BMS-931699 en el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central/periférico y/o el sistema respiratorio se incluyeron como parte del estudio fundamental de toxicidad de dosis repetidas de GLP en monos. Después de 5 dosis semanales IV/SC o 6 meses de dosis IV semanales de BMS-931699 en monos, las evaluaciones clínicas no arrojaron hallazgos en las exploraciones físicas, neurológicas y oftalmológicas; la temperatura corporal; frecuencia cardíaca; las evaluaciones electrocardiográficas cualitativas y cuantitativas; frecuencia respiratoria; las evaluaciones de sonidos pulmonares y el color de la membrana mucosa; y las determinaciones de saturación de oxígeno arterial, que se consideraron relacionadas con BMS-931699.

Ejemplo 3: Metabolismo preclínico y farmacocinética

- 40 La PK de BMS1m-74-14982-S60C-P40Br y BMS-908613-P40Br, se evaluó en ratones y monos cynomolgus, respectivamente. Después de la administración intravenosa (IV) (0,2 mg/kg en ratones; 0,05 y 5 mg/kg en monos), las concentraciones circulantes de MS-Im74-14982-S60C-P40B y BMS-908613-P40B exhibieron disminuciones biexponenciales. Los volúmenes de distribución en estado estacionario (Vss) para BMS1m-74-14982-S60C-P40B y BMS-908613-P40B en ratones fueron (0,13 l/kg) que es mayor que el volumen de plasma indicado en ratones, lo que indica que el fármaco en gran medida reside en el espacio extracelular. Sin embargo, en monos, el Vss (0,053 l/kg) para BMS-908613-P40B fue similar al volumen de plasma indicado, indicando una distribución extravascular muy limitada. El aclaramiento sérico de MS-Im74-14982-S60C-P40B en ratones y el aclaramiento plasmático de BMS-908613-P40B en monos fueron de 3,9 ml/h/kg y de 0,82 a 1,1 ml/h/kg, respectivamente. La semivida de eliminación aparente (T-SEMI) después de la administración IV fue de 27 horas en ratones y de 50 a 71 horas en monos.

- Después de una administración SC única (0,2 mg/kg en ratones; 0,05, 0,5 y 5 mg/kg en monos), MS-Im74-14982-S60C-P40B y BMS-908613-P40B fueron bien absorbidos, con biodisponibilidad del 78 % en ratones y del 96 al 111 % en monos, respectivamente. El tiempo de concentración plasmática o sérica máxima (Tmax) fue generalmente de alrededor de 24 horas (intervalo = de 8 a 36 horas). En un estudio SC PK (DS09012), BMS-908613-P40B exhibió un aumento más que proporcional a la dosis en la exposición en monos hembras (a 0,05, 0,5 y 5 mg/kg, las concentraciones plasmáticas máximas [C_{máx}] fueron 0,335, 5,0 y 61,9 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, y los valores del área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo cero al infinito [AUC (INF)] fueron 43,4, 642 y 6790 $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$, respectivamente). En un estudio posterior de SC PK/PD en monos (DS09013), en el que los monos fueron inmunizados con ovaalbúmina y KLH, se observó una PK lineal entre 0,05 y 5 mg/kg en machos, pero, como en el estudio DS09012, hubo una tendencia a un aumento mayor que proporcional en la exposición en hembras, pero no en machos.

- 65 Después de la administración intraperitoneal (0,08, 0,4 y 2 mg/kg) a ratones, BMS Im74-14982-S60C-P40Br exhibió un aumento de la exposición aproximadamente proporcional a la dosis. El Tmax fue de 4 a 9 horas.

Ejemplo 4: Primer estudio en seres humanos: Farmacología clínica y seguridad

5 El programa clínico inicial para BMS-931699 consiste en un primer estudio de dosis ascendente única (SAD) en seres humanos (FIH) (Parte 1) junto con un estudio de SAD de inmunización con neo-antígeno (Parte 2), seguido de un estudio de dosis ascendente múltiple (MAD) en sujetos sanos. Un total de 156 sujetos se inscribieron en el estudio FIH SAD IM128001, incluyendo 108 sujetos en la Parte 1 (estudio de dosis única ascendente) y 48 sujetos en SAD Parte 2 (inmunización CON KLH). Un total de 108 sujetos recibieron el fármaco del estudio activo y 48 recibieron placebo. En resumen, BMS-931699 fue seguro y bien tolerado después de una dosis única de hasta 100 mg IV. No hubo muertes. No hubo cambios clínicamente relevantes en las constantes vitales, se informaron hallazgos físicos o ECG. No se observaron cambios clínicamente significativos en las citocinas proinflamatorias después de una dosis única de BMS-931699 que confirma la falta de actividad agonista del receptor CD28 en seres humanos. Se informaron dos acontecimientos adversos graves (AAG), pero ambos se consideraron no relacionados con el estudio del fármaco. Estos incluyeron un acontecimiento de -insuficiencia prerrenal aguda y un acontecimiento de apendicitis. Se produjeron reacciones agudas a la infusión en 7 sujetos; 3 de estos acontecimientos llevaron a la interrupción del fármaco del estudio antes de completar la infusión. Todas las reacciones agudas a la infusión fueron de intensidad moderada. Se notificaron aumentos aislados de alanina aminotransferasa asintomática (ALT) en los grupos tratados con fármaco y placebo del estudio y ningún sujeto cumplió los criterios de Hy. Los efectos adversos más frecuentes (EA) incluyeron dolor de cabeza, sensación de calor, dolor orofaríngeo, dolor de espalda, prurito e infección del tracto respiratorio superior.

15 El estudio MAD IM128003 se realizó en 24 sujetos (3 cohortes de 8 sujetos) tratados durante 5 semanas con cualquiera de las dosis SC de BMS-931699 (6,25 mg en semanas alternas [EOW], 12,5 mg semanalmente [QW] o 37,5 mg QW) o placebo (aleatorización 3:1). Como se informó en el estudio SAD, Los resultados preliminares del estudio MAD no muestran evidencia de actividad agonista de CD28, tal como se define mediante la liberación de citocinas clínicamente significativas y/o cambios de linfocitos. Se observaron infecciones en las cohortes de sujetos sanos tratados con BMS-931699 (5/18; 27,8 %) pero no se observó correlación entre la exposición y la tasa de infección.

25 En total, se notificaron 6 infecciones en 5 sujetos, con 5 infecciones en 4 sujetos considerados acontecimientos relacionados. Un sujeto, dosificado en el régimen semanal de 12,5 mg, experimentó 2 episodios infecciosos: herpes oral el Día 40 del estudio, seguido después de 7 días de infección respiratoria de vías altas, en ambos casos, la gravedad se definió como leve. Un sujeto, dosificado al programa semanal de 12,5 mg, presentó forúnculo (gravedad leve) el día 69 del estudio. Un sujeto, dosificado a 37,5 mg por semana, el día 89 presentó un absceso periamigdalino de gravedad moderada, que requirió tratamiento con antibióticos (500 mg de amoxicilina tres veces al día [TID] durante 10 días. Un sujeto tenía una infección viral leve el día 81 después de la administración de 37,5 mg de BMS-931699 semanalmente, que se consideró no relacionado.

30 Un sujeto tuvo un AAG de celulitis grave tras la administración de 6,25 mg cada 2 semanas. El sujeto requirió hospitalización el día 49 por celulitis que se desarrolló en la mano derecha después del daño de la piel en la base del tercer dedo. Cuando estaba hospitalizado, el paciente fue tratado con antibióticos por vía intravenosa y la lesión se drenó quirúrgicamente. El AAG siguió a un daño cutáneo traumático en la mano derecha, proporcionando una alteración de la integridad de la piel para el desarrollo de la celulitis. Sin embargo, no se puede excluir que BMS-931699 podría haber hecho al sujeto más susceptible a la infección posterior. Por lo tanto, el AAG se consideró posiblemente relacionado con el fármaco del estudio.

Farmacocinética de BMS-931699**Resumen DE LA farmacocinética de IM128001: Estudio de dosis única ascendente**

50 El estudio SAD IM128001 evaluó BMS-931699 en el intervalo de dosis de 0,01 mg a 100 mg (0,01, 0,05, 0,25, 3, 9, 25, 50 y 100 mg) después de una infusión intravenosa de 30 minutos, y dosis de 9, 25 y 50 mg después de la administración SC. BMS-931699 exhibió PK lineal después de la administración única IV y SC. La $C_{máx}$ y el AUC (INF) de BMS-931699 administrado por vía IV y SC aumentaron aproximadamente en proporción a la dosis en el intervalo de 3 mg a 100 mg. Los valores de AUC y $C_{máx}$ de BMS-931699 aumentaron de manera proporcional a la dosis después de dosis únicas de 3 mg a 100 mg IV y DE 9 mg a 50 mg SC en sujetos sanos.

60 El aclaramiento medio total del cuerpo (CLT), V_z y V_{ss} estaban en el intervalo de 0,42-0,59 l/min, 3,4-5,1 l y 3,2-4,5 l respectivamente, y relativamente consistente entre todos los grupos de dosis después de la administración IV única. El aclaramiento corporal total aparente medio (CLT)/F y V_z/F estuvieron en el intervalo de 0,59-0,70 L/min y 6,0-7,3 l, respectivamente, y relativamente consistentes entre todos los grupos de dosis después de una sola administración SC. La T-SEMI de BMS-931699 fue similar después de una dosis única o dosis múltiples en sujetos sanos (4 a 5,5 días para dosis única y DE 6 a 7 días para dosis múltiples). La biodisponibilidad de BMS-931699 después de la administración SC en AUC (INF) fue del 68,2 %.

Resumen de la farmacocinética de IM128003: Estudio de dosis ascendente múltiples

El estudio MAD IM128003 evaluó BMS-931699 en tres grupos de tratamiento: 6,25 mg cada dos semanas (3 dosis), 12,5 mg por semana (5 dosis) y 37,5 mg por semana (5 dosis). Después de la administración cada dos semanas y SC semanal, la farmacocinética de BMS-931699 es lineal en el intervalo de 6,25 mg cada dos semanas a 37,5 mg por semana. La media geométrica del índice de acumulación de AUC fue 1,3, 2,4 y 3 para 6,25 mg EOW, 12,5 mg QW y 37,5 mg QW, respectivamente.

Después de múltiples dosis de BMS-931699, y se observó una mediana de T-SEMI de 6 a 7 días. El CL/F medio (0,345 a 0,46 l/min) es consistente con lo observado en el estudio SAD. La razón de una T-SEMI un poco más larga indicada en el MAD en comparación con el estudio SAD probablemente se deba al hecho de que había datos de concentración más mensurables en la fase terminal para estimar la T-SEMI del BMS-931699 en el estudio MAD.

Ejemplo 5: Ensayos clínicos de fase 2 Justificación de la selección de la dosis

Se seleccionaron cuatro tratamientos de BMS-931699 para la evaluación inicial en seres humanos en un estudio de intervalo de dosis de fase 2, incluyendo 1,25 mg cada dos semanas, 5 mg cada dos semanas, 12,5 mg cada dos semanas y 12,5 mg semanalmente. Estos regímenes de dosificación se seleccionaron en función de la relación PK/PD utilizando la ocupación del receptor (RO) y la supresión de IgG después de la exposición al antígeno hemocianina de lapa californiana (KLH) como marcadores predictivos de actividad inmunosupresora y eficacia clínica en pacientes con LES.

Usando el modelo PK/PD para la ocupación del receptor según los datos MAD en seres humanos, se realizaron simulaciones para identificar regímenes de dosificación que proporcionarían una amplia gama de ocupación del receptor para abarcar la curva de ocupación del receptor-PK. Estas simulaciones predicen que 1,25 mg cada dos semanas, 5 mg cada dos semanas, 12,5 mg cada dos semanas y 12,5 mg cada semana los regímenes proporcionan aproximadamente $\geq 40\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ de ocupación del receptor, respectivamente, durante todo el intervalo de dosificación para la mayoría de los pacientes (Figura 4). La distribución de la ocupación del receptor asociada con el régimen de 1,25 mg cada dos semanas y 5 mg cada dos semanas, cae en la parte empinada de la curva de ocupación del receptor PK, mientras que los regímenes de 12,5 mg cada dos semanas y cada semana caen en la porción de meseta máxima.

Los datos preclínicos de monos sugirieron que se necesita $> 80\%$ de ocupación del receptor durante 2 semanas para la inmunosupresión máxima medida por la supresión de IgG después de la exposición al antígeno KLH y a medida que los niveles de receptor caen por debajo del 80% , la actividad inmunosupresora disminuye y aumenta la formación de anticuerpos anti-KLH. Los resultados del estudio de dosis única ascendente (SAD) confirman esta premisa. Se observó una supresión de la IgG casi máxima en todos los grupos de tratamiento cuando se logró aproximadamente el 80% de ocupación del receptor. De forma notable, en el grupo tratado con KLH más bajo (9 mg), cuando el $\%$ de RO disminuyó por debajo del 80% , hubo un rebote posterior en la formación de IgG. Por lo tanto, se cree que altos niveles de acoplamiento a la diana, por ejemplo el 80% de ocupación del receptor o mayor, son necesarios para provocar actividad inmunosupresora.

Se espera que las exposiciones asociadas con la dosis más baja propuesta de 1,25 mg en régimen de dosificación cada dos semanas sean muy bajas (5 veces más bajas que la dosis más baja probada en el estudio MAD en voluntarios sanos normales) con un gran margen de seguridad proyectado (50X) de la dosis más baja probada en un estudio de mono de 6 meses. Se espera que la distribución prevista de la ocupación del receptor para 1,25 mg cada dos semanas caiga por debajo del 80% para toda la población de tratamiento, mientras que se espera que esta dosis mantenga la ocupación del receptor por encima del 40% para la mayoría de los sujetos humanos. Según los hallazgos anteriores de la correlación entre el 80% de ocupación del receptor y la supresión de KLH, se espera que el régimen de 5 mg cada dos semanas provoque $> 80\%$ de ocupación del receptor en aproximadamente el 50% de los pacientes, proporcionando de este modo alguna actividad inmunosupresora, que se espera que induzca alguna respuesta clínica, aunque subóptima. Además, la exposición (AUC (TAU)) asociada con este régimen de dosificación es bastante baja con un gran margen de seguridad proyectado (12,7X) de la dosis más baja probada en un estudio de toxicología de mono de 6 meses. Se espera que las dosis más altas de 12,5 mg cada dos semanas y cada semana proporcionen $> 80\%$ y $> 90\%$ de ocupación del receptor para toda la población de tratamiento, y se espera que generen una actividad inmunosupresora casi máxima que potencialmente conduzca a una respuesta eficaz casi máxima. Las exposiciones asociadas con estos 2 regímenes son considerablemente más bajas (5,1X y 2,5X), que la de la dosis más baja probada en un estudio con monos de 6 meses. Las exposiciones proyectadas de las cuatro dosis están dentro del intervalo de exposiciones probadas en el estudio MAD en sujetos humanos sanos. La dosis más alta en este estudio POC seguirá siendo un tercio de la dosis más alta en el estudio MAD.

Ejemplo 6: Diseño y duración del estudio

Se realiza un estudio internacional de fase 2, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y de brazos paralelos, con un diseño adaptativo. El estudio comprende un período a corto plazo que consta de dos partes: Parte 1 (Figura 1) y Parte 2 (Figura 2), y un período de extensión a largo plazo (LTE) (Figura 3).

La Parte 1 se enfoca en evaluar la seguridad y la ocupación del receptor. La Parte 1 está limitada a 30 a 50 pacientes (aproximadamente 6-10 pacientes/brazo) se incluyen en el análisis provisional de Seguridad/RO (IA). Los 6 a 10 pacientes por brazo completan 28 días (4 semanas) de tratamiento. Estos pacientes continúan el tratamiento del estudio más allá del IA para Seguridad/RO y reciben tratamiento durante hasta 24 semanas y se les sigue durante 6 semanas adicionales después de completar el tratamiento. Un total de hasta 50 sujetos asignados al azar son tratados durante hasta 6 meses. El tratamiento podría ser más corto si el IA para el análisis de Seguridad/RO indica que uno o más brazos deben abandonarse.

La Parte 2 se abre una vez que el perfil de seguridad acumulativo se considera aceptable y los datos de ocupación del receptor para 6-10 sujetos por cohorte con dosis > 28 días están disponibles. Aproximadamente 300 sujetos se asignan al azar a esta parte del estudio (el número de pacientes que se asignará al azar a la Parte 2 puede aumentar según los resultados del análisis provisional de futilidad). Todos los sujetos se someten a evaluaciones de detección para determinar la elegibilidad y permitir la reducción de la prednisona (o equivalente de prednisona) dentro de los 28 días previos a la administración de su primera dosis de medicación del estudio. La dosis puede adaptarse de la siguiente manera:

- Análisis provisional de seguridad y ocupación del receptor (RO): se realiza un análisis de seguridad y ocupación del receptor cuando aproximadamente 6 a 10 sujetos por brazo han alcanzado el día de estudio 29 (4 semanas de tratamiento). Según los resultados del análisis, la dosis del brazo se puede ajustar o disminuir por completo.
- Análisis provisional para la futilidad y la adaptación de la dosis en la respuesta BICLA, respuesta del índice de respuesta del LES, ACR28 y algunos biomarcadores de LES (como los autoanticuerpos, los niveles de complemento, etc.) con posible análisis exploratorio de respuesta a la exposición, se realiza cuando aproximadamente 30 sujetos por brazo han alcanzado el día de estudio 85 (12 semanas de tratamiento o interrumpido). El análisis lo realiza un equipo del promotor no enmascarado, mientras se mantiene ciego en el sitio y en el nivel del sujeto. Basándose en los resultados, los niveles de dosis y el tamaño de la muestra pueden modificarse.
- La evaluación continua de la seguridad es realizada por un Comité de Monitorización de Datos (DMC) independiente y un equipo interno de monitorización de seguridad no enmascarado. Ambas entidades pueden hacer recomendaciones al Promotor sobre la realización del estudio y el ajuste de la dosis en función de las observaciones de seguridad.

El período de extensión a largo plazo (LTE) es opcional e incluye sujetos elegibles que han completado el día 169 (semana 24) de tratamiento y consentimiento para participar. Este período del estudio permanece cegado pero ya no tiene un brazo de placebo. Los sujetos elegibles permanecen en su brazo de dosis originalmente asignado, a menos que estuvieran en el brazo de placebo durante el período a corto plazo. Los sujetos con brazo de placebo se vuelven a aleatorizar en uno de los brazos activos existentes el día 169 (24 semanas). La nueva aleatorización de los sujetos con placebo se realiza mediante IVRS y solo el farmacéutico /preparador de medicamentos no enmascarado conoce el nuevo brazo de aleatorización. El LTE permanece enmascarado para el equipo de estudio y al personal del estudio.

La duración aproximada del estudio es de 28 días (4 semanas) de detección selectiva, 168 días (24 semanas) de tratamiento y 42 días (6 semanas) de seguimiento de seguridad, por un total de aproximadamente 238 días (34 semanas) en el período a corto plazo. Si el sujeto es elegible y opta por continuar en la LTE, la visita de seguimiento a los 42 días se realiza después de que se completa el período a corto plazo y el sujeto entra en LTE directamente. Si el sujeto opta por no entrar en el LTE, se completa una visita de seguimiento 42 días después del final del tratamiento. En el momento de la redacción, no había una fecha de finalización definida para el período de extensión a largo plazo, sin embargo, la provisión de LTE puede ajustarse aún más según los resultados del programa de desarrollo de lulizumab en curso. Los sujetos que suspenden el tratamiento durante el período LTE completan la visita de seguimiento aproximadamente 6 semanas después de recibir su última dosis de medicación del estudio.

Los sujetos asignados al azar a la Parte 1 o a la Parte 2 reciben tratamiento durante hasta 24 semanas y se les realizan los mismos procedimientos y siguen el mismo programa de visitas.

Ejemplo 7: Evaluación general de riesgos/beneficios

Este ejemplo resume los posibles riesgos del tratamiento con BMS-931699 y las precauciones requeridas en los estudios clínicos. Esta evaluación se basa en los datos no clínicos y la experiencia clínica hasta la fecha con BMS-931699 establecida en los ejemplos previos.

Cabe esperar que el bloqueo de la función de CD28 module la respuesta inmunológica. La modulación de la respuesta inmunológica puede predisponer a infección. En estudios no clínicos, no hubo evidencia de que el tratamiento con BMS-913699 provocara una infección bacteriana o viral. Hasta la fecha, se han administrado dosis únicas y dosis repetidas de BMS-931699 en sujetos sanos. Según los resultados de los estudios no clínicos de toxicología de dosis únicas y repetidas IV y SC en monos cynomolgus y los datos clínicos de los estudios IM128001

e IM128003, BMS-931699 ha demostrado un perfil de seguridad aceptable, lo que apoya el desarrollo continuo.

La exposición esperada [AUC (TAU)] en estado estacionario para la dosis más alta propuesta de 12,5 mg por semana es aproximadamente 2,5 veces menor que la dosis más baja probada de 1 mg/kg/semana en el estudio de toxicidad de 6 meses en monos en los que se observó una vacuolación de mínima a moderada de los macrófagos. La dosis más alta en este estudio de Fase 2 es un tercio de la dosis más alta en el estudio MAD. Se implementa una monitorización intensa de la seguridad durante la Parte 1 de la Fase 2, lo que permite la detección temprana de cualquier señal de seguridad.

10 **Ejemplo 8: Adaptación de dosis**

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de Fase 2 se inicia con los 4 regímenes de 1,25 mg cada dos semanas, 5 mg cada dos semanas, 12,5 mg cada dos semanas y 12,5 mg semanalmente. El análisis provisional de seguridad/ocupación del receptor se realiza para garantizar que las exposiciones y las observaciones de ocupación del receptor se aproximen a las predicciones originales.

Un análisis provisional (IA) para la seguridad y la ocupación del receptor se realiza en la Parte 1 del estudio, cuando al menos 6 pacientes por brazo de tratamiento hayan alcanzado el día de estudio 29. Las observaciones de ocupación del receptor se aproximan a las predicciones originales y se confirma que BMS-931699 es bien tolerado en pacientes con LES. El resto de los pacientes están inscritos en el estudio.

Según los resultados de este análisis provisional, los regímenes de dosificación incluidos originalmente en la Parte 1 pueden suspenderse y/o pueden añadirse nuevos regímenes de dosificación de acuerdo con los criterios descritos a continuación. La inscripción en la Parte 2 del estudio se abre después de que el IA haya dado lugar a una decisión con respecto a los regímenes de dosificación que se llevarán a cabo:

Seguridad

El análisis de seguridad se centra en la incidencia y la gravedad de todos los acontecimientos adversos (AA), AA graves y acontecimientos preestablecidos de especial interés, como los AA de infección y cualquier otro análisis de seguridad solicitado por DMC. El DMC junto con un equipo de monitorización de seguridad interna no enmascarada puede requerir la suspensión de una o más dosis si se cumplen los criterios de detención o si surgen otras señales de seguridad que el Monitor Médico y/o el DMC consideran de suficiente preocupación. El equipo de monitorización de la seguridad no enmascarada no participa en las actividades regulares del estudio.

Ocupación del receptor

Se calcula la ocupación media del receptor el día 29 para cada brazo de tratamiento.

- Si la ocupación media del receptor de cualquier dosis es <20 %, el promotor considera abandonar esa dosis.
- Si la ocupación media del receptor para todas las dosis es > 90 %, el promotor considera añadir o reemplazar una dosis en la Parte 2 del estudio para asegurar un intervalo farmacodinámico adecuado (la dosis no debe exceder los 12,5 mg por semana).

Se considera la disminución de la dosis y/o la reducción de la frecuencia de administración si los resultados de ocupación del receptor están fuera de los parámetros indicados anteriormente. Este ajuste se produce por razones de seguridad o en caso de que se observen perfiles imprevistos de ocupación del receptor en pacientes con LES. La decisión de ajustar la dosis y/o la frecuencia se toma después de la revisión de los datos por parte del equipo clínico. Los sujetos no cambian la dosis. Si se modifica o elimina un brazo, los sujetos aleatorizados a ese brazo y que han abandonado.

En la Parte 2 del estudio, se realiza un análisis provisional de la futilidad y la adaptación de la dosis después de que 30 pacientes por brazo de tratamiento (incluidos los pacientes de la Parte 1) hayan completado al menos 85 días de tratamiento o lo hayan interrumpido. Se pueden abandonar uno o más brazos de tratamiento por falta de eficacia, o se puede añadir un brazo de tratamiento para explorar una dosis subóptima. El análisis de exposición-respuesta para la eficacia y la seguridad se puede realizar en paralelo con este análisis provisional para facilitar la selección de dosis para este brazo de tratamiento inferior adicional.

El período de extensión a largo plazo tiene análisis provisionales para la adaptación de la dosis. Si se identifica un problema de seguridad significativo, se pueden abandonar uno o más brazos de dosis. Si se abandonan uno o más brazos de dosis por razones de seguridad, todos los sujetos que actualmente reciben esa o esas dosis se interrumpen la recepción de la medicación del estudio.

65 **Ejemplo 9: Criterios de inclusión**

Los hombres o mujeres (no lactantes o embarazadas) entre 18 y 70 años de edad que cumplan con los criterios del American College of Rheumatology para la clasificación del lupus eritematoso sistémico son elegibles (Tabla 3). La clasificación se basa en 11 criterios. Con el fin de identificar pacientes en estudios clínicos, se dirá que una persona tiene lupus eritematoso sistémico (LES) si hay 4 o más de los 11 criterios presentes, en serie (secuencialmente) o simultáneamente (coincidente), durante cualquier intervalo de observación. Se deben cumplir cuatro criterios antes de la dosificación el día 1 para entrar en el estudio. Sin embargo, los 4 criterios no necesitan estar presentes en el momento de entrar en el estudio, pero han ocurrido en algún momento durante el curso de la enfermedad y deben documentarse:

5

10

Tabla 3: Criterios revisados de 1982 para la clasificación del lupus eritematoso sistémico

Criterio	Definición
1) Erupción malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, tiende a no afectar a los pliegues nasolabiales
2) Erupción discoide	Parches eritematosos elevados con escamas queratóticas adherentes y taponamiento folicular; se puede producir cicatrización atrófica en lesiones más antiguas
3) Fotosensibilidad	Erupción cutánea como resultado de una reacción inusual a la luz solar, por historial del paciente u observación médica
4) Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente indolora, observada por el médico
5) Artritis	Artritis no erosiva que afecta a 2 o más articulaciones periféricas, caracterizada por sensibilidad al tacto, hinchazón o derrame
6) Serositis	a) Pleuritis: antecedentes convincentes de dolor pleurítico o roce escuchados por un médico o evidencia de derrame pleural O b) Pericarditis: documentada por ECG o roce o evidencia de derrame pericárdico
7) Trastorno renal	a) Proteinuria persistente mayor de 0,5 gramos por día o mayor de 3+ si no se realiza la cuantificación O b) Moldes celulares: pueden ser glóbulos rojos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtas
8) Neurológicos	a) Convulsiones: en ausencia de fármacos nocivos o trastornos metabólicos conocidos; por ejemplo, uremia, cetoacidosis o desequilibrio electrolítico O b) Psicosis: en ausencia de fármacos nocivos o trastornos metabólicos conocidos, por ejemplo, uremia, cetoacidosis o desequilibrio electrolítico
9) Trastorno hematológico	a) Anemia hemolítica - con reticulocitosis O b) Leucopenia: menos de 4.000/mm ³ en total en 2 o más ocasiones O c) Linfopenia: menos de 1.500/mm ³ en 2 o más ocasiones O d) Trombocitopenia: menos de 100.000/mm ³ en ausencia de fármacos nocivos
10) Trastorno inmunológico	a) Anti-ADN: anticuerpo contra ADN nativo en título anormal O b) Anti-Sm: presencia de anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm O c) Hallazgo positivo de anticuerpos anti-fosfolípidos basados: 1) un nivel sérico anormal de anticuerpos anti-cardiolipina IgG o IgM, 2) un resultado positivo para el anticoagulante lúpico utilizando un método estándar, o 3) una prueba serológica falsa positiva para sífilis que se sabe que es positiva durante al menos 6 meses y confirmada por la inmovilización de Treponema pallidum o la prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes.
11) Anticuerpos antinucleares	Un título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en cualquier momento y en ausencia de fármacos que se sabe que están asociados con el síndrome de "lupus inducido por fármacos"

Además:

15

- Los sujetos tienen anticuerpos antinucleares elevados en la selección $\geq 1:80$ mediante un análisis inmunofluorescente en el laboratorio central y/o anti-ADNbc positivo y/o anti-Sm por encima del nivel normal según lo determinado por el laboratorio central. (Si los resultados del laboratorio central son negativos y los resultados positivos se documentan en el sitio, se permite una sola repetición de los valores del laboratorio central.)

- 5 • Los sujetos también tienen una puntuación en el Índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico 2000 (SLEDAI-2K) en la evaluación de ≥ 6 para ser elegibles. Al menos 4 de los puntos son atribuibles a criterios clínicos que incluyen al menos uno de los siguientes parámetros clínicos: artritis, erupción, miositis, úlceras mucosas, pleuresía, pericarditis, vasculitis y puntos excluyentes del dolor de cabeza por lupus y síndrome cerebral orgánico.
- 10 • El día 1, los sujetos tienen una puntuación SLEDAI-2K de ≥ 4 que incluye puntos de al menos uno de los siguientes componentes clínicos: artritis, erupción, miositis, úlceras mucosas, pleuresía, pericarditis, vasculitis y fiebre y parámetros excluyentes que requieren resultados de laboratorio central (hematuria, piuria, cilindros urinarios, proteinuria, anti-ADNp positivo, disminución del complemento, trombocitopenia y leucopenia). Se excluyen los puntos de dolor de cabeza por lupus y síndrome cerebral orgánico.
- 15 • Los sujetos tienen al menos una de las siguientes manifestaciones de LES, según lo definido por los criterios de 2004 del Grupo de Evaluación de Lupus de las Islas Británicas (BILAG) modificado para su uso en este estudio:
 - (1) Puntuación BILAG A o B en el sistema del cuerpo mucocutáneo
 - (2) Puntuación BILAG A o B en el sistema musculoesquelético debido a la poliartritis activa definida de la siguiente manera:
 - 20 ■ (a) "BILAG A": artritis severa (BILAG # 41) manifestada por sinovitis activa observada en ≥ 2 articulaciones con marcada pérdida de rango funcional de movimientos y deterioro significativo de las actividades básicas de la vida diaria, que ha estado presente durante varios días acumulativamente durante las últimas 4 semanas, incluso en el momento de la visita de selección. Las ADL básicas se definen como las siguientes actividades que requieren asistencia o dispositivos de asistencia (al menos uno debe estar presente y documentado en la fuente): deambulación, ir al baño, aseo, incluyendo bañarse, vestirse, alimentarse (no responde a los esteroides hasta 10 mg/día, antipalúdicos, AINE).
 - 25 ■ (b) "BILAG B": Artritis moderada o tendinitis o tenosinovitis (BILAG # 42) definida como tendinitis/tenosinovitis o sinovitis activa en ≥ 1 articulación (observada o a través mediante el historial) con cierta pérdida del rango funcional de movimientos que conducen a cierta pérdida del intervalo funcional de movimiento como se manifiesta por efectos en ADL instrumentales (como cocinar, conducción, uso del teléfono o el ordenador, compras, limpieza, etc.) que ha estado presente durante varios días durante las últimas 4 semanas y está presente en el momento de la visita de selección.
 - 30
 - 35 ◦ (3) si solo una puntuación "B" y ninguna "A" está presente en el sistema del cuerpo mucocutáneo o en el sistema del cuerpo musculoesquelético debido a la artritis, al menos un B debe estar presente en los otros sistemas corporales para un total de 2 puntuaciones del sistema corporal BILAG "B".
- 40 A menos que sean intolerantes, los sujetos deben recibir actualmente al menos uno de los siguientes agentes ahorradores de esteroides durante un mínimo de 12 semanas, y una dosis estable durante al menos 56 días (8 semanas) antes de firmar el consentimiento: azatioprina (AZA), cloroquina, hidroxicloroquina, metotrexato (MTX), leflunomida, micofenolato de mofetilo/ácido micofenólico. Los sujetos deben permanecer en dosis estables durante todo el estudio.
- 45 No se requiere prednisona (o equivalente de prednisona); sin embargo, si el sujeto está tomando prednisona (o equivalente de prednisona), la dosis no puede exceder los 30 mg/día en el examen para que un sujeto sea elegible y debe ser estable a un máximo de 10 mg/día durante al menos 5 días antes del día 1 (aleatorización). Cualquier otro medicamento inmunosupresor o biológico requiere períodos de lavado antes de entrar en el estudio. Si los sujetos reciben medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (incluidos los inhibidores de COX-2 comercializados), las dosis deben ser estables durante 14 días antes de la primera dosis del medicamento del estudio el día 1 (aleatorización) y el sujeto debe permanecer en la misma dosis a lo largo del estudio. Nota: Los AINE deben suspenderse durante al menos 12 horas antes de las visitas, donde BILAG, SLEDAI 2K, recuentos de articulaciones, se evalúa el área de la enfermedad del lupus eritematoso cutáneo y el índice de gravedad (CLASI) y MDGA.
- 50
- 55 Las pacientes en edad fértil tienen una prueba de embarazo en suero u orina negativa (sensibilidad mínima de 25 UI/l o unidades equivalentes de gonadotropina coriónica humana) dentro de las 24 horas previas al inicio de la administración del fármaco del estudio. Las pacientes femeninas no están amamantando. Las pacientes en edad fértil deben usar anticonceptivos durante el tratamiento con el fármaco del estudio más 5 semividas del fármaco del estudio (7 días) más 30 días (duración del ciclo ovulatorio) durante un total de 65 días después de la finalización del tratamiento. Los hombres que son sexualmente activos con pacientes femeninas en edad fértil deben usar anticonceptivos durante el tratamiento con el fármaco del estudio más 5 semividas del fármaco del estudio (7 días) más 90 días (duración del recambio de esperma) durante un total de 125 días después de la finalización del tratamiento. Los varones azoospermicos y las mujeres en edad fértil que no están continuamente activos heterossexualmente están exentos de los requisitos anticonceptivos. Sin embargo, aún deben someterse a pruebas de embarazo.
- 60
- 65

Ejemplo 10: Criterios de exclusión

Los siguientes sujetos no están inscritos en el estudio de Fase 2:

- 5
- a) Sujetos con LES inducido por fármacos, en lugar de LES "idiopático".
- b) Sujetos con otras enfermedades autoinmunes [(por ejemplo, artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM)). (Los sujetos con diabetes mellitus de tipo 1, enfermedad autoinmune del tiroides y síndrome de Sjögren secundario son elegibles).
- 10
- c) Se excluyen los sujetos con síndrome primario de anticuerpos anti-fosfolípidos como la característica única o primaria de su LES o síndrome similar al LES. Sin embargo, los sujetos con síndrome antifosfolípido secundario se incluyen en el estudio, a menos que hayan sufrido un acontecimiento trombótico grave (por ejemplo, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular o trombosis venosa profunda) dentro de un año antes de firmar el consentimiento. Los sujetos que reciben coumadina crónica o enoxaparina pueden inscribirse en el estudio.
- 15
- Los sujetos con las siguientes afecciones médicas, enfermedades concomitantes e historiales médicos no están inscritos en el estudio de Fase 2:
- 20
- a) Sujetos con cualquier cirugía mayor dentro de las 6 semanas de la administración del fármaco del estudio (Día 1) o cualquier cirugía electiva planificada durante el curso del estudio.
- b) Sujetos con antecedentes o riesgo de tuberculosis (TB), específicamente sujetos con:
- 25
- (1) Evidencia actual clínica, radiográfica o de laboratorio de TB activa.
- (2) Un historial de TB activa en los últimos 3 años, a menos que exista documentación que indique que el tratamiento antituberculoso previo fue apropiado en duración y tipo de acuerdo con las directrices actuales de la Organización Mundial de la Salud.
- 30
- (3) TB latente definida como Quantiferon positivo (QFG) u otra prueba de diagnóstico en ausencia de manifestaciones clínicas, a menos que el sujeto haya recibido al menos 1 mes de tratamiento con isoniazida u otros agentes recomendados por las directrices locales de la Autoridad de Salud, y una prueba de ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA), por ejemplo, QFG o T-Spot, es negativo antes del día 1.
- 35
- (4) La prueba QFG positiva (u otra prueba de diagnóstico) en el examen de detección o dentro de los 3 meses previos al día 1 es aceptable siempre que haya documentación de un resultado negativo para el día 1.
- 40
- c) Sujetos con lupus neuropsiquiátrico activo o inestable, incluidos, entre otros, cualquier condición definida por los criterios BILAG "A", con la excepción de mononeritis múltiple y polineuropatía, que están permitidas.
- d) Sujetos con nefritis lúpica severa activa (clase III, IV de la OMS) que requiere o puede requerir tratamiento con agentes citotóxicos o corticosteroides en dosis altas. Están permitidos los sujetos con enfermedad renal previa controlada con proteinuria residual de hasta 3 g/día o una proporción de proteína/creatinina en orina de 3 mg/mg o 339 mg/mmol.
- 45
- e) Sujetos con herpes zóster que se resolvieron menos de 2 meses antes de la detección.
- 50
- f) Sujetos con evidencia (según lo evaluado por el investigador) de infecciones bacterianas o virales activas o latentes en el momento de la selección potencial, incluidos sujetos con evidencia de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) según lo definido por la positividad del anticuerpo 2 del VIH-1.
- g) Sujetos que actualmente reciben hidroxycloquina o cloroquina con evidencia de retinopatía dentro de los 6 meses posteriores a la evaluación o que no se han sometido a una evaluación oftalmológica dentro del año posterior a la evaluación y que no se han realizado este examen o que no desean o no pueden realizarse exámenes oftalmológicos regulares mientras participan en el estudio.
- 55
- h) La enfermedad concomitante que, en opinión del investigador, es probable que requiera terapia de glucocorticosteroides sistémicos adicionales durante el estudio, (por ejemplo, asma) es excluyente. Sin embargo, se permite el tratamiento del asma con terapia de corticosteroides inhalados.
- 60
- i) Sujetos femeninos con selección de cáncer de mama sospechoso de malignidad y en quienes la posibilidad de malignidad no puede excluirse razonablemente después de una clínica adicional, evaluaciones de laboratorio u otras evaluaciones de diagnóstico.
- 65

j) Sujetos con antecedentes de cáncer en los últimos cinco años (que no sean cánceres de células de piel no melanoma curados mediante resección local). Los cánceres de células de piel no melanoma existentes deben eliminarse antes de la aleatorización (tratamiento del día 1). Se permite el carcinoma *in situ*, tratado con intervención quirúrgica definitiva.

5 k) Sujetos con cualquier infección bacteriana o viral grave aguda y/o crónica (como neumonía, infección renal y sinusitis). La documentación de la resolución debe estar disponible en la historia clínica antes del día 1 (aleatorización).

10 g) Donación de sangre a un banco de sangre o en un estudio clínico (excepto una visita de detección) dentro de las 4 semanas de la administración del fármaco del estudio (dentro de las 2 semanas solo para plasma).

h) Transfusión de sangre dentro de las 4 semanas de la administración del fármaco del estudio.

15 i) Sujetos con incapacidad para someterse a venopunción y/o tolerar el acceso venoso.

j) Sujetos con antecedentes de alergia a medicamentos importantes (como anafilaxia o hepatotoxicidad).

20 k) Cualquier otra razón sólida médica, psiquiátrica y/o social según lo determine el investigador.

Los sujetos con las siguientes afecciones médicas, enfermedades concomitantes e historiales médicos no están inscritos en el estudio de Fase 2:

25 a) Evidencia de disfunción orgánica o cualquier desviación clínicamente significativa de lo normal en la exploración física, las constantes vitales, las determinaciones de ECG o laboratorio clínico más allá de lo que es consistente con la población objetivo.

b) Antígeno de superficie para hepatitis B positivo.

30 c) Anticuerpo positivo contra la hepatitis C con ensayo de inmunotransferencia recombinante positivo (RIBA) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

d) Glóbulos blancos (WBC) $<1.200/\text{mm}^3$ ($1,2 \times 10^9/\text{l}$).

35 e) Plaquetas $<50.000/\text{mm}^3$ ($50 \times 10^9/\text{l}$).

f) Hemoglobina $<8 \text{ g/dl}$ o $<7 \text{ g/dl}$ si se debe a anemia hemolítica relacionada con LES.

40 g) Proteinuria $> 3,0 \text{ g/día}$ (3.000 mg/día) o nivel equivalente de proteinuria según lo evaluado por la relación proteína/creatinina (3 mg/mg o 339 mg/mmol).

h) Creatinina sérica $> 2,0 \text{ mg/dl}$.

45 i) Sedimento urinario activo definido como cilindros de glóbulos rojos (RBC).

j) Alanina aminotransferasa (ALT) sérica $> 2 \times$ límite superior de la normalidad (ULN), a menos que esté explícitamente relacionado con el lupus basado en el juicio del investigador.

50 k) Aspartato aminotransferasa sérica (AST) $> 2 \times$ ULN, a menos que esté explícitamente relacionado con el lupus basado en el juicio del investigador.

l) Análisis de orina positivo para drogas ilegales de abuso, excepto si estos medicamentos son recetados por el médico encargado del tratamiento (debe documentarse), y excepto por otros medicamentos que no son ilegales dentro del país o la región

55 m) Cualquier otro resultado de prueba de laboratorio que, en opinión del investigador, podría poner al sujeto en un riesgo inaceptable para participar en este estudio.

60 Los medicamentos prohibidos y/o restringidos que se toman antes de la administración del medicamento en el estudio se describen a continuación:

1) Exposición previa a BMS-931699.

65 2) Uso de cualquier otro fármaco, incluyendo medicamentos de venta libre y preparaciones a base de hierbas, dentro de 1 semana antes de la administración del medicamento del estudio, excepto aquellos medicamentos aprobados por el monitor médico de BMS.

3) El uso de ciclofosfamida, cualquier agente intravenoso, intraarticular o biológico está prohibido durante el estudio.

5 4) Para los sujetos que desarrollan neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos $<1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$), la dosificación con micofenolato mofetilo/ácido micofenólico se debe interrumpir o reducir la dosis según el prospecto.

10 5) Sujetos que hayan recibido vacunas vivas dentro de los 30 días de la selección. (Además, las vacunas vivas no deben usarse dentro de los 2 meses posteriores a la última dosis y cualquier otra vacuna inactivada, tal como el tétanos, etc., debe usarse de acuerdo con las pautas locales, en su caso, durante el período de tratamiento).

6) Sujetos en los que se ha programados o previsto una cirugía electiva durante el transcurso del estudio.

15 No se administrarán medicamentos concomitantes (recetados, de venta libre o de hierbas) durante el estudio a menos que el investigador los recete para el tratamiento de acontecimientos clínicos específicos.

Ejemplo 11: Administración de BMS-931699 o placebo

20 BMS-931699 o un placebo de aspecto similar se administra semanalmente como una solución de una sola inyección subcutánea (SC), en función del panel de dosificación. La etiqueta clínica refleja el nombre del producto como "BMS-931699-01" que se vinculará con la descripción del producto en el vial. La composición de la inyección de BMS-931699-01 es de 12,5 mg/ml de BMS-931699 en fosfato 20 mM, pH 5,9, con 5 % (p/v) de sorbitol. La inyección de BMS-931699-01 se envasa en un vial de 3 cc con una abertura de 13 mm, 1 panel, abierto. La inyección de BMS-931699-1 parece una solución de transparente a ligeramente opalescente, de incolora a de color amarillo pálido. La inyección de BMS-931699-01 se almacena refrigerada de 2-8 °C (36-46 °F).

La Tabla 4 a continuación indica la dosis total y el número de viales por dosis para cada panel de dosificación.

Tabla 4: Administración del tratamiento

Tratamiento	Dosis diaria total	Concentración de la formulación	Numero de viales
1	1,25 mg SC EOW	12,5 mg / ml	1
2	5 mg SC EOW	12,5 mg / ml	1
3	12,5 mg SC EOW	12,5 mg / ml	1
4	12,5 mg SC semanal	12,5 mg / ml	1
5	Placebo	Placebo	Solución salina normal (NSS)

30 Para la dosificación subcutánea (SC), no se requiere dilución de la solución del medicamento (12,5 mg/ml) para dosis de 12,5 mg. Sin embargo, las dosis de 5 mg y 1,25 mg requieren dilución. Se utiliza una aguja estéril de 1,5 pulgadas (3,8 cm) de calibre 21 para extraer este producto del vial y una aguja estéril de 0,5 pulgadas (1,3 cm) de calibre 27, para la dosificación SC. Se usa una jeringa de policarbonato convencional comercialmente disponible del tamaño apropiado para extracción y administración. Después de extraerlo en una jeringa del tamaño apropiado, el producto se administra en 4 horas. Si no se dosifica de inmediato, las jeringas cargadas se mantienen a 2 °C-8 °C (36 °-46 °F) con protección frente a la luz antes de su uso. El placebo para la inyección de BMS-931699 es una solución salina normal, que se administra de manera similar a la descrita para la inyección de BMS-931699. El personal del estudio administra la dosis al sujeto.

40 El día 1, los sujetos se aleatorizan a uno de los brazos de dosificación en la Tabla 4 en un esquema de aleatorización 1:1:1:1:1. Por la mañana del día 1, cada sujeto recibe una dosis única SC de BMS-931699 o placebo. El punto primario de inyección es uno de los brazos superiores. Sin embargo, otros puntos de inyección son aceptables. En este punto no hay restricciones conocidas relacionadas con la ingesta de alimentos y fluidos asociadas con BMS-931699.

45 Se requiere que cada sujeto aleatorizado venga a la clínica/centro de investigación semanalmente para recibir la dosis. Esto asegura que se mantenga el doble ciego a pesar de la variabilidad de los regímenes. Los sujetos aleatorizados a inyecciones subcutáneas semanales de placebo o BMS-931699 se dosifican semanalmente según el programa y los sujetos aleatorizados a uno de cada dos semanas del brazo alternan entre recibir una inyección subcutánea de BMS-931699 una semana y una de placebo la semana siguiente.

Ejemplo 12: Biomarcadores

55 En el estudio se incorporan los ensayos de farmacodinámica, acoplamiento al objetivo y biomarcadores relacionados con la enfermedad, para informar sobre la selección de la dosis, monitorizar la eficacia y potencialmente predecir la respuesta al tratamiento. Se extraen sangre y orina para medir los marcadores de acoplamiento al objetivo y los efectos farmacodinámicos de BMS-931699, incluida la ocupación del receptor CD28, C3, C4 y autoanticuerpos.

El acoplamiento al objetivo, según lo evaluado por la ocupación del receptor CD28 en los linfocitos T, se incorpora al estudio para informar sobre la selección de dosis para el estudio de Fase 3, monitorizar la eficacia y potencialmente predecir la respuesta al tratamiento. Se caracteriza la relación entre los niveles de concentración de BMS-931699 y la ocupación del receptor CD28.

Otros biomarcadores incluyen: otras citocinas y quimiocinas, anti-ácido desoxirribonucleico bicatenario (anti-ADNbc), anticuerpo antinuclear (anti-ANA), autoanticuerpos anti-Ro (también conocido como anti-SSA, anti-SSA/RO, o anti-Ro/SSA), autoanticuerpos anti-Lupus (anti-La) (también conocido como anti-antígeno B de tipo síndrome de antígeno de Sjögren (anti-SS-B)), autoanticuerpos anti-proteína ribonuclear (anti-RNP), autoanticuerpos anti-antígenos nucleares Sm, autoanticuerpos anti-APL y otros autoanticuerpos. proteína C reactiva (PCR), inmunoglobulina G total (IgG), inmunoglobulina M total (IgM), transcritos de ARN en sangre completa, proteínas en orina (NGAL, TWEAK, MCP-1, IL-18, IL-1), CD28 soluble total, Activación de linfocitos T, fenotipos leucocitarios en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) y de sangre entera (CD4 de superficie, CD8 de superficie, CD28 de superficie, CD57 de superficie y granzima intracelular B), mediadores inflamatorios solubles (IL-6 sérica, IL-18, TNF- α , α -interferón, BLYS (BAFF), CD154, sCD28 y otros receptores solubles, microvesículas) también pueden servir como biomarcadores.

Algunos criterios de valoración farmacodinámicos relevantes para el LES se caracterizan a continuación:

Evaluaciones basadas en sangre (ARN)

La muestra de ácido ribonucleico (ARN) de sangre entera se recoge en tubos de genes PAX en los momentos indicados. Estas muestras proporcionan un perfil genómico amplio para buscar nuevos biomarcadores farmacodinámicos y de eficacia relacionados con las vías inflamatorias y/o autoinmunes. Adicionalmente, estas muestras se utilizan para buscar expresiones genéticas al inicio del estudio que puedan predecir la eficacia de los sujetos tratados con BMS-931699.

Fenotipado de leucocitos

La sangre periférica se recoge para inmunofenotipar por citometría de flujo. Los linfocitos T pueden caracterizarse por activación y por subpoblaciones. Los marcadores pueden incluir combinaciones de, aunque no de forma limitativa, CD4, CD8, CD28, CD57 de superficie y granzima intracelular B. Se pueden analizar otras células periféricas, incluyendo linfocitos B, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células NK.

Biomarcadores de orina

La orina se recolecta y analiza en busca de marcadores de LES y otros trastornos inflamatorios. Las muestras se analizan en busca de perfiles proteómicos de marcadores inflamatorios (incluidos, entre otros, IL-18, IL-1, NGAL, uTWEAK, MCP-1). El análisis exploratorio se lleva a cabo para identificar biomarcadores para controlar la PD y la respuesta al tratamiento en pacientes con afectación renal.

Suero de sangre periférica y biomarcadores de en plasma

Se recoge suero y plasma para la medición de mediadores inflamatorios solubles asociados con la inflamación, LES o bloqueo de coestimulación (incluidos, aunque no de forma limitativa, IL-6 sérica, IL-18, TNF- α , α -interferón, BLYS (BAFF), CD154, sCD28 y otros receptores solubles, microvesículas). El análisis exploratorio se lleva a cabo para identificar biomarcadores de LES y para controlar la PD y el impacto de BMS-931699 en las vías inflamatorias.

Evaluaciones de investigación de los resultados

Los sujetos completan la Evaluación Funcional de la Terapia de Enfermedad Crónica-Fatiga (FACIT-F), el cuestionario de formulario abreviado 36 de la FDA (SF-36) y la Evaluación global de la actividad de la enfermedad (PGA) del sujeto. Estas páginas son documentos fuente en este estudio. Todas las evaluaciones de investigación de resultados deben completarse antes de estudiar la administración de medicamentos en las visitas programadas al consultorio.

Medidas de resultado de eficacia exploratoria

Calidad de vida relacionada con la salud

El SF-36 se usa para medir la calidad de vida relacionada con la salud. Se calculan las puntuaciones individuales de la subescala y dos puntuaciones resumidas: (1) resumen de componentes físicos (PCS) que incluye el funcionamiento físico, el papel físico, el dolor corporal y la salud general; (2) resumen del componente mental (MCS) que incluye vitalidad, funcionamiento social, funcionamiento emocional y salud mental. El SF-36 es una herramienta ampliamente reconocida por la FDA como un instrumento validado para medir la calidad de vida relacionada con la

salud en múltiples estados de enfermedad.

Fatiga

5 La fatiga es evaluada por el FACIT-F. FACIT-F es un cuestionario de calidad de vida relacionado con la salud centrado en la fatiga. FACIT-F incluye los siguientes componentes; bienestar físico, bienestar social/familiar, bienestar emocional, bienestar funcional y preocupaciones adicionales.

10 La divulgación expuesta en el presente documento se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones específicas de la misma. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO UTILIZANDO UN ANTICUERPO DE DOMINIO DIRIGIDO CONTRA CD28

20 <130> 12394-WO-PCT

<150> 62/057981
<151> 30/09/2014

25 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 1

Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe Leu Glu
1 5 10

40 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

50 <400> 2

Phe Thr Ser Arg Leu Arg His
1 5

55 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Péptido sintético

ES 2 783 448 T3

<400> 3

Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala Thr
 1 5

5 <210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 5

ES 2 783 448 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 6
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 6

ES 2 783 448 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 7

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

Asp Cys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

ES 2 783 448 T3

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Cys Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 783 448 T3

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 9

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 10

ES 2 783 448 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Cys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

ES 2 783 448 T3

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Cys Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 13
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 13

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Cys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 783 448 T3

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 14

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Cys Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 15

ES 2 783 448 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Trp Pro Phe
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Arg Leu Arg His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Val Ala Asn Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Ser Gln Gly Thr Cys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo de dominio variable de inmunoglobulina simple anti-CD28 para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) en un paciente, que comprende un dominio variable, en donde el dominio variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (1h-239-891(D70C)) o difiere de la SEQ ID NO: 12 en hasta 5 aminoácidos, en donde el anticuerpo de dominio anti-CD28 se administra por vía subcutánea a una dosis de 12,5 mg cada semana o cada dos semanas, comprendiendo el dominio variable del anticuerpo de dominio variable de inmunoglobulina simple anti-CD28: (1) una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (2) una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (3) una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
- 10
2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo de dominio variable de inmunoglobulina simple anti-CD28 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.
- 15 3. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo de dominio variable de inmunoglobulina simple anti-CD28 comprende un polietilenglicol ramificado de 40 kDa.
4. El anticuerpo para el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde se administran al menos 12 dosis.
- 20 5. El anticuerpo para el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde se administran al menos 24 dosis.
6. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además administrar al paciente un agente inmunosupresor/inmunomodulador y/o antiinflamatorio.

Fig. 1

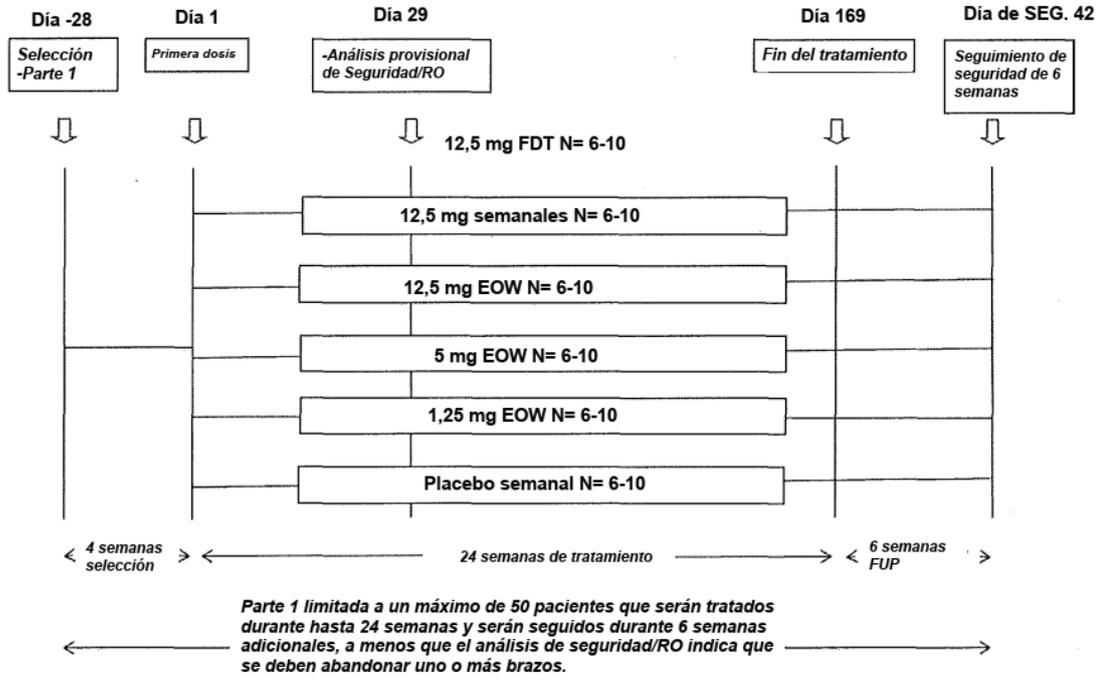
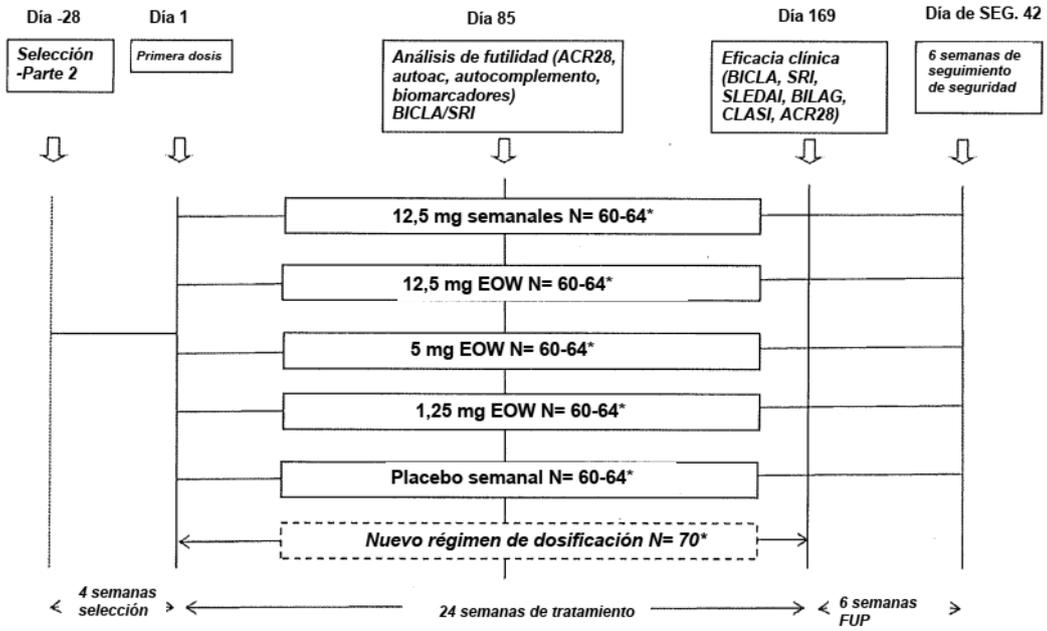
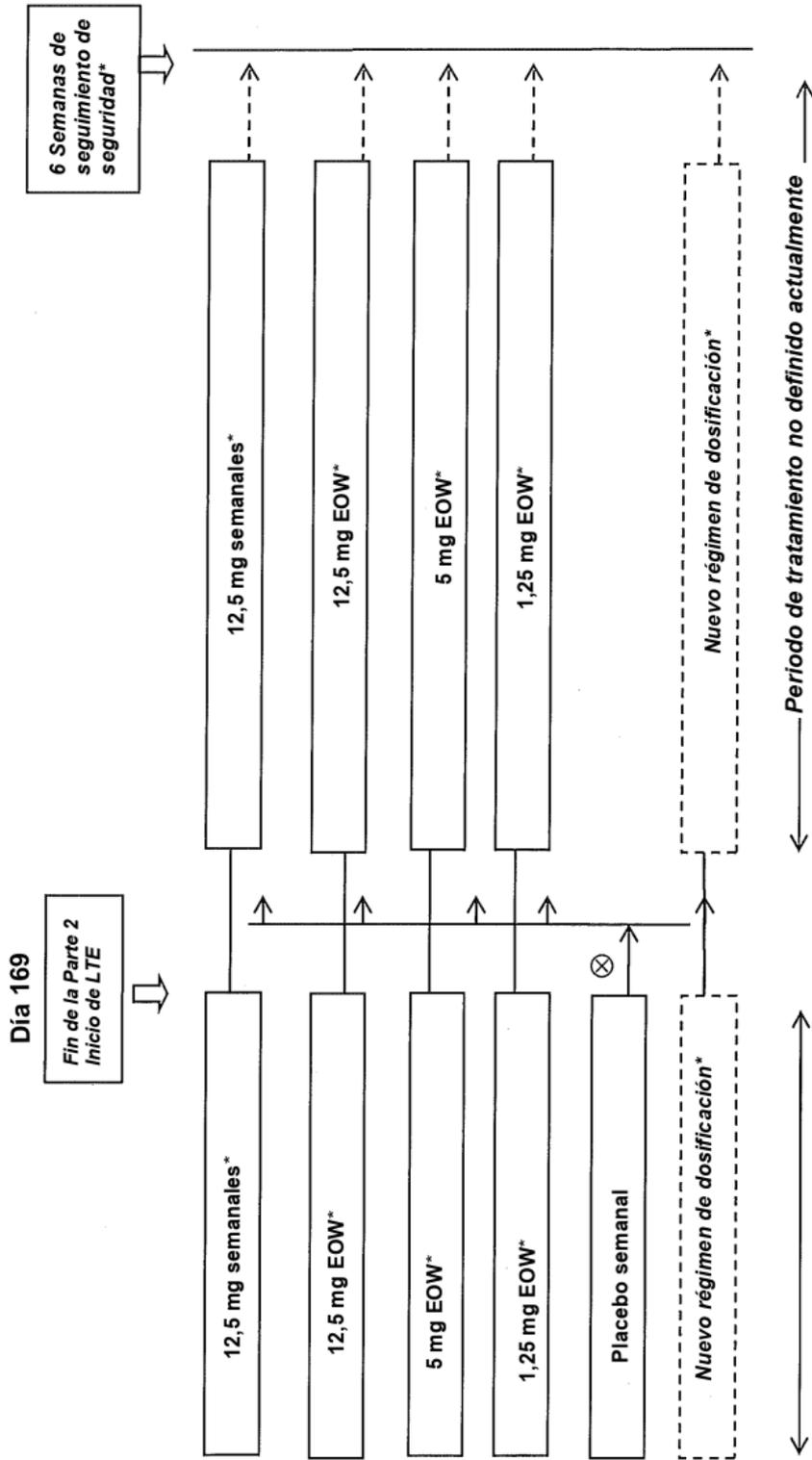


Fig. 2



*El brazo de tratamiento puede o no estar incluido según el análisis provisional del día 29, Parte 1

Fig. 3



24 semanas de tratamiento

Período de tratamiento no definido actualmente

* El brazo de tratamiento puede o no estar incluido según los Análisis Provisionales.

⊗ Los Sujetos en el brazo de placebo se reasignarán a los brazos de tratamiento activo existentes el día 169

El Día de SEG 42 se producirá tras la última dosis de la medicación del estudio, sea la última dosis en periodos a corto o a largo plazo

Fig. 4

