



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INV. 1111111111

RG

Valle

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

10-127112

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BIOTEST AG

DOMICILIO

DREIEICH, ALEMANIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

(FORMA P-10)

13-10-2010



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-127112- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:04:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278

FORMULARIO UNICO DE SÓLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: BIOTEST AG
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania.

Dirección: Landsteinerstrasse 5,
63303 Dreieich,
Alemania

Domicilio: Dreieich,
Alemania

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. Matthias GERMER
Theodor-Heuss-Strasse 1,
63225 Langen,
Alemania

2. Frank OSTERROTH
Konrad-Adenauer-Allee 22,
63128 Dietzenbach,
Alemania

3. Silke AIGNER
An der kurzen Gewanne 24,
67227 Frankenthal,
Alemania

4. Christoph UHEREK
Lachenwoerthsweg 6,
63500 Seligenstadt,
Alemania

5. Elmar KRAUS
Bahnhofstrasse 51 A,
61118 Bad Vilbel,
Alemania

6. Andrea WARTENBERG-DEMAND
Waldstrasse 68,
35440 Linden,
Alemania

7. Daniele WOLF
Zum Roehrbrunnen 17a,
63303 Dreieich,
Alemania

8. Sibylle KAISER
Stuchkerstrasse 3,
64673 Zwingenberg,
Alemania

9. Juergen LINDNER
Sandplackenstrasse 5,
60488 Frankfurt,
Alemania

10. Christoph BRUECHER
Unter den Tannen 3a,
65760 Eschborn,
Alemania

11. Benjamin DAELKEN
Eleonore-Sterling-Strasse 40,
60433 Frankfurt am Main,
Alemania

5 PCT (86)

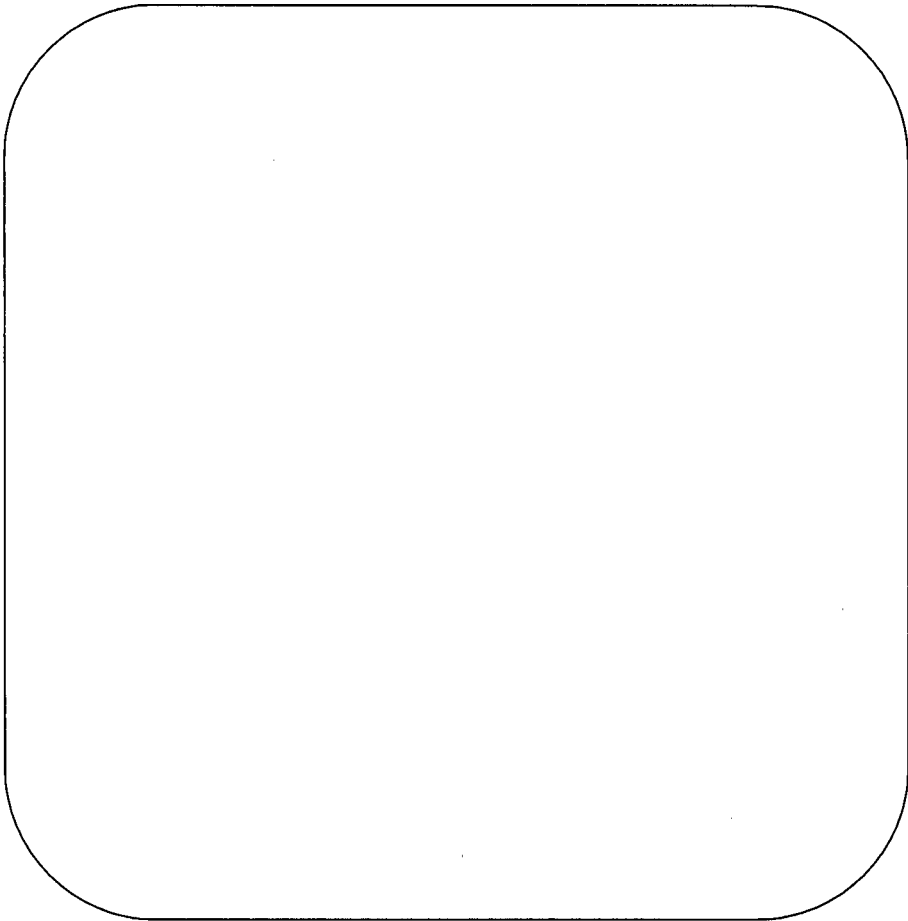
Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/052811 Fecha: 10 de marzo de 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/124815 A1 Fecha: 15 de octubre de 2009

6	Título (54)	AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD (23L)		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K 016/028</u> <u>A61P 37/06</u> <u>C07K 16/46</u>			
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>GB</u> <u>GB</u>	(32) Fecha <u>13 de marzo de 2008</u> <u>29 de septiembre de 2008</u>	(31) Número de Solicitud <u>0804684.9</u> <u>0817810.5</u>
9	Comprobante de pago No.: 10-75,717 Fecha: 13 de septiembre de 2010 Comprobante de pago No.: 10-80,838 Fecha: 27 de septiembre de 2010 Comprobante de pago No.: 10-80,839 Fecha: 27 de septiembre de 2010 Comprobante de pago No.: 10-83,196 Fecha: 5 de octubre de 2010 Comprobante de pago No.: 10-83,212 Fecha: 5 de octubre de 2010			
10	Anexos:			
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.00.			
☒	Comprobante de pago por 46 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.196.000.00.			
☒	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.			
☒	Poderes, si fuere el caso.			
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.			
☐	Declaraciones.			
☒	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☒	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☐	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.			
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.			
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.			
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.			
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.			
☐	Arte final 12x12			
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.			
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS			

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

ASA

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/124815 A1

Descripción:

Páginas 61 en el idioma original

Páginas 71 en español

Reivindicaciones: Número (s) 56

Figuras: Número (s) 20

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BIOTEST AG

domiciliado (s) en/of Landsteinerstr. 5,

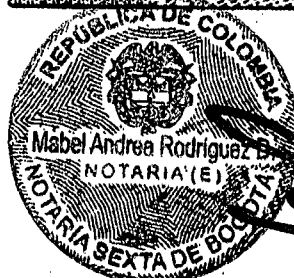
63303 Dreieich, Germany

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above. b) The actions of unfair competition, consumer protection to the consumer, nullity, precautionary measures, administrative or Court cancellation of trademarks, oppositions or observations, administrative or Court cancellation of industrial designs, nullity, measures of protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those matters, actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And in all the above matters they may exercise the power of attorney, promote, defend, conciliate, admit



an. Y para que en todos los asuntos arriba determinados,
n sustituir este mandato. transigir, conciliar, admitir los hechos del
ceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de
ntes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by
representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 25. Mai 2007

en/in Dreieich, Germany

por/by

Biotest AG

Firma

Signature



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de
Dr Peter Pustoslemsek u, Ulrike Burkhard
es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo
de Prokuristen
de la compañía BIOTEST AG

compañía que actualmente existe y está organizada de acuerdo a
las leyes de Alemania

beim Amtsgericht Offenbach HRB 42396
que la dirección de dicha compañía es Landsteinerstr. 5,
3303 Dreieich, Alemania

que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los
documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Dreieich

El 25. Mai 2007

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of
Dr. Peter Pustoslemsek und Ulrike Burkhard
is authentic, that the signatory currently acts in the position of
Prokuristen
of the company BIOTEST AG

a company currently existing and organized under the laws of
Germany

beim Amtsgericht Offenbach HRB 42396
that the address is Landsteinerstr. 5, 63303 Dreieich, Germany

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon
examination of the corresponding documents.

Given and signed in Dreieich

On 25. Mai 2007

W. Knipp

El Notario Público
(Firma-sello)

W. Knipp

The Notary Public
(Signature-seal)

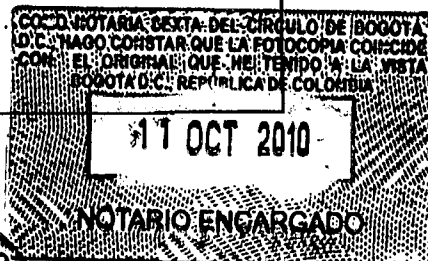


APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

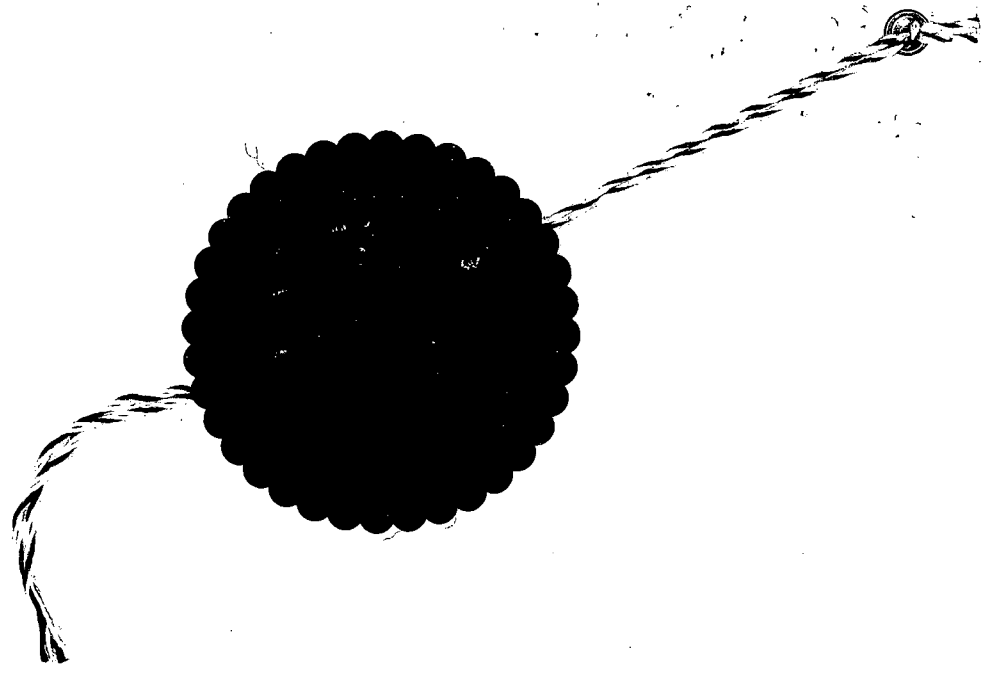
- Country:
This public document
- has been signed by
- acting in the capacity of
- bears the seal/stamp of

Certified

- at 6. the
- by
- No.
- Seal/stamp 10. Signature



4



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Wolfgang Knipp

3. in seiner Eigenschaft als Notar

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des Notars
Wolfgang Knipp in Dreieich

Bestätigt

5. in Darmstadt 6. am 6. Juni 2007

7. durch den Präsidenten des Landgerichts

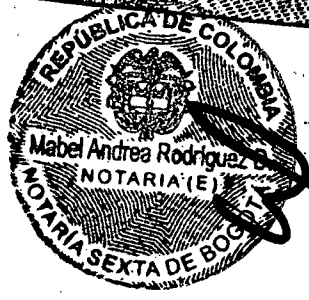
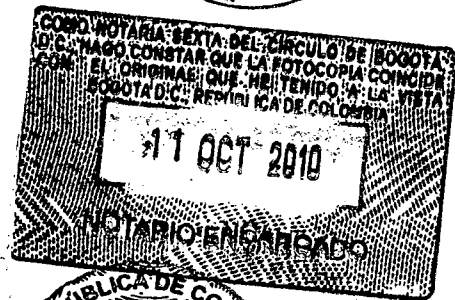
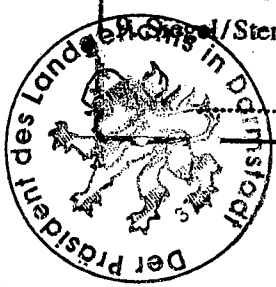
8. unter 910 E 213 - 912107

9. Siegel/Stempel

10. Unterschrift

Im Auftrag

Wellenreuther
Vorsitzender Richter



8

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 07.06/07a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **BIOTEST AG**, domiciliado en Landsteinerstr. 5, 63303 Dreieich, Alemania, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Emilio Ferrero, tpa. 31.929; Luz Clemencia de Páez, tpa. 23.555 y Daniel Peña, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4a No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 25 de mayo de 2007 en Dreieich, Alemania.

Biotest AG

Firma Ilegible

Firma Ilegible

UR.-Nr. 111/2007 del Notario Wolfgang Knipp de Dreieich

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) por medio del cual se certifican las firmas del Dr. Peter Pustoslemsek y Ulrike Burkhard en el anterior documento a nombre de BIOTEST AG y adicionalmente se certifica que dicha sociedad está constituida de conformidad con las leyes de Alemania, que su dirección es Landsteinerstr. 5, 63303 Dreieich, Alemania y que los signatarios están debidamente autorizados para otorgar el presente poder.

Dado y firmado en Dreieich el 25 de mayo de

W. Knipp

Firma Ilegible

Sello de Apostille expedido por el Consulado General de Alemania, y certificado en Darmstadt el 6 de junio de 2007.



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-8975/WPCL002G/COLO 05099-701-005-8

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

627384

Diego Vargas

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Diego Felipe Barrera
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 10 JUL 2007

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2007 JUL 10 P 12

UCS

JEFE DE LEGALIZACION
BOGOTA D.C.

COPIA NOTARIA SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
11 OCT 2010
NOTARIO ENCARRGADO



TRADUCCION OFICIAL No. 13063

de un documento escrito en Alemán, efectuada por Luz Arriaga de Herber, resolución del Ministerio de Justicia 599 del 6 de marzo 1978.-

Traducción de los sellos y autenticaciones en alemán que aparecen en el documento de representación y poder, escrito en español e inglés, por medio del cual BIOTEST AG, domiciliada en Landsteinerstr. 5, 63303 Dreieich, Alemania, nombra como sus representantes a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555 y DANIEL PEÑA, tpa 65620, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. Hay dos firmas ilegibles de los representantes legales de dicha compañía. Dado y firmado el 25 de mayo en Dreieich, Alemania.-

Sigue certificación notarial de las firmas antecedentes en español e inglés y certificación de la existencia de la compañía bajo HRB 42396 del Juzgado Municipal de Offenbach, el 25 de mayo de 2005 por el notario de Dreieich, Wolfgang Knipp.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
2. Ha sido firmado por Wolfgang Knipp
3. Actuando en calidad de notario;
4. Lleva el sello del notario de Dreieich, Wolfgang Knipp

Certificado

5. en Darmstadt
7. por el Presidente del Tribunal Regional
8. bajo el No. 910 E 2/3 912/07
9. Sello
(sello redondo No. 3 – en tinta -)
El Presidente del Tribunal Regional de Darmstadt

6. el 6 de junio de 2007

10. Firma
p.e. Fdo.: firma ilegible
Wellenreuther
Juez Presidente

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 06 de julio de 2007.
C. 1349



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

273771

Leg. Porroga

NOVA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESMPEÑA
AS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

*Señ. Amparo de
Pérez*

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 10 JUL 2007

CODEX JURISCUINIS



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

JUL 10 P 12:01

1003

DE LEGALIZACION
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA
DEL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C.

11 OCT 2010

NOTARIO ENCARGADO



CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

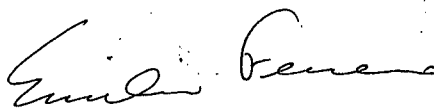
E. S. D.

Poderdante : BIOTEST AG

Poder conferido el : 25/05/2007

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

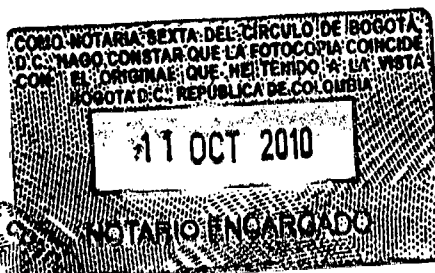
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

03 NOV 2009

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Comperado(eron)

*Emilio Tenorio
Williamson y Luz Clemencia
Suarez de Paz*

Quien(as) exhibió(eron) la(s) C.C.

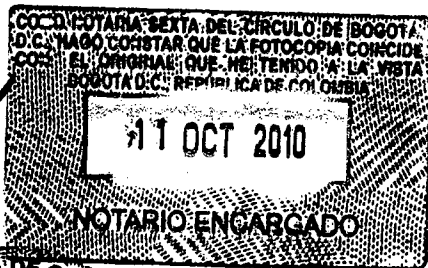
CC 438019 TP 31929

CC 35456349 TP 23555

Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

*Emilio Tenorio
Luz Clemencia Suarez de Paz*



3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 October 2009 (15.10.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/124815 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2009/052811

(22) International Filing Date:

10 March 2009 (10.03.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

0804684.9 13 March 2008 (13.03.2008) GB
0817810.5 29 September 2008 (29.09.2008) GB

(71) Applicant (for all designated States except US):
BIOTEST AG [DE/DE]; Landsteinerstrasse 5, 63303 Dreieich (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GERMER, Matthias** [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 1, 63225 Langen (DE). **OSTERROTH, Frank** [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Allee 22, 63128 Dietzenbach (DE). **AIGNER, Silke** [DE/DE]; An der Kurzen Gewanne 24, 67227 Frankenthal (DE). **UHEREK, Christoph** [DE/DE]; Lachenwoerthsweg 6, 63500 Seligenstadt (DE). **KRAUS, Elmar** [DE/DE]; Bahnhofstrasse 51 A, 61118 Bad Vilbel (DE). **WARTENBERG-DEMAND, Andrea** [DE/DE]; Waldstrasse 68, 35440 Linden (DE). **WOLF, Daniele** [DE/DE]; Zum Roehrbrunnen 17a, 63303 Dreieich (DE). **KAISER, Sibylle** [DE/DE]; Stuckertstrasse 3, 64673 Zwingenberg (DE). **LINDNER, Juergen** [DE/DE]; Sandplackenstrasse 5, 60488 Frankfurt (DE). **BRUECHER,**

Christoph [DE/DE]; Unter den Tannen 3a, 65760 Eschborn (DE). **DAELKEN, Benjamin** [DE/DE]; Eleonore-Sterling-Strasse 40, 60433 Frankfurt am Main (DE).

(74) Agent: **DANIELS, Jeffrey, Nicholas**; Page White & Far-
rer, Bedford House, John Street, London, Greater London
WC1N 2BF (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: AGENT FOR TREATING DISEASE

(57) Abstract: The provision of a pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 10 mg to 200 mg.

WO 2009/124815 A1

AGENT FOR TREATING DISEASE

The present invention is concerned with treatment of autoimmune diseases. The invention involves an agent such as a humanised monoclonal antibody that may be administered to patients in higher dosages than previously described. It is particularly effective for patients having diseases or characteristics requiring higher doses for effective treatment. The invention envisages a pharmaceutical composition comprising the agent, such as the antibody, in efficacious concentration, as well as uses and methods of treatment employing the compositions and medicaments comprising the agent.

Autoimmunity is the failure of an organism to recognise its own constituent parts (down to sub-molecular levels) as "self", which results in an immune response against its own cells and tissues. Any disease that results from such an aberrant immune response is termed an autoimmune disease. Autoimmune diseases include multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, psoriatic arthritis, colitis ulcerosa, Crohn's disease, myasthenia gravis (MG), autoimmune polyglandular syndrome type II (APS-II), Hashimoto's thyroiditis (HT), type-1 diabetes (T1D), systemic lupus erythematosus (SLE) and autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALS).

Autoimmune disease occurs when T cells recognise and react to 'self' molecules, that is, molecules produced by the cells of the host. Activation of 'autoreactive' T cells by presentation of autoantigens processed by antigen presenting cells (APC) leads to their clonal expansion and migration to the specific tissues, where they induce inflammation and tissue destruction.

Normally, T cells are tolerant with regard to autologous tissue and only react on presentation of heterologous structures. Central tolerance and peripheral tolerance comprise the two mechanisms by which the immune system hinders autoreactive T cells from inducing their deleterious functions. Central tolerance is mediated through negative selection. This process entails the elimination, through clonal deletion of autoreactive T cells, during ontogenic development in the thymus.

Peripheral tolerance is the backup available if central tolerance fails and autoreactive cells escape the thymus. This mechanism of tolerance occurs continuously throughout life, keeping autoreactive cells in check through immune ignorance (anergy), peripheral deletion and/or active suppression.

T regulatory cells (Tregs, formerly also designated "suppressor cells") as part of active suppression maintain peripheral tolerance and regulate autoimmunity (Suri-Payer et al., *J Immunol.* 157: 1799-1805 (1996); Asano et al., *J Exp. Med.* 184:387-396 (1996); Bonomo et al., *J. Immunol.* 154: 6602-6611 (1995); Willerford et al., *Immunity* 3: 521-530 (1995); Takahashi et al., *Int. Immunol.* 10: 1969-1980 (1998); Salomon et al., *Immunity* 12: 431-440 (2000); Read et al., *J Exp. Med.* 192: 295-302 (2000). In general, regulatory T cells inhibit the activation and/or function of T helper type 1 (TH1) and TH2 effector cells. Dysregulation in Treg cell frequency or functioning can lead to debilitating autoimmune diseases (Baecher-Allan et al., *Immunol. Review* 212: 203-216 (2006); Shevach, *Annu. Rev. Immunol.* 18: 423-449 (2000); Salomon et al., *Immunity* 12: 431-440 (2000); Sakaguchi et al., *Immunol. Rev.* 182: 18-32 (2001)).

Several subsets of regulatory T cells have been characterized. The family of Tregs consists of two key subsets: naturally arising e.g. CD4⁺CD25⁺ Tregs and peripherally induced, Tr1 and Th3 Tregs. Furthermore NKTregs and CD8⁺ Tregs have been described in humans and rodents (Fehérvári et al., *J. Clin. Investigation* 114: 1209-1217 (2004)).

Thymus-derived Treg cells (naturally occurring CD4⁺CD25⁺Treg) are the main regulatory cells involved regulating autoimmunity or pathogenic immune responses.

- i) they are CD4⁺ T cells and constitute 5-10% of peripheral CD4⁺ T cells
- ii) they mature in the thymus
- iii) they are generally characterized by the combined expression of the IL-2 receptor (CD25), the low molecular isoform of the CD45 molecule, CD152 (CTLA-4), and the transcription factor FoxP3.

14

The role of Tregs is exemplified best by experiments involving reconstitution of immunodeficient nude mice with $CD4^+$ cells that were depleted of $CD25^+$ cells. $CD4^+CD25^-$ reconstituted nude mice develop various organ-specific autoimmune diseases, such as gastritis, oophoritis, orchitis, and thyroiditis (Suri-Payeret al.; J. Immunol. 160: 1212-1218 (1998)).

Inclusion of the $CD4^+CD25^+$ subset into reconstitution experiments with nude mice prevents the onset of these diseases (Sakaguchi et al., J Immunol. 155: 1151-1164 (1995)). The protective value of $CD4^+CD25^+$ cells against organ-specific autoimmunity has also been shown in several other models of autoimmunity (e.g. autoimmune gastritis, prostatitis, oophoritis, glomerulonephritis, epidymitis and thyroiditis) caused by neonatal thymectomy performed 3 days after birth (d3Tx) or inflammatory bowel disease caused by reconstitution of SCID mice with $CD45RB^{high}$, $CD4^+CD25^-$ T cells. Administration of anti- $CD25$ antibody *in vivo* in mice also induces organ-localised autoimmune disease.

The discovery of the importance of the transcriptional regulator FoxP3 in mouse $CD4^+CD25^+$ T regulatory cell function and the previous observations that patients with IPEX syndrome (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance), a severe inflammatory disease similar to that seen in mice deficient in $CD4^+CD25^+$ regulatory cells (scurfy syndrome), have mutations in *FoxP3*, provided a direct correlation between an autoimmune animal model, mouse regulatory T cells, and a human autoimmune disease (Sakaguchi et al., J Immunol. 155: 1151-1164 (1995)).

The pharmaceutical mechanism of regulatory T cells is not fully clear. $CD4^+CD25^+$ Tregs inhibit polyclonal and antigen-specific T cell activation. The suppression is mediated by a cell contact-dependent mechanism that requires activation of $CD4^+CD25^+$ Tregs via the TCR but Tregs do not show a proliferative response upon TCR activation or stimulation with mitogenic antibodies (anergic) (Shevach, Nature Rev. Immunol 2 : 389 (2002)). Once stimulated, they are competent to suppress in an antigen-independent manner the response of $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells as well as inhibit B-cell activation and their clonal expansion.

15

There are additional data indicating that suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ Tregs partially also relies on anti-inflammatory cytokines like TGF- β (Kingsley et al., J Immunol. 168: 1080 (2002); Nakamura et al., J Exp. Med. 194: 629-644 (2001)). The functional significance of TGF- β secretion is furthermore supported by the findings that TGF- β -deficient mice develop autoimmune disease and that administration of neutralizing antibodies to TGF- β abrogates in vivo the prevention of autoimmunity or tolerance-inducing activity of CD4⁺ T cells in some models.

Within the CD4⁺ T cell subset at least 2 more different types of cells with suppressive function may exist, which are induced after exposure to specific, exogenous antigen (called 'adaptive or inducible regulatory T cells'): Type 1 T regulatory (Tr1) cells and Th3 cells. These cell types appear to be distinguishable from CD4⁺CD25⁺ Tregs based on their cytokine production profiles. However, the relationship between these different types is unclear and the modes of action are overlapping.

Tr1 cells were induced by repetitive stimulation of TCR in the presence of IL-10 and were shown to mainly down-regulate immune responses via the production of high levels of IL-10 together with moderate amounts of TGF- β (Chen et al., J. Immunol. 171: 733-744 (2003)).

Th3 cells (identified in a model of EAE after oral delivery of antigen) produce high amounts of TGF- β and variable amounts of IL-4 and IL-10. IL-4, itself, was shown to be a key factor for the differentiation of Th3 cells, in contrast to Tr1 cells that are differentiated with IL-10 (Chen et al., Science 265:1237-1240 (1994)).

Suppression of T cell function by using immunosuppressive drugs is a principal therapeutic strategy that has been used successfully to treat autoimmune diseases. However these drugs induce a general immunosuppression due to their poor selectivity, resulting in inhibition of not only the harmful functions of the immune system, but also useful ones. As a consequence, several risks like infection, cancer and drug toxicity may occur.

Agents interfering with T cell function are therapeutic mainstays for various autoimmune diseases.

16

The approach of using agents aiming at the activation of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases have been up to now proven to be extremely difficult. Activation of Tregs via the TCR using the agonistic anti-CD3 antibody OKT-3 (Abramowicz et al, N Engl. J Med. 1992 Sep 3;327(10):736) or via the co-stimulatory molecule CD28 using the superagonistic anti-CD28 antibody TGN 1412 leads to complete depletion of the regulatory T cell population as well as other conventional T cells and the systemic induction and release of excessive amounts of pro-inflammatory cytokines including IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-2, resulting in a clinically apparent cytokine release syndrome (CRS) in humans (Suntharalingam et al, N Engl. J Med. 2006 Sep 7;355(10):1018-28).

After the first two to three injections of 5 mg of the monoclonal antibody OKT3 most patients develop a cytokine release syndrome with high levels of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2, and gamma-interferon appearing within 1-2hrs in the circulation of kidney transplant recipients. (Abramowicz et al., Transplantation. 1989 Apr;47(4):606-8). This results in a narrow therapeutic window which limits the usefulness of this antibody in the treatment of autoimmune disease.

Treatment with a total dose of 5-10 mg of TGN1412 (0.1 mg anti-CD28 per kilogram of body weight) lead to a systemic inflammatory response with multiorgan failure within 90 minutes after receiving a single intravenous dose of the TGN 1412 (Suntharalingam et al, N Engl. J Med. 2006 Sep 7;355(10):1018-28).

It is generally agreed that CD4 T cells play a major part in initiating and maintaining autoimmunity. Accordingly, it has been proposed to use mAbs against CD4 T cells surface molecules, and in particular anti-CD4 mAbs, as immunosuppressive agents. Although numerous clinical studies confirmed the potential interest of this approach, they also raised several issues to be addressed in order to make anti-CD4 mAbs more suitable for use in routine clinical practice.

Several different mechanisms of action for CD4 mAbs have been proposed including: (1) antagonism of CD4-MHC II interactions resulting in inhibition of T cell activation, (2) CD4 receptor modulation as determined by a decrease in cell surface expression of CD4, (3)

17

partial signaling through the CD4 receptor in the absence of T cell receptor cross-linking which can suppress subsequent T cell activation and trigger CD4 T cell apoptotic death, (4) Fc-mediated complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) leading to CD4 T cell depletion, and (5) stimulation of regulatory T cells.

Fc-mediated complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) leading to CD4 T cell depletion is the main observed mechanism and is especially demonstrated for antibodies of the IgG1 subclass. Only a few CD4 antibodies have been attributed to the other mechanisms like TRX-1, TNX-355, IDEC-151, OKTcdr4A with only TRX-1 being an IgG1 (Schulze-Koops et al., *J Rheumatol.* 25(11): 2065-76 (1998); Mason et al., *J Rheumatol.* 29(2): 220-9 (2002); Choy et al., *Rheumatology* 39(10): 1139-46 (2000); Herzyk et al., *Infect Immun.* 69(2): 1032-43 (2001); Kon et al., *Eur Respir J.* 18(1): 45-52 (2001); Mourad et al., *Transplantation* 65(5): 632-41 (1998); Skov et al., *Arch Dermatol.* 139(11): 1433-9 (2003); Jabado et al., *J Immunol.* 158(1): 94-103 (1997)).

Dose-dependent depletion of CD4⁺ T cells at "high" doses (multiple cycles with dosages > 100mg) and transient sequestration (short-lived depletion) at "lower" doses (multiple cycles with dosages >10 mg), is observed with several CD4 antibodies (Mason et al., *J. Rheumatol.* 29 (2): 220-229 (2002); Kon et al., *Eur. Respir J.* 18(1):45-52 (2001)) and HuMax-CD4 (Skov et al., *Arch Dermatol.* 139(11): 1433-1439 (2003), Choy et al., *Rheumatology* 41 (10):1142-8 (2002)). Despite of their depletional activity, mAbs to CD4 failed to provide clinical benefit and consistent efficacy in autoimmune diseases investigated e.g. rheumatoid arthritis (Strand et al., *Nature Reviews* 6: 75-92 (2007)). Furthermore depletion of CD4⁺ T cells is generally considered as scenario, which might cause a severe immunosuppression.

The B-F5 antibody (murine IgG1 anti-human CD4) was tested in different autoimmune diseases.

A small number of patients with severe psoriasis have been treated with the murine B-F5 antibody and some positive effects were described (Robinet et al., *Eur J Dermatol* 1996; 6: 141-6, and Robinet et al., *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 582-8).

178

In rheumatoid arthritis patients, the results observed in a placebo controlled trial with a daily dose of B-F5 did not indicate a significant improvement (Wendling et al. J Rheumatol;25(8):1457-61, 1998).

In multiple sclerosis (MS) patients, some positive effects were observed after a 10 days treatment in patients with relapsing-remitting forms, some of who were still relapse-free at the 6th month post-therapy (Racadot et al., J Autoimmun, 6(6):771-86, 1993). Similar effects were observed by Rumbach et al. (Mutt Scler;1(4):207-12, 1996).

In severe Crohn's disease, no significant improvement was observed in patients receiving B-F5 for 7 consecutive days (Canva-Delcambre et al., Aliment Pharmacol Ther 10(5):721-7, 1996).

In prevention of allograft rejection, it was reported that B-F5 bioavailability was not sufficient to allow its use for prophylaxis of allograft rejection (Dantal et al. Transplantation, 27;62(10):1502-6, 1996).

It appears from the above that a first issue to be solved is the need for using high doses of mAb to obtain a clinical improvement. This may result *inter alia* from the poor accessibility of the lymphocytes to the mAb in the target tissues. The use of higher doses may result in an excessive action on blood lymphocytes, inducing unwanted side effects.

Another drawback of therapy with monoclonal antibodies in humans is that these antibodies are generally obtained from mouse cells, and provoke anti-mouse responses in the human recipients. This not only results in a lower efficiency of the treatment and even more of any future treatment with mouse monoclonal antibodies, but also in an increased risk of anaphylaxis.

This drawback can, in principle, be avoided by the use of humanized antibodies, obtained by grafting the complementarity-determining regions (CDRs) of a mouse monoclonal antibody, which determine the antigen-binding specificity, onto the framework regions (FRs) of a human immunoglobulin molecule. The aim of humanization is to obtain a recombinant

antibody having the same antigen-binding properties as the mouse monoclonal antibody from which the CDR sequences were derived, and far less immunogenic in humans.

In some cases, substituting CDRs from the mouse antibody for the human CDRs in human frameworks is sufficient to transfer the antigen-binding properties (including not only the specificity, but also the affinity for antigen). However, in many antibodies, some FR residues are important for antigen binding, because they directly contact the antigen in the antibody-antigen complex, or because they influence the conformation of CDRs and thus their antigen binding performance.

Thus, in most cases it is also necessary to substitute one or several framework residues from the mouse antibody for the human corresponding FR residues. Since the number of substituted residues must be as small as possible in order to prevent anti-mouse reactions, the issue is to determine which amino acid residue(s) are critical for retaining the antigen-binding properties. Various methods have been proposed for predicting the more appropriate sites for substitution. Although they provide general principles that may be of some help in the first steps of humanization, the final result varies from an antibody to another. Thus, for a given antibody, it is very difficult to foretell which substitutions will provide the desired result.

Previously the humanization of mouse B-F5 has been attempted, and success has been achieved in producing humanized B-F5 (hereinafter referred to as hB-F5) having similar CD4 binding properties to the parent mouse B-F5.

Thus, in WO 2004/083247, the humanised antibody BT061 (humanised B-F5, or simply hB-F5) has been found to be useful in treating autoimmune diseases, such as psoriasis and rheumatoid arthritis. This patent application discloses compositions for parenteral administration, formulated to allow the administration of a dose of from 0.1-10 mg, preferably from 1-5 mg. Dosage regimes envisaged are an intravenous 1 mg per day dose and a 5 mg every second day dose for rheumatoid arthritis patients over a period of 10 days. Thus the largest dose disclosed is 5 mg at one time and 25 mg over the course of 10 days.

20

The study was also described by Wijdenes et al., in an abstract and poster presented at the EULAR conference, June 2005. The treatment of 11 patients suffering from rheumatoid arthritis was disclosed. The patients were treated with 5 intravenous infusions of 5 mg BT061 every other day with concomitant treatment with 150 mg Diclophenac.

The antibody described in this study is not disclosed to be suitable for use in higher doses, and it is still desirable to find treatments at higher doses so as to treat a greater number of patients.

Having regard to the above prior art, it is an aim of the present invention to treat patients having autoimmune disease who do not yet respond satisfactorily to existing treatments. In particular, it is an aim of the present invention to find autoimmune treatments that may be applied in high doses to patients, in order to improve treatment response for currently unresponsive patients.

Astonishingly, experiments performed by the inventors revealed that the IgG1 antibody BT061 in contrast to other CD4 mAbs, once bound to CD4 of target cells neither induces ADCC, nor CDC or apoptosis.

Accordingly, the present invention provides a pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 10 mg to 200 mg.

The invention further provides a pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 5 to 60 mg/m².

Still further the invention provides a pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating

21

CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 1 to 500 µg/kg.

In addition, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the agent is present in a concentration of from 10 to 150 mg/ml.

In a preferred aspect of the invention the agent is a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof.

The invention also provides use of an agent as defined herein for the manufacture of a medicament for treating autoimmune disease wherein the agent is to be administered to a subject in a dose as defined herein. Further the invention provides an agent as defined herein for use in the treatment of autoimmune disease wherein the agent is to be administered to a subject in a dose as defined herein.

It will be appreciated from the above dosages that the inventors have found that, surprisingly, the humanised antibody BT061 (humanised B-F5, or simply hB-F5) did not substantially modulate nor induce release of pro-inflammatory cytokines as compared to other T cell interacting antibodies, for example anti-CD3 antibodies. Further, the antibody does not cause substantial long term depletion of CD4+ lymphocytes.

The concentration of the agent of the invention is not especially limited, provided that it is present in a concentration that is high compared to known concentrations. However, preferably, the concentration of the agent is from 10 (or greater than 10) to 150 mg/ml, from 15 to 150 mg/ml, from 15 to 100 mg/ml, from 15 (or greater than 15) to 75 mg/ml, or from 20 to 60 mg/ml. Most preferably, the concentration of the agent is (approximately) any one of 10 mg/ml, 12.5 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml or 100 mg/ml.

The dosage volume applied to a subject using the composition is not especially limited, provided that it delivers a high overall dosage compared to dosages already known, and is

12

therefore suitable for treating individuals who may benefit from high doses such as, but not limited to, severe cases with a long history of the disease and insufficient response to current therapies. In particular, the concentration of the agent within the dosage volumes can be varied in order to provide the required doses, which are described in this application.

The dosage volume will vary depending on the method of administration. Parenteral administration is preferred. Examples of parenteral administration are intramuscular administration, intravenous administration or subcutaneous administration. Where the composition is to be administered by intravenous infusion the dosage volume may be from 0.1 or 0.5 ml up to 500 ml, preferably between 15 and 25 ml, and typically about 20 ml. Where the composition is to be administered by subcutaneous or intramuscular injection, the dosage volume may be between 0.1 to 3 ml, preferably between 0.5 and 1.5 ml, and typically about 1 ml.

However, in some embodiments the composition may be provided in concentrated form and diluted to the strength required for the individuals concerned. Preferably, in these situations the composition is provided in relatively small volumes of about 1, 2, 3, 4, or 5 ml. In alternative embodiments, the composition is provided at the required strength and dosage volume described above (i.e. ready for administration). In one specific embodiment the pharmaceutical compositions for subcutaneous administration are provided in a ready for administration form so that they can be easily administered by non-medical personnel.

As has been mentioned, previously, it was not known that agents capable of treating autoimmune disease could be administered in the high dosages that are envisaged by the present invention. Whilst known doses of agents capable of treating autoimmune disease are effective in some individuals or disease types, the realisation that it may be tolerated in higher doses has opened up the way for more effective treatment of some autoimmune diseases and classes of patients.

The invention will be illustrated by way of example only, with reference to the following Figures, in which:

Figure 1 shows the effect of BT061 on the cytokine synthesis of whole-blood cultures from 3 healthy donors. The cultures were stimulated in separate experiments with 4 different types of activators: CD3=anti-CD3 antibodies; LPS lipopolysaccharide; PHA=phytohaemagglutinin + anti-CD28 antibodies; SEB=staphylococcal enterotoxin B + anti-CD28 antibodies. Different cytokines were determined to measure effects on various leukocyte sub-populations: Treg cells (CD3: TGF- β , IL-10); monocytes/macrophages (LPS: IL-10, TNF α , IL-1 β); Th2 cells (PHA: IL-4, IL-5, IL-13); Th1 cells (SEB: IL-2, IFN γ);

Figure 2 shows the effect of BT061 in human whole-blood cultures (donors with rheumatoid arthritis) on cytokine synthesis triggered by different stimulants;

Figure 3 shows the nucleotide sequence encoding the mouse B-F5 V_H region (SEQ ID No: 5);

Figure 4 shows the nucleotide sequence encoding the mouse B-F5 V_K region (SEQ ID No: 6);

Figure 5 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 3) of a fragment of the plasmid encoding the V_H region of humanized BF-5. The sequence encoding the V region is underlined and the corresponding polypeptide sequence (SEQ ID No: 17) is indicated below the nucleotide sequence;

Figure 6 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 4) of a fragment of the plasmid encoding the V_K regions of humanized BF-5. The sequence encoding the V region is underlined and the corresponding polypeptide sequence (SEQ ID No: 2) is indicated below the nucleotide sequence;

Figures 7A and 7B respectively show the TNF α and IL-6 release observed in a clinical trial with BT061 (single intravenous infusion or subcutaneous injection) in healthy volunteers in comparison to the levels reported with the anti-CD3 monoclonal antibodies. Dose levels and time to recovery are included in the figures. Results for TRX4 indicated in Figures as "2)" reported in Keymeulen et al., 2005 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes patients. Results for Teplizumab indicated in Figures as "3)" reported in Herold et al., 2002 N. Engl. J. Med. Type

24

I Diabetes patients. Normal values indicated in Figures as “4)” reported in Straub et al., 2007, Athr. & Rheumat. “*)” represents a single dose, “***)” represents a cumulative dose injected until peak concentration was reached.

Figure 8 shows IL-2 and IFN- γ plasma levels after administration of a single intravenous or subcutaneous dose of BT061 in healthy volunteers. ULN = upper limit of normal; LLN = lower limit of normal.

Figure 9 shows a kinetic of CD4 cell counts (cells per ml of plasma) in volunteers treated with a single intravenous dose of BT061. Mean values of 3 patients per dose group are shown. Dotted lines indicate the upper limit of normal (ULN) and the lower limit of normal (LLN).

Figure 10 shows a kinetic of CD4 cell counts (cells per ml of plasma) in volunteers treated with a single subcutaneous dose of BT061. Mean values of 3 patients per dose group are shown. Dotted lines indicate the upper limit of normal (ULN) and the lower limit of normal (LLN).

Figure 11 parts A to H provide graphs showing data from the clinical trials with psoriasis patients of dose group I as described in Example 7, in which patients are treated with a 0.5 mg intravenous injection of BT061 or a placebo. Parts A to H of Figure 8 provide graphs of the PASI scores of patients 1 to 8 of dose group I, respectively.

Figure 12 parts A to H provide graphs showing data from the clinical trials with psoriasis patients of dose group II as described in Example 7, in which patients are treated with a 2.5 mg intravenous injection of BT061 or a placebo. Parts A to H of Figure 9 provide graphs of the PASI scores of patients 1 to 8 of dose group II, respectively.

Figure 13 parts A and B provide photographs from the clinical trial with psoriasis patients as described in Example 7. The photographs are of the same patient who was a member of dose group II. The photograph shown in part A was taken prior to treatment. The photograph shown in part B was taken 28 days after treatment.

Figure 14 provides results for the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 8. The figure shows a bar chart of the percentage of patients from the dose groups receiving 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg and 25 mg subcutaneous BT061 achieving at least an ACR20 response. Six patients in each group received the antibody dose while two patients received a placebo.

Figure 15A and 15B provides results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 8. Figure 15A shows a bar chart of the number of tender joints for patients from the dose group receiving 25 mg subcutaneous BT061. Figure 15B shows a bar chart of the number of swollen joints in patients from the same dose group. Six patients in each group received the antibody dose while two received a placebo.

Figure 16A and 16 B provide results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 8. The Figures show the changes of individual parameters (in %) for one responder (Figure 16A) and one non-responder (Figure 16B) from the 25 mg subcutaneous dose group. In the Figures "Pat's GA" and "Phy's GA" refer to the patient's global assessment and physician's global assessment, respectively. The term "PA of pain" refers to the patient's assessment of pain.

Figure 17A and 17B provide further results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 8. The Figures show the number of tender joints in patients from the 1.25 mg subcutaneous dose group (Figure 17A) and from the 6.25 mg subcutaneous dose group (Figure 17B).

Figure 18A and 18B provide further results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 8. The Figures show the number of tender joints in patients from the 50 mg subcutaneous dose group (Figure 18A) and from the 6.25 mg intravenous dose group (Figure 18B).

Figure 19 shows the alignment of the polypeptide sequences of murine B-F5 V_K (SEQ ID No: 8), FK-001 (SEQ ID Nos: 9, 10, 11 and 12), L4L (SEQ ID No: 18), and L4M (SEQ ID No: 2) in the design of the humanised form of B-F5 (i.e. BT061).

Figure 20 shows the alignment of the polypeptide sequences of murine B-F5 V_H (SEQ ID No: 7), M26 (SEQ ID Nos: 13, 14, 15 and 16), H37L (SEQ ID No: 1), and H37V (SEQ ID No: 17) in the design of the humanised form of B-F5.

The invention will now be described in more detail.

The agents that are suitable for use in the present invention are those which are capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells. The agent may be a polypeptide, a protein or an antibody. Where the agent is an antibody it may be a monoclonal antibody. Preferably the antibody is a monoclonal anti-CD4 antibody. The antibody may also preferably be an IgG1 antibody and may be an unmodified IgG1 antibody.

In a preferred aspect of the invention the agent does not cause a substantial increase in the level of pro-inflammatory cytokines in the subject's blood plasma after administration as compared to anti-CD3 antibodies. In particular, the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and/or IL-2 after administration of the agent are not substantially raised compared to plasma levels measured in healthy subjects (see Table A1). Specifically, if the ULN for a specific cytokine given in Table A1 is taken as X then within 96 hours after administration of the agent of the invention there may be less than a 20 fold increase in X. Preferably there may be less than a 10 fold increase in X. More preferably these levels are during the period of 10 minutes after the start of administration to 96 hours after completion of administration.

It is possible that in autoimmune patients, cytokine levels prior to administration of the agent are already higher than those observed in healthy subjects (ULN given in Table A1) e.g. due to a modified activation status of immune cells compared to the activation status of the cells in healthy subjects. In those cases, the concentration for a specific cytokine directly prior to administration of the agent is taken as X and within 96 hours after administration of the agent of the invention there may be less than a 20 fold increase in X. Preferably there may be less than a 10 fold increase in X. More preferably these levels are during the period of 10 minutes after the start of administration to 96 hours after the completion of administration.

28

Cytokine	ULN (pg/mL)
Il-2	19.4
IL-6	4.4
TNF-alpha	2.8
IFN-gamma	3.8

Table A1: Cytokine levels measured in plasma of healthy volunteers. The ULN (upper limit of normal) is calculated based on mean values measured in 39 individual subjects + 2 x standard deviation.

In a further preferred aspect of the invention the agent does not cause a substantial long lasting decrease in the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma. Specifically, within the period of 72 to 96 hours after administration the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma may be above 250 cells/ μ l (or at least 250 cells/ μ l).

Preferably the cytokine and CD4+ lymphocyte effects described above are seen in at least 80% of patients treated.

To prevent negative impact on the immune system, e.g. a decrease in the lymphocyte cell count or induction of cytokine release, it is known in the art to utilise antibodies (especially T cell interacting antibodies) of subclass IgG2, IgG3 or IgG4 because antibodies of the IgG1 subclass display higher Fc receptor interactions. It is also known in the art to modify antibodies (especially T cell interacting antibodies) by Fc mutation, deglycosylation, glycomodification or glycoengineering to reduce Fc receptor interactions.

In the experiments described herein the present inventors have found that the avoidance of antibodies of the IgG1 subclass and modifications are not necessary for the agent of the present invention. In particular, data presented in this patent application indicates that the agent of the present invention does not display substantial and long lasting CD4+ cell depletion or induce substantial cytokine release compared to the anti-CD3 antibodies.

Accordingly, in a preferred aspect of the invention the agent is an unmodified IgG1 antibody, i.e. an antibody which does not include an Fc mutation, and has not been subject to deglycosylation, glycomodification or glycoengineering to reduce Fc receptor interactions, or a fragment or a derivative thereof.

The antibodies which are most suitable for use in the present invention are humanized anti-CD4 antibodies, or fragments or derivatives thereof, which are capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells. Examples of antibodies which are capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells are discussed in Becker *et al.*, (European Journal of Immunology (2007), Vol. 37: pages 1217-1223).

Generally, the antibody used in the invention further comprises a human constant region (Fc). This constant region can be selected among constant domains from any class of immunoglobulins, including IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. Preferred constant regions are selected among constant domains of IgG, in particular IgG1.

The present invention also includes any fragment of the antibody comprising the V regions thereof. This comprises in particular Fab, Fab', F(ab')₂, Fv and scFv fragments.

In a particularly preferred aspect of the present invention the antibody is a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof derived from the mouse monoclonal anti-CD4 antibody B-F5. An example of such an antibody is the BT061 antibody.

BT061 antibody, fragments and derivatives thereof.

The humanized antibody BT061 (hB-F5) is derived from mouse B-F5 mAb, and has V domains defined by the following polypeptide sequences:

- H chain V domain: EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA
PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVY
YCSAS YYRYDVGAWFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 1)
- L chain V domain:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYWYQQ
 KPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWT
 FG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

Derivatives of this antibody are also suitable for use in the present invention. Derivatives include those with V domains defined by polypeptide sequences having at least 80%, preferably at least 90 %, most preferably at least 95% sequence identity with SEQ ID NO: 1 or SEQ ID No: 2.

Particularly preferred antibodies are those which comprise the complementarity-determining regions (CDRs) of the mouse B-F5 mAb, and retain the ability of hB-F5 to activate CD4+CD25+ regulatory T cells. The location of the CDRs within the V_H and V_K domains is show in Figures 19 and 20. Such antibodies can optionally have variations in the sequence of the CDRs that do not substantially affect the specificity and/or affinity of binding.

Generally, the hB-F5 antibody used in the invention further comprises a human constant region (Fc). As indicated above, this constant region can be selected among constant domains from any class of immunoglobulins, including IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. Preferred constant regions are selected among constant domains of IgG, in particular IgG1.

The present invention also includes any fragment of a BT061 antibody comprising the V regions thereof. This comprises in particular Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv and scFv fragments.

A polynucleotide encoding the V domain of the H chain or of the L chain of a BT061 antibody may be fused with a polynucleotide coding for the constant region of a human H or L chain, for the purpose of expressing the complete H and L chains obtained in this way; a sequence coding a signal peptide allowing the secretion of the protein can also be added.

The invention also makes use of expression cassettes wherein a polynucleotide as described above is linked to appropriate control sequences allowing the regulation of its transcription

and translation in a chosen host cell, and recombinant vectors comprising a polynucleotide or an expression cassette of the invention.

These recombinant DNA constructs can be obtained and introduced in host cells by the well-known techniques of recombinant DNA and genetic engineering.

The invention also makes use of a host cell, transformed by a polynucleotide of the invention. Useful host-cells within the framework of the present invention can be prokaryotic or eukaryotic cells. Among suitable eukaryotic cells, one will mention, by way of example, plant cells, cells of yeasts such as *Saccharomyces*, cells of insects such as *Drosophila*, or *Spodoptera*, and mammal cells such as HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

The construction of expression vectors used in the invention, and the transformation of host-cells can be made by the standard techniques of molecular biology.

The BT061 (hB-F5) antibody used in the invention can be obtained by culturing a host cell containing an expression vector comprising a nucleic acid sequence encoding said antibody, under conditions suitable for the expression thereof, and recovering said antibody from the host cell culture.

Construction of humanized B-F5

Design of humanized B-F5 V_H and V_K regions

DNA sequences encoding mouse B-F5 V_H and V_K regions are respectively shown in Figure 3 and Figure 4 and under sequence identifiers SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:6. The human V_H and V_K on which the mouse CDRs are grafted were selected by searching databases for human V_H most like the original mouse B-F5 V_H and V_K. V_H region of a human antibody (M26; Accession Number A36006) had the highest homology with B-F5 V_H. V_K region of another human antibody (FK-001; NAKATANI et al., *Biotechnology*, 7 (1989), 805-810)) had the highest homology with B-F5 V_K.

Two types of V_K differing between them in that the 4th residue was Leucine or Methionine were constructed and designated as L4L and L4M. Two types of V_H differing between them

in that the 37th amino acid residue was Leucine or Valine, were constructed and designated as H37L and H37V. The alignment of the polypeptide sequences of B-F5, FK-001, L4L, and L4M is shown in Figure 19. The alignment of the polypeptide sequences of B-F5, M26, H37L, and H37V is shown in Figure 20. The FR residues previously reported to be important for the packing of CDRs (Chothia et al., Nature 342(1989), 877; Foote et al., J. Mol. Biol., 224(1992), 487) are boxed.

By combining these V_H and V_K, 4 versions of V regions were designed.

Expression of humanized B-F5

The subsequent steps for production of humanized B-F5 were the same as those disclosed in US Patent 5,886,152 for humanized B-B10.

Briefly, expression plasmids for the H chain (V_H humanized region fused to the constant region of a human γ -1 chain (TAKAHASHI et al., Cell, 29 (1982), 671-679)) and the L chain (V_K humanized region fused to the constant region of FK-001 K chain) of humanized B-F5 were constructed separately. In these plasmids, the expression of humanized B-F5 is driven by the promoter/enhancer of the gene of human monoclonal IgM, FK-001. Figure 5 and 6 respectively show the fragments of the plasmids encoding the V_H and V_K regions of humanized BF-5. The sequences encoding the V region are underlined and the corresponding polypeptide sequences are indicated underneath the nucleotide sequence. Both plasmids and pSV2neo were simultaneously introduced into mouse myeloma Sp2/0 (ATCC CRL-1581) using Lipofectinⁿⁱ. Transfectomas producing human IgG were selected by ELISA, using an anti-human IgG (γ chain) antibody and an anti-human Ig K chain antibody.

Characterisation of the different versions of humanized B-F5

Estimation of CD4 binding activity

Culture supernatants of transfectomas producing the four versions of hB-F5 were collected, and concentrated. The different antibodies were purified from culture supernatants by affinity chromatography using protein A Sepharose and assessed for their CD4 binding activity by measuring, by means of competitive ELISA, their inhibitory activities against the binding of

biotinylated mB-F5 to soluble CD4 coated on microtiter plates. Incubation, time is 2 hours for 37°C and overnight for 4°C.

The relative binding activities of hB-F5s (binding activity of mB-F5 was taken as 100%) are shown in Table A below:

Table A

Antibody	Temp (°C)	Relative binding activity (% of mB-F5)
H37L/L4L	4	80
	37	30
H37L/L4M	4	80
	37	30
H37V/L4L	4	10-20
	37	10
H37V/L4M	4	10-20
	37	10

From the results shown in Table A, it appears that the 37th residue of Leucine, is critical to maintain CD4 binding activity of hB-F5 because the CD4 binding activity *is* several-fold reduced by conversion of ³⁷Leu to ³⁷Val. On the contrary, the 4th residue of V_K is found to be not so important for the CD4 binding activity. As the structural difference between ³⁷Leu and ³⁷Val of V_H is not clearly demonstrated by molecular modeling, the superiority of H37L to H37V in CD4 binding activity was unexpected.

H37L/L4L and H37L/L4M were chosen for evaluation.

Investigation of the in vitro biological activities of humanized B-F5

The *in vitro* biological activities of mouse B-F5 and humanized B-F5s (H37L/L4M IgG1 and H37L/L4L IgG 1) were evaluated. Humanized B-F5s of IgG2 type (H37L/L4M IgG2 and H37L/L4L IgG2) were also tested.

The *in vitro* biological activities of mB-F5 and the four types of hB-F5s were evaluated using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. PBMCs were activated by ConA (2.5 pg/ml, 3 days) or PPD (10 pg/ml, 4 days) in the presence of murine or hB-F5s, and were monitored for their proliferative responses by 3H-thymidine incorporation.

Murine and hB-F5s could moderately inhibit ConA-induced proliferation, but the activities varied from antibody to antibody and/or from donor to donor. Also, murine and hB-F5s were able to inhibit Ag-specific PBMC proliferation induced by PPD.

IgG1 type of hB-F5 inhibited PPD-induced proliferation more effectively (as high as 70% inhibition) than mB-F5. IgG1 type seemed to be more effective than IgG2 type of which inhibitory activity was almost the same as mB-F5. For IgG1 type, H37L/L4M was more effective than H37L/L4L. IgG2 type of H37L/L4M and H37L/L4L had almost the same inhibitory activities. In short, the inhibitory activities of B-F5s against PPD-induced PBMC proliferation were as follows: H37L/L4M IgG1 > H37L/L4L IgG1 > H37L/L4M IgG2 = H37L/L4L IgG2 = mB-F5.

Considering the efficacy of the *in vitro* biological activity and the smaller number of mouse amino acids, H37L/L4M IgG1 was chosen for further evaluation, and it is this antibody which is named BT061 and is employed to demonstrate the present invention in the Examples provided in this application.

Composition and uses

As has been mentioned, the pharmaceutical composition and medicaments used in the present invention, are preferably capable of treating an autoimmune disease in patients benefiting from higher doses. Such patients include but are not limited to severe cases with a long history of the disease.

In one aspect the present invention also provides use of a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof in the manufacture of a medicament effective against an autoimmune disease, wherein the humanized antibody is capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, and wherein the medicament comprises the antibody in a concentration of from 10 to 150 mg/ml, preferably 15 to 75 mg/ml, most preferably 20 to 60 mg/ml.

The invention further provides use of a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof in the manufacture of a medicament effective against an autoimmune

disease, wherein the humanized antibody is capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, and wherein the medicament is administered to a subject in a single dose or a plurality of doses in an amount of the antibody of from 10 to 200 mg per dose.

The present invention also provides a pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 10 mg to 100 mg, 10 mg to 80 mg, 15 mg to 80 mg, 20 mg to 75 mg, preferably from more than 20 mg to 60 mg and most preferably from 25 mg to 60 mg.

In one aspect of the invention the subject is to receive a plurality of doses. In these situations it is suitable that the dosage over a period of 10 days is greater than 25 mg but less than or equal to 200 mg, more preferably between 28 mg and 100 mg, and most preferably between 30 mg and 100 mg. Further, the dosage over a period of 5 days are preferably greater than 15 mg but less than or equal to 100 mg, more preferably between 18 mg and 100 mg and most preferably between 20 mg and 100 mg. In this aspect of the invention it is particularly preferred that the dosages are administered subcutaneously.

The dose can also be calculated on the basis of the body surface area (BSA) of the subject. Body surface area (BSA) can be calculated according to any known method. Examples of BSA calculation methods are as follows:

Mosteller formula: $\text{BSA (m}^2\text{)} = ([\text{Height(cm)} \times \text{Weight(kg)}] / 3600)^{1/2}$

(Mosteller RD: Simplified Calculation of Body Surface Area. *N Engl J Med* 1987 Oct 22;317(17):1098)

DuBois and DuBois formula: $\text{BSA (m}^2\text{)} = 0.20247 \times \text{Height(m)}^{0.725} \times \text{Weight(kg)}^{0.425}$

(DuBois D; DuBois EF: A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Int Med* 1916 17:863-71.

Haycock formula: $\text{BSA (m}^2\text{)} = 0.024265 \times \text{Height(cm)}^{0.3964} \times \text{Weight(kg)}^{0.5378}$

(Haycock G.B., Schwartz G.J., Wisotsky D.H. Geometric method for measuring body surface area: A height weight formula validated in infants, children and adults. *The Journal of Pediatrics* 1978 93:1:62-66)

Gehan and George formula: $BSA (m^2) = 0.0235 \times Height(cm)^{0.42246} \times Weight(kg)^{0.51456}$

(Gehan EA, George SL, Estimation of human body surface area from height and weight. *Cancer Chemother Rep* 1970 54:225-35)

Boyd formula: $BSA (m^2) = 0.0003207 \times Height(cm)^{0.3} \times Weight(grams)^{(0.7285 - (0.0188 \times \text{LOG}(grams)))}$

According to the invention the dose of the agent to the subject is from 5 to 60 mg/m² body surface area of the patient, preferably from 6 to 50 mg/m², and most preferably 8 to 40 mg/m².

Further the dose can be calculated based on the body weight of the subject. According to the invention the dose of the agent to the subject is from 0.1 to 2 mg/kg, preferably 0.15 to 1.5 mg/kg, and most preferably 0.2 to 1 mg/kg.

In these aspects of the invention, where the dose is based on the body surface area or the body weight of the subject it is preferred that the doses over a period of 10 days are between 10 mg/m² and 120 mg/m², more preferably between 16 mg/m² and 120 mg/m², or between 0.2 mg/kg and 4 mg/kg, more preferably between 0.4 mg/kg and 4 mg/kg. It is particularly preferred that the dosages are administered subcutaneously.

The frequency of administration is not especially limited, provided that it does not interfere with the effectiveness of the treatment. In the invention, it is preferred that the plurality of doses are administered on at least one of the following bases: daily, every other day, weekly, every 4 weeks, every 6 weeks, every 12 weeks, every 24 weeks, every calendar month, every 3 calendar months, every 6 calendar months, , or yearly. Thus, the doses may be separated by at least one day, or alternatively by at least one week, by at least one month, by at least 3 months, by at least 6 months or by at least one year (meaning that the doses are taken at least

every day, every week, every month, every 6 months, or every year). In a further alternative the plurality of doses are taken from every 1 to 31 days or every 1-12 months.

The length of treatment is not especially limited, and typically in treatment of autoimmune diseases, the treatment proceeds indefinitely, or until symptoms are reduced to a manageable level for the patient. Generally the dose is administered to the subject for at least 1 month.

The invention also provides a kit for a use as defined above, wherein the kit comprises a plurality of medicament dosages as defined above for simultaneous, sequential or separate administration to a subject.

It also provides a method of treatment of an autoimmune disease, which method comprises administering a pharmaceutical composition as defined above to a subject.

Also provided is a method of treatment of an autoimmune disease, which method comprises administering a medicament to a subject, wherein the medicament comprises an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, and wherein the medicament is administered to the subject in an amount as described above.

It is preferred that the agent is a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof derived from the mouse monoclonal anti-CD4 antibody B-F5.

As has been mentioned, the pharmaceutical composition and medicaments used in the present invention, are preferably capable of treating an autoimmune disease in patients benefiting from higher doses. Such patients include but are not limited to severe cases with a long history of the disease.

Preferably the autoimmune disease is selected from psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, type-1 diabetes, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, Hashimoto's thyroiditis, autoimmune thyroiditis, autoimmune myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, ulcerative colitis, atopic dermatitis, myocarditis and transplantation-related

37

diseases such as graft-versus-host or host-versus-graft reactions, or general organ tolerance issues.

In a particularly preferred aspect of the invention the pharmaceutical compositions are for treating the autoimmune disease psoriasis. In particular, such pharmaceutical compositions are to be administered intravenously or subcutaneously in the dosages specified herein.

Psoriasis is a disorder which causes psoriatic lesions or plaques on the sufferer's skin.

The Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score is commonly used to evaluate and record the level of psoriasis exhibited by sufferers. PASI scoring involves the assessment of erythema (E), infiltration (I), and desquamation (D), and body surface area involvement (A) over 4 body regions (head (h), trunk (t), upper (u) and lower (l) extremities). Table B below shows how the scoring system works.

TABLE B – PASI scoring system

Degree of severity (per body region)	Value given	Surface involved (per body region)	Value given
No symptoms	0	< 10%	1
Slight	1	10-29%	2
Moderate	2	30-49%	3
Marked	3	50-69%	4
Very marked	4	70-89%	5
		90-100%	6

Because the head, upper extremities, trunk, and lower extremities correspond to approximately 10, 20, 30, and 40% of body surface area, respectively, the PASI score is calculated by the formula:

$$\text{PASI} = 0.1(E_h + I_h + D_h)A_h + 0.2(E_u + I_u + D_u)A_u + 0.3(E_t + I_t + D_t)A_t + 0.4(E_l + I_l + D_l)A_l$$

PASI score ranges from 0-72. A score of 0 means no psoriasis, while a score of 72 represents the most severe psoriasis.

38

In a preferred embodiment of this aspect the pharmaceutical composition of the present invention is capable of treating psoriasis by providing at least a 40 %, and preferably at least a 50 %, improvement in the PASI score of the patient. Preferably the subject has a PASI score of at least 10 prior to treatment. These effects may be seen at least 56 days after administration, more preferably at least 75 days after administration. In particular, these effects may be seen in at least 80% of patients treated.

In a further aspect of the present invention the pharmaceutical compositions are for treating rheumatoid arthritis.

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease which causes chronic inflammation of joints and surrounding tissues, and can also affect other tissues and body organs.

Improvement in rheumatoid arthritis exhibited by a treated patient is commonly assessed using the American College of Rheumatology (ACR) core set of parameters (Felson et al., Arthritis & Rheumatism, 1995, 38(6), 727-735). This system defines a value of ACR 20 as a 20% improvement in tender and swollen joint counts and 20% improvement in 3 of the 5 remaining ACR core set measures: patient and physician global assessments, pain, disability, and an acute phase reactant, such as C-reactive protein (CRP).

In particular, the pharmaceutical compositions for treating rheumatoid arthritis are preferably to be administered intramuscularly or subcutaneously in the dosages specified herein.

Present treatment of arthritis includes first line drugs for controlling pain and inflammation, classified as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), e.g., aspirin, ibuprofen, naproxen, etc. Secondary treatment of arthritis includes corticosteroids (e.g. prednisone and dexamethasone), slow acting antirheumatic drugs (SAARDs) or disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), e.g., methotrexate, penicillinamine, cyclophosphamide, gold salts, azothioprine, leflunomide, etc.

Corticosteroids, the synthetic versions of the body's cortisone hormone, are used to inhibit RA progression (e.g. prednisone and dexamethasone).

39

Another group of drugs called biological-response modifiers (BRMs) has also been developed for treatment of RA including antagonists to TNF-alpha (adalimumab, infliximab, etanercept) which work through binding to its receptor or directly binding to the TNF-alpha protein.

In one embodiment of this aspect of the invention the compositions are to be administered in combination with drugs currently used to treat rheumatoid arthritis. In particular, the compositions are to be administered with one of the drugs mentioned above, preferably methotrexate.

Known drugs, such as methotrexate, and the pharmaceutical composition of the present invention can be administered simultaneously, sequentially or separately.

The invention will now be described further in relation to the following specific embodiments.

EXAMPLES

EXAMPLE 1 - Investigation of the immuno-modulating capacities of BT061 regarding T cell proliferation.

Method

Whole-blood cultures were performed with freshly drawn peripheral blood. Briefly, using 19G needles blood from three healthy volunteers was collected into heparinised syringes. The blood was seeded into 96-well culture plates not later than 60 min after donation.

The antibody used in the invention (BT061, lot 40588, or lot 70A0013B) was added to the cultures before stimulation of the leukocytes at 5 different concentrations (see "Test substances" below) The cells were allowed to interact with the antibody for 90 min at 37°C, 5 % CO₂ in humidified atmosphere, then four different stimulants were added to separate cultures:

- 40
- (a) anti-CD3 antibodies (R&D Systems; 50 ng/ml)
 - (b) phytohaemagglutinin (PHA, Biochrom KG; 3 μ g/ml) together with anti-CD28 antibodies (Becton-Dickinson; 1 μ g/ml);
 - (c) lipopolysaccharide (LPS, subtype 055:B15 from Sigma Aldrich; 1 μ g/ml);
 - (d) SE-B (Bernhard-Nocht-Institut; 25 ng/ml) together with anti-CD28 antibodies (Becton-Dickinson; 1 μ g/ml).

All whole-blood cultures were incubated for 24 hrs at 37 °C, 5% CO₂ (humidified atmosphere). Then the culture supernatants were collected for the determination the cytokine endpoints, except for PHA/antiCD28 stimulated cultures, which were incubated for 48 hrs in order to obtain a sufficient stimulation of Th2 cells.

The results are set out in Figure 1.

Results

BT061 displayed no significant effect on the major activities of monocytes/macrophages and on Th1 as well as Th2 activities in whole blood cultures from healthy volunteers. There was a concentration-dependent effect on Treg cells (demonstrated as an increase in TGF-beta release).

In particular, the results confirm that there is:

- No modulation of the inflammatory cytokine IL-2 at concentrations of up to 50 μ g/ml corresponding to high dose application of up to 150mg in patients
- No induction of the inflammatory cytokine IFN-gamma at concentrations of up to 50 μ g/ml corresponding to high dose application of up to 150mg in patients
- No modulation of the Th1/Th2 cytokines at concentrations of up to 50 μ g/ml corresponding to high dose application in patients
- Only very sporadic upregulation of IL-6 by a marginal increment, the implications of which are discussed controversial
- Increase in TGF-beta release (Treg cells)
- No significant effect on major regulatory activities of monocytes/macrophages and on Th1 and Th2 activities.

41

EXAMPLE 2 - *Testing of BT061 for its influence on cultivated human PBMCs primed for an anti-tetanus toxoid response and cytokine assay*

Method

Proliferation assay

Freshly isolated PBMC were cultivated in 96 well flat bottom microtiter-plates in a volume of 200 µl/well (4×10^5 cells/well). The test-item (Anti CD4 AK BT061) was used in the concentrations of 20 µg/ml, 4 µg/ml and 0.8 µg/ml (additionally 40 µg/ml within the pre test); Tetanus-Toxoid was used in concentrations of 25 µg/ml, 5 µg/ml and 1 µg/ml. For the negative control cell culture medium was taken. All cultures were set up as triplicates.

For the ConA-stimulation a concentration of 2.5 µg/ml and a volume of 200 µl/well was used. The PBMC was adjusted to a density of 1×10^6 /ml and dispensed in a volume of 100 µl per well.

At the end of the culture period, cell proliferation was detected by adding 0.4 µCi of ^3H -thymidine per well for sixteen hours. At the end of the culture period the cells were detached from the surface using EDTA solution and harvested on glass fibre filters using a scatron cell harvester. The amount of radioactivity incorporated into DNA in each well was measured in a scintillation counter and is proportional to the number of proliferating cells, which in turn is a function of the number of leukocytes that were stimulated to enter the S-phase of the cell cycle. The readout parameter were counts per minute (cpm) and the stimulation index (SI) for each concentration defined as $\text{cpm}_{\text{compound}} / \text{cpm}_{\text{blank}}$.

Cytokine assays

All cytokines were quantified in the culture supernatants using commercial ELISA kits, according to the respective manufacturers instructions. The reagents employed are set out in Table 1 below:

Table 1

substance	source	code	lot
Human IFN- γ OptEIA Set	BD Biosciences	555142	MF31099
Human IL-1 ELISA Set	Bender	BMS243/2MST	n.a.
Human IL-4 OptEIA Set	BD Biosciences	555194	MF10142
Human IL-5 OptEIA Set	BD Biosciences	555202	MF31662
Human IL-6 OptEIA Set	BD Biosciences	555220	MF25815
Human IL-10 OptEIA Set	BD Biosciences	555157	MF24968
Human TGF- β OptEIA Set	BD Biosciences	559119	47704
Human TNF- α OptEIA Set	BD Biosciences	555212	MF31447

* additional material, required for the Interleukin-1 ELISA

Interleukin (IL)-1 levels in culture supernatants were determined using the human IL-1 ELISA Set A (Bender) test kit according to the manufacturers instructions. The range of the test, predetermined by the standard delivered with the kit, was specified at 1.3 to 130 pg/ml for undiluted samples.

IL-4, 5, 6 and 10 levels in culture supernatants as well as transforming growth factor (TGF) β 1 and tumour necrosis factor (TNF) α were determined using the OptEIA (BD biosciences) test kit according to the manufacturers instructions. The range of the tests, predetermined by the standards delivered with the kits was specified at 3.8 to 330 pg/ml for IFN- γ , 6,3 to 616 pg/ml (for IL-4, 5, 10 and TNF), measuring undiluted samples and 7.6 to 660 pg/ml for IL-6 using twofold dilutions of the samples.

Two (for monocyte cultures) or eight (for PBMC cultures) cytokine determinations by ELISA, each from independent micro-cultures were included in the calculation of mean and standard deviation. Titres above the upper range of the test (e.g. 616 pg/ml in the case of TNF) were set to this value for calculation. The lower range of the test was subtracted from each mean value prior calculation.

Results

BT061 (also termed humanised B-F5, or simply hB-F5) is able to suppress dose-dependently the tetanus-toxoid specific T cell proliferation; there has been no effect on the total number of T cells. General suppression of cytokine release has been demonstrated.

Table 2 below shows the influence of the anti CD4 mAb BT061 on a tetanus-toxoid-specific T-cell proliferation assay, measured in triplicates.

Displayed are the means and SD of the ^3H -Tdr-incorporation, measured in triplicates as well as the stimulation index (SI, defined as $\text{cpm}_{\text{compound}} / \text{cpm}_{\text{nil}}$) for each concentration and the level of significance in the unpaired, two sided t-test against the medium control (n.s.: not significant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Table 2

anti CD4 (BT061)	Tetanus Toxoid			
20 µg/ml	25 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	nil
Mean (cpm)	5123	2426	2589	456
SD (cpm)	597	989	1069	363
Mean (SI)	11,23	5,32	5,67	1,00
SD (SI)	10,24	6,40	6,85	1,59
t-test (compound vs. nil)				
p=	0,000	0,032	0,031	
	***	*	*	
4 µg/ml	25 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	nil
Mean (cpm)	6591	5005	2957	358
SD (cpm)	468	518	1333	57
Mean (SI)	18,39	13,97	8,25	1,00
SD (SI)	4,21	3,65	5,02	0,32
t-test (compound vs. nil)				
p=	0,000	0,000	0,028	
	***	***	*	
0,8 µg/ml	25 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	nil
Mean (cpm)	8787	6748	3902	414
SD (cpm)	1886	763	218	12
Mean (SI)	21,24	16,31	9,43	1,00
SD (SI)	5,18	2,32	0,80	0,06
t-test (compound vs. nil)				
p=	0,002	0,000	0,000	
nil	25 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	nil
Mean (cpm)	13783	10244	6970	650
SD (cpm)	1826	758	1351	95
Mean (SI)	21,22	15,77	10,73	1,00
SD (SI)	5,91	3,47	3,65	0,29
t-test (compound vs. nil)				
p=	0,000	0,000	0,001	
	***	***	**	
Viab-ctr	ConA	nil		
Mean (cpm)	94473	404		
SD (cpm)	4200	239		
Mean (SI)	233,94	1,00		
SD (SI)	148,86	1,18		
t-test (compound vs. nil)				
p=	0,000			

Table. 3
This table shows the influence of the anti CD 4 mAb BT061 on the cytokine production of tetanus- toxoid- stimulated PBMC cultures.
Mean and SD of eight individual micro cultures are given.

BT061 Tet. Tox. µg/ml	IL-1 pg/ml	IL-4 pg/ml	IL-5 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-10 pg/ml	IFN pg/ml	γTGF pg/ml	β1 pg/ml	TNF pg/ml	α mean SD
20	25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,8	25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	25	0,1	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6
25	0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

45

Table 4
This table shows the influence of the anti CD4 mAb BT061 on the production of inflammatory cytokines LPS- stimulated monocyte cultures. Mean and SD of two individual micro cultures are given.

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

The data in Tables 2-4 demonstrate the following:

- A dose dependent suppression of tetanus toxoid-induced T cell proliferation (recall response) has been demonstrated even at high doses of BT061, showing that BT061 does not abrogate all immune responses. Doses used apply to a corresponding high dose application of up to 60 mg in patients.
- General suppression of cytokine release (dose-dependent reduction of IFN-gamma, IL-5 and TNF-alpha, with no change in IL-1, IL-4, IL-6, IL-10) and without affecting Th1/Th2 balance.
- An increase in TGF-beta release

EXAMPLE 3 - A flow cytometric test for BT061 (anti CD4 mAb) induced ADCC (Antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity)

HuT 78 target cells were labelled with BT061 (hB-F5) and incubated with PBMC cells as effectors. Dead cells could be detected due to the uptake of the DNA dye propidium iodine after an incubation time of 30 minutes. Results are shown in Table 5.

47

Table 5

Concentration [µg/ml]	Tecelac/ATG) (positive control) mean fluorescence intensity	Negative control mean fluorescence intensity	Specific cell death (ADCC) [%]
75	31,78	11,96	19,82
37,05	25,09	12,70	12,39
18,75	22,25	10,59	11,66
9,38	14,95	10,63	4,32

Concentration [µg/ml]	hB-F5 mean fluorescence intensity	Negative control mean fluorescence intensity	Specific cell death (ADCC) [%]
70,85	10,96	13,41	-2,45
35,43	11,06	14,05	-2,99
17,71	11,68	12,16	-0,48
8,86	10,54	10,23	0,31

The data in the table demonstrate that there was no induction of ADCC by BT061 (hB-F5) even at high concentrations

EXAMPLE 4 – Apoptosis

In a flow cytometric test for BT061 (anti CD4 mAb) induced apoptosis, PBMCs from full blood were incubated with BT061 or the positive control.

After an incubation time of 7 days, the detection of apoptotic cells was performed by staining of apoptotic cells with Annexin-V-Fluoresceine. The results are shown in Table 6.

Table 6

7 d stimulation experiments	Stimulus	
	Positive control (ATG/Tecelac)	BT061
Antibody concentration [µg/ml]	Increase of the ratio of apoptotic cells [%]	
400	0,8	-6,9
200	13,6	-6,4
100	19,5	-0,7
50	17,3	-0,4
25	18,3	-0,5
12,50	8,2	-0,1

The data demonstrate that there was no induction of apoptosis even at high concentrations of BT061.

EXAMPLE 5 - Complement binding

In a flow cytometric test for binding of the complement factor C1qPBMCs have been isolated and incubated with BT061 (*anti CD4 mAb*), followed by an incubation with purified recombinant C1q.

ATG (Tecelac) served as the positive control.

Detection was performed with a FITC labelled detection antibody against C1q. Results are shown in Table 7 below.

Table 7

antibody concentration [µg/ml]	anti CD4 mAb BT061	Positive control
Mean flourescence intensity		
150	199	782
75,0	200	766
37,5	205	732
18,8	217	672
9,4	210	541
4,7	198	491
2,3	199	371
1,2	193	302

The data show that no complement binding can be seen, even at high concentrations.

EXAMPLE 6 – *Safety and tolerability of escalating doses of BT061*

A study was conducted to monitor the safety and tolerability of BT061 using escalating doses of the antibody in healthy male and female volunteers between the ages of ≥ 18 to ≤ 75 years.

Thirty volunteers received BT061 by intravenous administration in 10 dosage groups, with 3 volunteers per group. Further, 15 volunteers received BT061 by subcutaneous administration in 5 dosage groups also with 3 volunteers per group. The administration of BT061 intravenously is illustrated Table 8 below:

50

TABLE 8 – Intravenous dose of BT061

Administration of BT061			
Total dose of BT061 mab	Volume of BT061-12.5 mg	Volume of BT061-25 mg	Volume of BT061-50 mg
3.5 µg	0.28 µl	—	—
20 µg	1.6 µl	—	—
100 µg	8 µl	—	—
500 µg	40 µl	—	—
2.5 mg	0.2 ml	—	—
5 mg	0.4 ml	—	—
10 mg	0.8 ml	—	—
20 mg	—	0.8 ml	—
40 mg	—	—	0.8 ml
60 mg	0.8 ml	—	1 ml

Each dose is diluted with 0.9% sodium chloride injection up to a total volume of 20 ml. The dose is administered as a single continuous intravenous infusion over 2 hours.

The administration of BT061 subcutaneously is illustrated in Table 9 below:

TABLE 9 – Subcutaneous dose of BT061

Administration of BT061			
Total dose of BT061 mab	Volume of BT061-12.5 mg	Volume of BT061-25 mg	Volume of BT061-50 mg
5 mg	0.4 ml	—	—
10 mg	0.8 ml	—	—
20 mg	—	0.8 ml	—
40 mg	—	—	0.8 ml
60 mg	—	—	1 ml + 0.2 ml

Each dose is injected as a single bolus injection.

S1

The volunteers were assessed over a period of 3 months after the injection.

For subcutaneous application plasma samples were taken before administration and at 3, 6, 12, 24, 36, 48, 56, 72, 88, 96, 120, 144 and 168 hours after administration and on day 75.

For intravenous application, plasma samples were taken before administration and at 30 minutes, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours after administration.

The plasma samples were analyzed using standard ELISA methodology to establish cytokine levels. The relevant cytokines analyzed included: IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-2.

The plasma samples were also analyzed using standard methods of flow cytometry to measure the number of CD4+ lymphocytes.

Results

It was found that intravenous and subcutaneous doses up to 60 mg were generally well tolerated.

Cytokine levels

Induction of cytokine release is a common immediate complication occurring with the use of T cell interacting therapeutic antibodies, such as ATG, OKT3, CAMPATH-1H and humanized anti-CD3 mAbs (TRX4, Visilizumab and Teplizumab). The symptoms mainly include moderate fever, headaches and self-limiting gastrointestinal manifestations. Side effects correlated with cytokine induction after antibody administration require the application of additional drugs such as the antihistamine diphenhydramine hydrochloride and/or the anti-inflammatory agent ibuprofen.

With the use of OKT3 (muromonab-CD3), a murine CD3 specific therapeutic monoclonal antibody, there have even been deaths reported, and severe side effects limit the clinical use of this antibody mainly to immunosuppressed patients.

S2

Although humanized FcR-non-binding CD3-specific monoclonal antibodies that are presently used in the clinic for the treatment of autoimmune disease (Teplizumab and TRX4) exhibit reduced side effects induced by T-cell activation and/or by activation of Fc receptor expressing cells after the first dose, as compared with FcR-binding CD3-specific antibodies such as OKT3, some degree of T-cell activation and activation of Fc receptor expressing cells is still observed that leads to cytokine release generally connected to cytokine dependent side effects.

In the present study it was surprisingly found that cytokine induction observed in healthy volunteers after intravenous or subcutaneous application of BT061 was low and transient as compared to anti-CD3 antibodies. Cytokine induction generally increased with increasing dosage. However, even at the highest doses of 40 to 60 mg cytokine induction is much lower than that seen with other T cell interacting monoclonal antibodies (Figure 7A and B).

The median peak concentrations for the cytokines observed at any time point within 96 hours after administration using the highest doses (40 mg to 60 mg of BT061) are shown in Figures 7 and 8.

The median peak concentration for each cytokine is calculated as follows: the median of the highest cytokine concentrations observed after administration of the antibody.

Figure 7A and B show the TNF α and IL-6 release observed in healthy volunteers after intravenous or subcutaneous administration of BT061 in comparison to those released after administration of anti-CD3 monoclonal antibodies, Teplizumab and TRX4. The normal values of these cytokines were taken from Straub et al., (2007, Arthr. & Rheumat.). Figure 8 shows the IL-2 and IFN- γ plasma levels after administration of intravenous or subcutaneous BT061. The median peak levels were calculated from the 40 and 60 mg dose group measured within 4 days after antibody injection. The upper limit of normal (ULN) was calculated based on cytokine levels measured in 39 healthy subjects, where $ULN = \text{mean value} + 2 \times \text{standard deviation}$.

In comparison to Teplizumab and TRX4 (results taken from Herold et al., 2002, New Engl. J. Med, and Keymeulen et al., 2005 New Engl. J. Med, respectively) BT061 induced only marginal and transient cytokine release. TNF- α and IL-6 levels were slightly increased. Figure 7 shows that the median peak values of IL-6 and TNF α cytokine levels detected in plasma after application of BT061 (40 and 60 mg) are lower than those seen after treatment with the CD3 specific therapeutic antibodies Teplizumab and TRX4.

Further, in contrast to the anti-CD3 mAbs, BT061 did not lead to substantially increased levels of IFN- γ and IL-2 (Figure 8) as was reported for the application of TRX4 (Keymeulen et al. 2005).

CD4+ lymphocytes

In addition, the trial also included a study of the numbers of CD4-positive lymphocytes in plasma samples collected.

The results of the intravenous administration are shown below in Tables 9, 10 and 11. Table 12 shows the results of the trial with subcutaneous administration. The results are shown graphically in Figures 9 and 10.

54

TABLE 9 CD4+ cell counts in individual healthy volunteers after 3.5 µg to 2.5 mg intravenous administration of BT061

TIME	DOSE													
	3.5 µg	3.5 µg	3.5 µg	20 µg	20 µg	20 µg	100 µg	100 µg	100 µg	500 µg	500 µg	500 µg	2.5 mg	2.5 mg
Predose	998	878	1025	955	1209	666	1164	800	543	759	493	1240	891	782
3h	1098	746	1020	708	1121	642	452	791	319	777	566	1058	392	461
6h	922	710	1063	746	1091	590	353	627	314	805	381	1115	487	512
12h	898	1183	942	1016	1667	1055	465	1065	477	955	643	1505	669	881
24h	868	825	769	699	1043	517	399	606	347	687	439	1017	521	701
36h	948	1035	1148	861	1549	836	559	1016	485	869	688	1542	976	1207
48h	798	542	834	566	1119	711	384	644	413	730	509	1108	574	815
72h	798	626	766	622	942	575	400	749	503	696	484	969	537	689
96h	469	715	838	583	978	531	475	698	400	800	390	1026	499	785
120h	736	643	843	604	942	472	401	650	511	830	488	1168	501	782
144h	663	593	766	635	1200	510	372	573	432	705	394	953	518	745
168h	753	576	695	616	1012	505	348	646	426	740	475	1073	568	773
day 14	716	615	625	696	867	645	400	771	451	713	600	1398	663	883
day 21	941	378	707	637	971	633	391	805	404	651	533	1241	530	758
day 28	821	569	840	652	863	649	497	775	503	752	445	1109	590	914
day 42	922	442	784	676	1044	700	569	758	455	700	617	1120	770	901
day 56	573	597	828	839	871	553	489	607	441	674	616	1311	634	1017
day 75	1821	512	692	659	1058	553	466	735	459	645	522	1026	731	1032
day 90														
minimum cell count (72 h to day 75)	469	378	625	583	863	472	348	573	400	645	390	953	499	689
Maximum Reduction of CD4+ cells (%)	53.0	56.9	39.0	39.0	28.6	29.1	70.1	28.4	26.3	15.0	20.9	23.1	44.0	11.9

SS

TABLE 10 CD4+ cell counts in individual healthy volunteers after 2.5 mg to 20 mg intravenous administration of BT061

TIME	DOSE							
	2.5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	10 mg	10 mg	10 mg	20 mg
Predose	1080	1116	623	1160	840	835	1281	700
3h	488	313	108	111	104	143	132	63
6h	514	445	164	246	122	82	120	110
12h	699	763	346	573	297	285	366	199
24h	726	617	282	539	470	496	772	351
36h	985	1102	505	721	414	985	1417	677
48h	738	807	390	687	388	794	942	493
72h	711	736	419	700	440	830	919	504
96h	680	791	395	806	516	641	918	538
120h	649	669	438	750	543	674	1002	558
144h	662	723	407	676	448	549	942	579
168h	579	777	309	652	473	525	876	510
day 14	726	692	354	475	357	701	908	484
day 21	601	811	480	514	481	654	978	618
day 28	874	681	339	602	414	755	887	496
day 42	923	843	300	694	507	614	889	639
day 56	847		450	571	551	805	1006	420
day 75	1239		365	627	685	853	1080	537
day 90		721						
minimum cell count (72 h to day 75)	579	669	300	475	357	525	876	420
Maximum Reduction of CD4+ cells (%)	46.9	40.1	51.8	59.1	57.5	37.1	31.6	40.0

In particular, Figure 9 shows the CD4 cell counts (cells per ml plasma) in volunteers treated with the single intravenous dose of BT061. The data points represent the mean values of the 3 patients in each dose group. Dotted lines indicate the upper limit of normal (ULN) and the lower limit of normal (LLN). The ULN and the LLN (mean value + (or -) the standard deviation) were calculated, based on cell counts from healthy volunteers, as 443 CD4 cells per µl (lower limit of normal; LLN) and 1324 CD4 cells per µl (upper limit of normal; ULN).

56

Figure 10 shows the CD4 cell counts (cells per ml plasma) in volunteers treated with the single subcutaneous dose of BT061. As with Figure 9, the data points represent the mean values of the 3 patients in each dose group. Dotted lines indicate the upper limit of normal (ULN) and the lower limit of normal (LLN).

TABLE 11 CD4+ cell counts in individual healthy volunteers after 20 mg to 60 mg intravenous administration of BT061

TIME	DOSE							
	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
Predose	843	1233	1152	789	976	900	989	2539
3h	69	186	72	137	48	63	55	71
6h	83	245	87	147	69	81	78	109
12h	214	469	262	221	212	360	276	182
24h	266	490	208	222	292	315	285	313
36h	562	1019	489	475		707	561	569
48h	359	792	460	455	703	413	500	565
72h	392	909	591	545	625	709	688	806
96h	468	755	567	545	733	717	737	774
120h	391	795	578	517	636	718	685	646
144h	347	897	548	523	760	714	732	606
168h	331	853	630	577	720	656	822	662
day 14	334	899	683	495	675	851	546	423
day 21	396	1077	744	487	711	627	639	867
day 28	579	1030	637	458	582	466	757	1376
day 42	346	847	439	472	619	1179	814	1607
day 56	337	947	556	557	570	686	686	1298
day 75	597	824	986	440	813	648	748	1199
day 90								
minimum cell count (72 h to day 75)	331	755	439	440	570	466	546	423
Maximum Reduction of CD4+ cells (%)	60.7	38.8	61.9	44.2	41.6	48.2	44.8	83.3

Many CD4 specific monoclonal antibodies known in the art (such as those reviewed in Strand et al., 2007) achieve immuno-suppression via CD4-positive lymphocyte depletion. The drawback of these antibodies is that treated individuals become immuno-compromised, and are susceptible to other infections.

In contrast this study showed that BT061 induced no massive long lasting depletion of CD4-positive cells. However, a transient decline of CD4-positive lymphocytes was observed with a recovery to norm values in the peripheral blood within 72 h after administration of the antibody.

At the 72 h time point after application of BT061, CD4 cell counts in four volunteers of the intravenous dose groups showed CD4 levels that were below these norm values as follows: 1 volunteer of the 100 µg intravenous dose: 400 CD4 cells per µl; 1 volunteer of the 5 mg group: 419 CD4 cells per µl; 1 volunteer of the 10 mg group: 440 CD4 cells per µl; and 1 volunteer of the 20 mg group: 392 CD4 cells per µl.

However, these values were only slightly below norm values. CD4 cell counts in the remaining 26 volunteers of the intravenous dose groups were within the norm values 72 hours after administration of BT061.

In the subcutaneous dose groups, after 72 h, only one out of 15 volunteer showed CD4 cell counts below norm values.

In conclusion, in contrast to depleting CD4 specific mAbs, even at high doses BT061 only induced a transient decline of CD4-positive cells followed by a general recovery. From the transient decline and rapid general recovery to norm values it is concluded that a transient redistribution of the CD4-positive cells has taken place, rather than depletion of these cells.

59

EXAMPLE 7 – *Clinical trial of BT061 in patients with moderate to severe chronic psoriasis*

The ability of hB-F5 BT061 to treat an autoimmune disease is being tested on 56 patients suffering from moderate to severe chronic psoriasis. The trial comprises a single dose escalation study to assess the safety and efficacy of hB-F5.

The conditions of the trial are as follows:

The 56 patients are divided into seven dose groups, each group comprising eight individuals. Five dose groups (dose groups I to V) are to receive the antibody or placebo by intravenous administration and two dose groups (dose groups VI and VII) are to receive the antibody or placebo via subcutaneous administration. Two patients in each dose group receive a placebo, while the remaining six patients in each dose group receive a dose of BT061. In dose group I the six patients receive 0.5 mg of intravenous BT061. In dose groups II to V the six patients receive 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, or 20 mg of BT061, respectively. In dose groups VI and VII where the administration is subcutaneous, the six patients receive 12.5 mg or 25 mg of BT061, respectively.

For intravenous administration the antibody/placebo is to be infused in the forearm vein according to medically accepted procedures. In the present case the total volume is administered as a single continuous intravenous infusion over a period of 2 hours via a perfusor (Fresenius Pilot C, Fresenius AG, Germany). Each dose of the antibody is diluted with a 0.9% sodium chloride injection (B. Braun Melsungen AG, Germany) up to a total volume of 20 ml.

For subcutaneous administration the antibody is to be administered as a single subcutaneous injection. The same procedure applies for the placebo.

The level of psoriasis exhibited by each patient is recorded using the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score. As described above higher PASI scores corresponds to a higher level of psoriasis. Patients enrolled onto the trial have a moderate to severe chronic psoriasis, i.e. a PASI score of 10 or above.

60

The patient's PASI score is assessed before the trial to provide a "baseline" value at day 0, and repeatedly during the trial at days 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56 and 75.

Dose Group I

Six patients from dose group I received a single intravenous application of 0.5 mg of BT061, while two patients from dose group I received the placebo. The dose per weight and the dose per body surface area (BSA) for each patient are shown in Table 13. Body surface area was calculated according to the Mosteller formula described herein.

The PASI scores for the patients in dose group I are shown in Table 13 together with the percentage improvement in the PASI score from the baseline.

Dose Group II

Six patients from dose group II received a single intravenous injection of 2.5mg of BT061 while two patients from dose group II received the placebo. The dose per weight and the dose per body surface area (BSA) for each patient is shown in Table 14.

The PASI scores for the patients in dose group II are shown in Table 14 together with the percentage improvement in the PASI score from the baseline.

Dose Group III

Six patients from dose group III received a single intravenous injection of 5.0 mg of BT061 while two patients from dose group III received the placebo. The dose per weight and the dose per body surface area (BSA) for each patient are shown in Table 14B.

The PASI scores for the patients in dose group III are shown in Table 14B together with the percentage improvement in the PASI score from the baseline.

61

Dose Group IV

Six patients from dose group IV are receiving a single intravenous injection of 10.0 mg of BT061 while two patients from dose group IV received the placebo. The dose per weight and the dose per body surface area (BSA) for the patients is shown in Table 14C.

The PASI scores for the patients in dose group IV are shown in Table 14C together with the percentage improvement in the PASI score from the baseline.

62

TABLE 13 – PASI scores for the patients in dose group I (0.5 mg intravenous dose) over the course of the trial

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Rel. Dose [µg/kg]/ [mg/m ²]	5.2 / 0.23	5.9 / 0.25	4.6 / 0.22	5.3 / 0.24	4.8 / 0.22	8.5 / 0.31	4.7 / 0.21	7.0 / 0.28
	PASI Score (relative change / improvement to baseline)							
Baseline	12.2	13.5	12.1	14.0	12.1	12.6	12.1	15.2
Day 5	12.0 (2%)	12.1 (10%)	9.1 (25%)	12.2 (13%)	10.9 (10%)	11.8 (6%)	9.4 (22%)	10.2 (33%)
Day 7	12.0 (0%)	10.7 (21%)	7.7 (36%)	11.6 (17%)	11.2 (7%)	10.7 (15%)	9.3 (23%)	9.0 (41%)
Day 14	11.8 (3%)	9.5 (30%)	5.7 (53%)	9.6 (31%)	8.7 (28%)	10.4 (17%)	7.8 (36%)	7.2 (53%)
Day 21	11.6 (5%)	10.0 (26%)	5.1 (58%)	7.2 (49%)	8.0 (34%)	8.0 (37%)	6.0 (50%)	6.5 (57%)
Day 28	-	10.4 (23%)	4.8 (60%)	8.4 (40%)	8.2 (32%)	6.5 (48%)	6.4 (47%)	6.4 (58%)
Day 42	11.4 (7%)	11.2 (17%)	5.1 (58%)	8.4 (40%)	7.9 (35%)	6.1 (52%)	5.5 (55%)	5.5 (55%)
Day 56	11.4 (7%)	10.1 (25%)	4.2 (65%)	9.2 (34%)	7.9 (35%)	5.7 (55%)	5.3 (56%)	5.3 (56%)
Day 75	11.6 (5%)	7.7 (43%)	5.1 (58%)	9.8 (30%)	9.6 (21%)	5.1 (60%)	5.4 (55%)	7.8 (49%)

TABLE 14A - PASI scores for the patients in dose group II (2.5 mg intravenous dose) over the course of the trial

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Rel. Dose								
[µg/kg]/	27.8 / 1.20	31.6 / 1.30	31.8 / 1.28	23.6 / 1.08	28.4 / 1.19	39.4 / 1.49	26.5 / 1.17	28.4 / 1.19
[mg/m ²]								

PASI Score (relative change / improvement to baseline)								
Baseline	17.1	13.8	10.9	18.6	15.0	12.6	13.9	13.5
Day 5	14.5 (15%)	15.5 (+12%)	6.8 (38%)	17.6 (5)	12.1 (19%)	12.6 (0%)	19.5 (+40%)	15.6 (+16%)
Day 7	12.3 (28%)	13.6 (1%)	5.2 (52%)	19.7 (+6%)	14.0 (7%)	13.0 (+3%)	17.0 (+22%)	14.8 (+10%)
Day 14	10.8 (37%)	15.5 (+12%)	3.9 (64%)	11.1 (40%)	11.8 (21%)	16.6 (+32%)	11.4 (18%)	8.0 (41%)
Day 21	9.7 (43%)	12.2 (12%)	3.9 (64%)	13.7 (26%)	12.4 (17%)	11.4 (10%)	7.9 (43%)	7.1 (47%)
Day 28	8.6 (50%)	9.4 (32%)	1.5 (86%)	7.6 (59%)	12.2 (19%)	12.8 (+2%)	8.2 (41%)	6.5 (52%)
Day 42	8.8 (49%)	8.5 (38%)	1.3 (88%)	10.2 (45%)	12.2 (19%)	11.0 (13%)	7.8 (44%)	9.0 (33%)
Day 56	6.3 (63%)	8.3 (40%)	1.3 (88%)	-	14.2 (5%)	9.7 (23%)	8.2 (41%)	7.8 (42%)
Day 75	6.0 (65%)	5.6 (59%)	1.9 (83%)	9.2 (51%)	14.7 (2%)	10.4 (17%)	10.2 (27%)	8.1 (40%)

TABLE 14B - PASI scores for the patients in dose group III (5.0 mg intravenous dose) over course of trial

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Rel. Dose								
[µg/kg]/	70.4 / 2.73	57.5 / 2.40	43.9 /	59.5 /	52.4 /	56.8 /	71.4 /	66.2 /
[mg/m ²]								

PASI Score (relative change / improvement to baseline)								
Baseline	15.8	14.1	17.4	12.4	17.3	12.4	13.5	10.4
Day 5	13.0 (18%)	27.2 (+93%)	17.7 (+2%)	12.0 (3%)	16.8 (3%)	10.6 (15%)	-	-
Day 7	14.3 (9%)	18.9 (+34%)	15.6 (10%)	11.1 (10%)	17.6 (+2%)	11.4 (8%)	11.0 (19%)	8.2 (21%)
Day 14	13.5 (15%)	30.3 (+115%)	14.0 (20%)	9.3 (25%)	14.4 (17%)	13.0 (+5%)	9.4 (30%)	7.6 (27%)
Day 21	10.1 (36%)	23.1 (+64%)	14.4 (17%)	9.2 (26%)	14.7 (15%)	11.6 (6%)	9.4 (30%)	-
Day 28	9.6 (39%)	23.1 (+64%)	13.4 (23%)	10.2 (18%)	13.8 (20%)	11.2 (10%)	8.3 (39%)	8.6 (17%)
Day 42	9.2 (42%)	20.1 (+43%)	14.4 (17%)	10.2 (18%)	13.2 (24%)	12.6 (+2%)	8.3 (39%)	-
Day 56	10.0 (37%)	20.1 (+43%)	15.8 (9%)	-	13.2 (24%)	10.6 (15%)	9.6 (20%)	-
Day 75	12.8 (19%)	22.5 (+60%)	16.0 (8%)	9.0 (27%)	13.2 (24%)	13.2 (+6%)	13.4 (1%)	9.6 (8%)

64

TABLE 14C - PASI scores for the patients in dose group IV (10.0 mg intravenous dose) over course of trial

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Rel. Dose								
[µg/kg]/	173.0 /	142.9 /	102.8 /	115.6 /	119.6/	108.8/	75.9/	106.6/
[mg/m ²]								

PASI Score (relative change / improvement to baseline)								
Baseline	14.6	11.0	21.6	22.0	19.0	11.6	14.0	12.4
Day 5	12.8 (12%)	11.0 (0%)	21.6 (0%)	16.8 (24%)	18.8 (1%)	11.2 (3%)	14.2 (+1%)	11.4 (8%)
Day 7	12.8 (12%)	11.0 (0%)	21.6 (0%)	16.8 (24%)	18.2 (4%)	11.2 (3%)	14.2 (+1%)	8.4 (32%)
Day 14	11.4 (22%)	11.0 (0%)	21.6 (0%)	18.1 (18%)	16.7 (12%)			
Day 21	11.4 (22%)	11.0 (0%)	22.5 (+4%)	19.0 (14%)	17.3 (9%)			
Day 28	11.4 (22%)	8.9 (19%)	22.0 (7%)	17.7 (20%)				
Day 42	11.0 (25%)	9.4 (15%)	22.6 (+5%)	18.8 (15%)				
Day 56	11.4 (22%)	9.8 (11%)						
Day 75								

Further, the PASI scores against time for individual patients are shown in graph form in Figures 11A to 11H and in Figures 12A to 12H. The graphs shown in Figures 11A to 11H represent PASI scores for patients from dose group I, while the graphs shown in Figures 12A to 12H represent PASI scores for patients from dose group II.

As can be seen from the results shown in Tables 13 and 14, 75% of all the patients from dose group I and dose group II show a clear improvement in their PASI scores, i.e. at least a 40% improvement over the baseline value, after a single dose. It should be noted that 25% of the patients in dose group I and dose group II received a placebo.

In fact, in both dose groups 50% of the patients showed at least 50% improvement in their PASI scores, with one patient in dose group II showing an 88% improvement in the PASI score at day 56, (i.e. patient 3 in Table 14). Furthermore, the therapeutic effect is long-lasting even at these low doses, with the improvements still being seen in many patients at the end of the trial, 75 days after administration.

Patients in dose group III also show an improvement in their PASI score, with six out of eight patients showing a greater than 20% improvement and two of those six showing a greater than 30% improvement after treatment. However, the improvement was not as significant as that seen in patients from dose group I and dose group II which received a lower dose of the antibody. Some efficacy is also seen in the patients of dose group IV. In particular patients 1, 4, 5 and 8 in this dose group (as shown in Table 14C) show a clear improvement in their PASI scores, although this is limited in comparison to the patients of dose groups I to III.

The number of patients showing at least 40%, 50%, 60% and 75% improvement in PASI score is shown in Table 15.

TABLE 15 – Summary of results from Dose Groups I to III

	Dose group I* 0.5 mg BT-061	Dose group II* 2.5 mg BT-061	Dose Group III* 5.0 mg BT061
Improvement $\geq$ 40%	6/8 patients	6/8 patients	1/8 patients
Improvement $\geq$ 50%	4/8 patients	4/8 patients	0/8 patients
Improvement $\geq$ 60%	1/8 patients	2/8 patients	0/8 patients
Improvement $\geq$ 75%	0/8 patients	1/8 patients	0/8 patients

* per dose group: 75% of patients received BT061, 25% of patients received placebo

Figures 13 A and 13 B provide photographic evidence of the improvement in the level of psoriasis before and after treatment. Figure 13 A shows an area of psoriasis on the skin of a patient in dose group II prior to administration. Figure 13 B shows the same area of psoriasis 28 days after administration. The areas of improvement are marked on Figure 13 B with black boxes.

From these results it can clearly be seen that BT061 provides effective treatment of moderate and severe chronic psoriasis.

The results of this study, in combination with those described above in Example 6 which show that high doses of the antibody of the invention are generally well tolerated in humans, demonstrate the ability of the pharmaceutical compositions of the invention to provide effective treatment of autoimmune diseases at the doses described herein.

EXAMPLE 8 - *Clinical trial of BT061 in patients with rheumatoid arthritis*

The ability of BT061 to treat rheumatoid arthritis is being tested on patients suffering from this disease. The trial comprises a multiple dose study involving 96 patients, divided into 12

groups. In each group two patients receive a placebo while 6 patients receive BT061. Patients are dosed once a week over a period of 6 weeks.

Patients are divided into those receiving the antibody subcutaneously and those receiving the antibody intravenously. The subcutaneous dose groups are: 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg and 100 mg. The intravenous dose groups are: 0.5 mg, 2 mg, 6.25 mg, 12.5 mg and 25 mg.

In the 1.25 mg subcutaneous dose group the patients are numbered 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 and 108. In the 6.25 mg subcutaneous dose group the patients are numbered 201-208. In the 12.5 mg subcutaneous dose group the patients are numbered 301-308. In the 25 mg subcutaneous dose group the patients are numbered 401-408. In the 50 mg subcutaneous dose group the patients are numbered 501-508. In the 6.25 mg intravenous dose group the patients are numbered 601-608.

The intravenous and subcutaneous administration procedure was the same as that described in Example 7 for the psoriasis trial.

The level of rheumatoid arthritis is recorded weekly by assessing the ACR parameters and in particular studying the number of tender and swollen joints and following the levels of C-reactive protein (CRP) and the erythrocyte sedimentation rate (ESR). These parameters are assessed before the trial to provide a "baseline" value at day 0, and repeatedly during the trial period and thereafter at 8, 22 and 43 days after the administration period is finished (i.e. follow up (FU) day 8, FU day 22 and FU day 43).

The Tables below provide the data obtained from the trial. Specifically Tables 16 to 21 provide the number of tender and swollen joints over the course of the trial.

Table 16 – Tender and swollen joint counts from the 1.25 mg subcutaneous dose group.

Patients – 1.25 mg SC dose group	Joints (no.)	Visits									
		Screen Visit	Day 1 Week 1	Day 8 Week 2	Day 15 Week 3	Day 22 Week 4	Day 29 Week 5	Day 36 Week 6	Follow-up Day 43 Week 7	Follow-up Day 57 Week 9	Follow-up Day 78 Week 12
101	tender	34	34	32	-	-	-	-	-	-	0
	swollen	10	10	18	-	-	-	-	-	-	0
102	tender	25	26	22	16	16	24	24	30	28	29
	swollen	12	13	9	10	9	15	12	9	18	15
103	tender	11	12	12	9	8	7	7	30	28	3
	swollen	7	8	8	6	6	6	6	9	18	2
104	tender	17	10	4	3	20	17	9	5	5	0
	swollen	8	6	0	0	0	8	2	0	0	0
105	tender	24	23	22	23	35	32	35	32	34	33
	swollen	14	14	14	17	18	18	19	19	20	20
106	tender	20	21	20	13	8	9	13	12	11	11
	swollen	9	12	9	10	5	5	6	5	5	7
107	tender	14	14	11	10	16	14	14	14	11	11
	swollen	8	9	8	8	5	5	5	6	6	6
108	tender	11	12	10	10	7	4	8	8	2	13
	swollen	10	11	7	11	10	9	11	7	6	8

Table 17 - Tender and swollen joint counts from the 6.25 mg subcutaneous dose group.

Patients – 6.25 mg SC dose group	Joints (no.)	Visits									
		Screen Visit	Day 1 Week 1	Day 8 Week 2	Day 15 Week 3	Day 22 Week 4	Day 29 Week 5	Day 36 Week 6	Follow-up Day 43 Week 7	Follow-up Day 57 Week 9	Follow-up Day 78 Week 12
201	tender	16	17	15	14	12	15	13	11	9	9
	swollen	9	10	7	6	6	5	6	5	6	6
202	tender	14	10	10	10	8	8	8	8	9	13
	swollen	10	8	6	6	4	4	4	4	4	6
203	tender	15	14	10	8	10	10	8	7	5	5
	swollen	11	11	10	9	9	10	7	7	6	7
204	tender	19	22	16	0	0	10	2	10	11	0
	swollen	10	10	5	0	0	4	0	0	10	0
205	tender	21	21	0	0	14	30	10	37	-	12
	swollen	9	9	0	0	14	16	6	25	-	8
206	tender	16	16	15	13	13	17	19	-	-	5
	swollen	10	12	12	10	14	11	11	-	-	4
207	tender	17	28	28	11	9	15	17	14	18	22
	swollen	11	12	13	7	10	11	8	10	11	10
208	tender	13	12	9	8	9	11	10	-	-	12
	swollen	10	10	9	9	10	10	9	-	-	8

Table 18 – Tender and swollen joint counts from the 12.5 mg subcutaneous dose group.

Patients – 12.5 mg SC dose group	Joints (no.)	Visits									
		Screen Visit	Day 1 Week 1	Day 8 Week 2	Day 15 Week 3	Day 22 Week 4	Day 29 Week 5	Day 36 Week 6	Follow-up Day 43 Week 7	Follow-up Day 57 Week 9	Follow-up Day 78 Week 12
301	tender	18	18	16	16	16	16	16	20	14	14
	swollen	8	8	8	8	8	8	8	6	6	6
302	tender	36	36	34	35	31	-	-	-	-	30
	swollen	20	20	19	19	17	-	-	-	-	18
303	tender	20	19	19	16	15	14	16	18	-	19
	swollen	10	11	12	13	13	14	13	14	-	14
304	tender	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8
	swollen	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4
305	tender	16	16	14	14	13	13	13	12	10	10
	swollen	8	8	8	8	6	6	6	6	4	4
306	tender	27	27	18	18	12	23	28	-	-	29
	swollen	14	14	20	11	16	13	17	-	-	24
307	tender	25	23	23	17	17	17	17	15	13	11
	swollen	8	8	8	8	8	8	8	6	6	4
308	tender	20	20	18	8	8	8	8	8	8	4
	swollen	12	12	8	6	6	5	6	6	6	4

Table 19 - Tender and swollen joint counts from the 25 mg subcutaneous dose group.

Patients - 25 mg SC dose group	Joints (no.)	Visits									
		Screen Visit	Day 1 Week 1	Day 8 Week 2	Day 15 Week 3	Day 22 Week 4	Day 29 Week 5	Day 36 Week 6	Follow-up Day 43 Week 7	Follow-up Day 57 Week 9	Follow-up Day 78 Week 12
401	tender	16	17	19	22	13	13	12	11	9	6
	swollen	10	11	8	9	12	11	8	5	8	5
402	tender	23	21	10	10	10	9	8	7	6	7
	swollen	8	11	5	6	6	5	4	3	3	3
403	tender	10	10	10	8	8	10	10	7	6	8
	swollen	8	8	8	6	5	5	5	5	5	5
404	tender	17	16	15	15	13	14	14	16		
	swollen	9	11	10	6	7	7	7	7		
405	tender	10	10	8	8	8	8	8	10	-	10
	swollen	6	6	4	4	4	4	4	6	-	6
406	tender	11	11	11	11	11	12	8	8	6	8
	swollen	6	6	6	6	5	5	3	3	2	4
407	tender	13	20	16	18	4	2	0	4	14	
	swollen	7	10	6	8	0	0	0	0	8	
408	tender	11	11	8	8	7	5	4	4	-	8
	swollen	9	9	5	5	4	6	6	3	-	6

72

Figure 14 shows the percentage of patients from the dose groups receiving 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg and 25 mg subcutaneous BT061 achieving at least a 20% improvement of relevant ACR parameters over the course of the trial, and the percentage of patients achieving at least an ACR20 response at week 7.

In particular, it can be seen that 50% of patients in the 25 mg subcutaneous dose group (i.e. 4 out of the 8 patients where 2 of the patients are receiving a placebo) achieved at least a 20% improvement of relevant ACR parameters at week 6. This figures increased to 5 out of the 8 patients at week 7, i.e. 5 out of the 8 patients achieved at least ACR20. One patient in this dose group achieved a more than 50% improvement of relevant ACR parameters at weeks 5 and 6 (full set of data not shown).

Positive results were also obtained by patients in other dose groups. One patients in the 6.25 mg subcutaneous dose group achieved at least a 50% improvement of relevant ACR parameters at week 4 while another achieved at least a 70% improvement of relevant ACR parameters at week 3 (full set of data not shown).

Figure 15 A and 15 B show results for the number of tender and swollen joints exhibited by patients from the 25 mg subcutaneous BT061 dose group over a six week period. Several patients exhibit a reduction in the number of tender and swollen joints over a period of the treatment. The results for one responder patient and one non-responder patient from this dose group are shown in Figures 16A and 16B, respectively. The responder shows a significant improvement in the number of tender and swollen joints and in pain levels.

A reduction in the numbers of tender and swollen joints is also seen in patients from the other dose groups. Figures 17A, 17B, 18A and 18B show the number of tender joints in the 1.25 mg subcutaneous, 6.25 mg subcutaneous, 50 mg subcutaneous and 6.25 mg intravenous dose groups respectively, over the course of the trial and in the weeks thereafter.

These results demonstrate the efficacy of the agent of the present invention in the treatment of rheumatoid arthritis within the dose ranges described herein.

73

CLAIMS:

1. A pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 10 mg to 200 mg.
2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is to be administered to a subject in a dose of the agent from 15 mg to 80 mg.
3. A pharmaceutical composition according to claim 2 wherein the agent is to be administered to a subject in a dose of the agent from 20 mg to 60 mg.
4. A pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 5 to 60 mg/m² body surface area of the subject.
5. A pharmaceutical composition according to claim 4 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 6 to 50 mg/m².
6. A pharmaceutical composition according to claim 5 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 8 to 40 mg/m².
7. A pharmaceutical composition for treating an autoimmune disease comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 0.1 to 2 mg/kg.
8. A pharmaceutical composition according to claim 7 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 0.15 to 1.5 mg/kg.

9. A pharmaceutical composition according to claim 8 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 0.2 to 1 mg/kg.
10. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the autoimmune disease is selected from psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, type-1 diabetes, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, autoimmune thyroiditis, autoimmune myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus and transplantation-related diseases such as graft-versus-host or general organ tolerance issues.
11. A pharmaceutical composition according to claim 10 wherein the disease is psoriasis.
12. A pharmaceutical composition according to claim 11 wherein the composition is capable of treating psoriasis by providing at least a 40% improvement in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score of the patient.
13. A pharmaceutical composition according to claim 12 wherein the composition is capable of treating psoriasis by providing at least a 50% improvement in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score of the patient.
14. A pharmaceutical composition according to claim 10 wherein the disease is rheumatoid arthritis.
15. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the composition is for parenteral administration.
16. A pharmaceutical composition according to claim 15, wherein the composition is for intramuscular administration, intravenous administration or subcutaneous administration.
17. A pharmaceutical composition according to claim 19 wherein the composition is for intravenous administration and is provided in a dosage volume of 0.5 to 500 ml or in a form for dilution to the dosage volume of 0.5 to 500 ml.

18. A pharmaceutical composition according to claim 17 wherein the dosage volume is 15 to 25 ml.
19. A pharmaceutical composition according to claim 16 wherein the composition is for subcutaneous administration and is provided in a dosage volume of 0.1 to 3 ml.
20. A pharmaceutical composition according to claim 19 wherein the dosage volume is 0.5 to 1.5ml.
21. A pharmaceutical composition according to claim 16 wherein the composition is for intramuscular administration and is provided in a dosage volume of 0.1 to 3 ml.
22. A pharmaceutical composition according to claim 21 wherein the dosage volume is 0.5 to 1.5 ml.
23. A pharmaceutical composition according to any preceding claim which is for use as a single dose or as part of a plurality of doses.
24. A pharmaceutical composition according to claim 21 wherein the composition is part of a plurality of doses and each dose is to be administered daily, every two days, weekly, every two weeks, every four weeks, every eight weeks, every twelve weeks, every twenty-four weeks, every forty-eight weeks, every six months, or every year.
25. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the autoimmune disease is psoriasis and the dose is to be administered once every two weeks.
26. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the autoimmune disease is psoriasis and the dose is to be administered once every four weeks.
27. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis and the dose is to be administered once every two weeks.

28. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis and the dose is to be administered once every four weeks.
29. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, wherein the agent is present in a concentration of from 10 to 150 mg/ml.
30. A pharmaceutical composition according to claim 29 wherein the agent is present in a concentration of 15 to 75 mg/ml.
31. A pharmaceutical composition according to claim 30 wherein the agent is present in a concentration of 20 to 60 mg/ml.
32. A pharmaceutical composition according to any one of claims 29 to 31 wherein the volume of the composition is from 0.5 to 500 ml.
33. A pharmaceutical composition according to claim 32 wherein the volume of the composition is from 15 to 25 ml.
34. A pharmaceutical composition according to any one of claims 29 to 31 wherein the volume of the composition is 0.5 to 3 ml.
35. A pharmaceutical composition according to claim 34 wherein the volume of the composition is 1 to 1.5 ml.
36. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein within the period of 10 min after the beginning of administration to 96 hours after completion of the administration the level of a cytokine in the subject's blood plasma is less than a 20 fold increase of the level immediately prior to administration, and wherein the cytokine is selected from IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-2.

37. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 35 wherein within the period of 10 min after the beginning of administration to 96 hours after completion of the administration the level of a cytokine in the subject's blood plasma is less than a 20 fold increase of the upper limit of normal (ULN) value, wherein the cytokine is selected from IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-2, and wherein the ULN value is 3.8, 2.8, 4.4, and 19.4 pg/ml respectively.
38. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein within the period of 72 to 96 hours after administration the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma is at least 200 cells/ μ l.
39. A pharmaceutical composition according to claim 38 wherein the cell count is at least 250 cells/ μ l.
40. A pharmaceutical composition according to claim 38 or 39 wherein the agent is administered subcutaneously and the dose of the agent is up to 39.5 mg.
41. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 37 wherein the agent is administered subcutaneously and the dose of the agent is up to 39.5 mg, and wherein during the period from 0 to 72 hours after administration the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma is at least 300 cells/ μ l.
42. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 37 wherein during the period from 72 hours to 30 days after administration the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma is at least 300 cells/ μ l.
43. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the agent is a humanized monoclonal antibody or fragment or derivative thereof.
44. A pharmaceutical composition according to claim 43 wherein the agent is an anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof.

45. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the agent is a humanized anti-CD4 antibody, or fragment or derivative thereof having V domains defined by the following polypeptide sequences:

- H chain V domain:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSEN
YGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFA
YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 1)

- L chain V domain:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYQKPGQPPKLLIYLASILE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 2).

or V domains comprising polypeptide sequences having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2.

46. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the agent is a humanized anti-CD4 antibody derived from the mouse monoclonal anti-CD4 antibody B-F5.

47. A method of treatment of an autoimmune disease, which method comprises administering a pharmaceutical composition to a subject, wherein the composition comprises an agent capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, and wherein the agent is administered to the subject in a dose as defined in any one of claims 1 to 9.

48. A method of treatment according to claim 47 wherein the autoimmune disease is as defined in claims 10, claim 11 or claim 14.

49. A method of treatment according to claim 47 or claim 48 wherein the agent is a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof derived from the mouse monoclonal anti-CD4 antibody B-F5.

50. A method of treatment according to claim 47 or claim 48 wherein the agent is a humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof having V domains defined by the following peptide sequences:

- H chain V domain:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSEN
YGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYQLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFA
YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 1)

- L chain V domain:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 2).

or V domains comprising polypeptide sequences having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2.

51. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the autoimmune disease is psoriasis and the dose is to be administered once every week.

52. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis and the dose is to be administered once every week.

53. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein within the period of 3 to 6 hours after administration the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma is below 250 cells/ μ l.

54. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 53 wherein within the period of 72 to 96 hours after administration the cell count of CD4+ lymphocytes in the subject's blood plasma is equal or higher than 50% of the cell count of the subject immediately prior to administration.

55. A pharmaceutical composition according to claim 12 or claim 13 wherein the improvement is seen at 56 days after administration of a single dose of the composition.

80

56. A pharmaceutical composition according to claim 12 or claim 13 wherein the improvement is seen at 75 days after administration of a single dose of the composition.

81

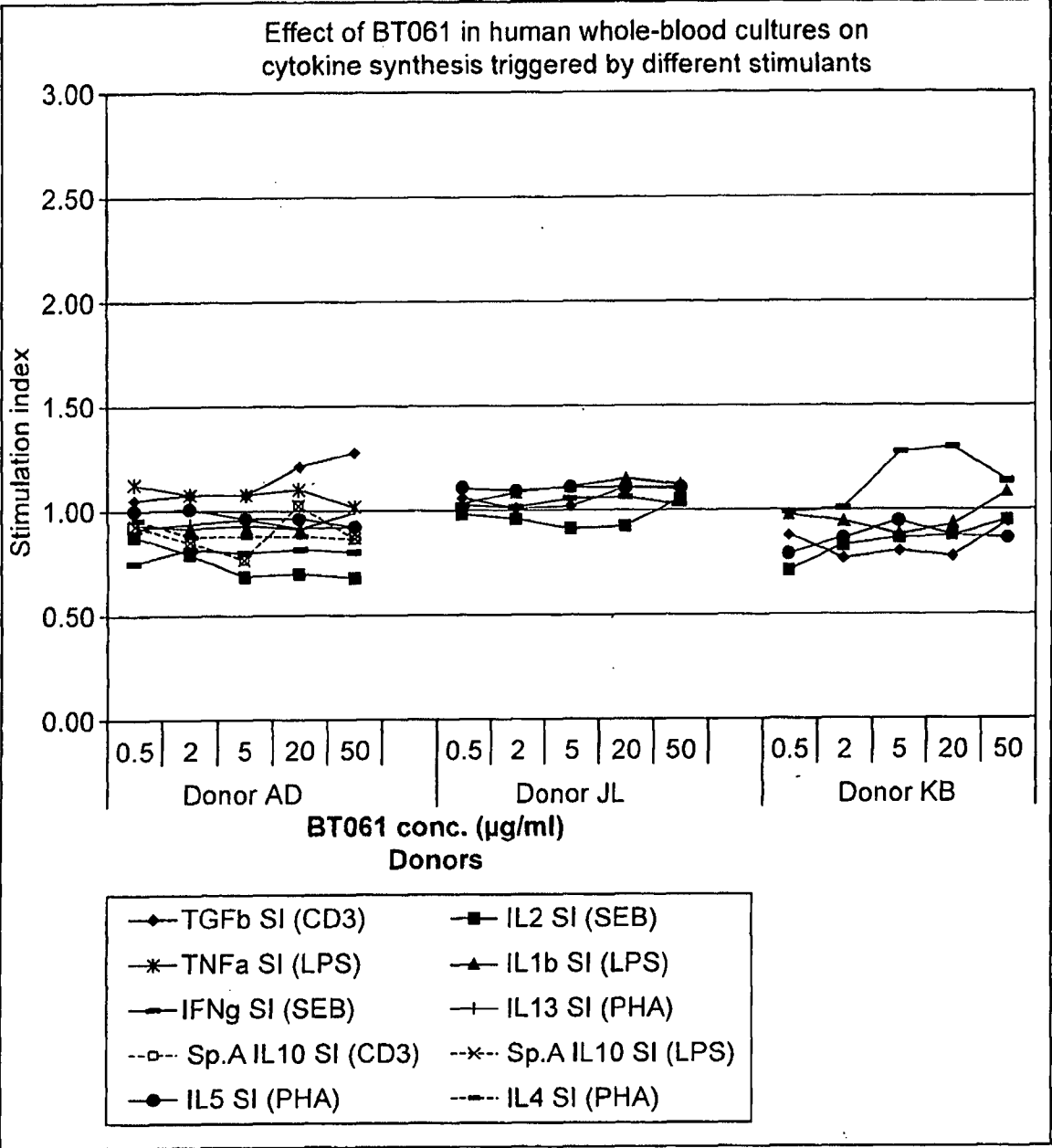


FIG. 1

82

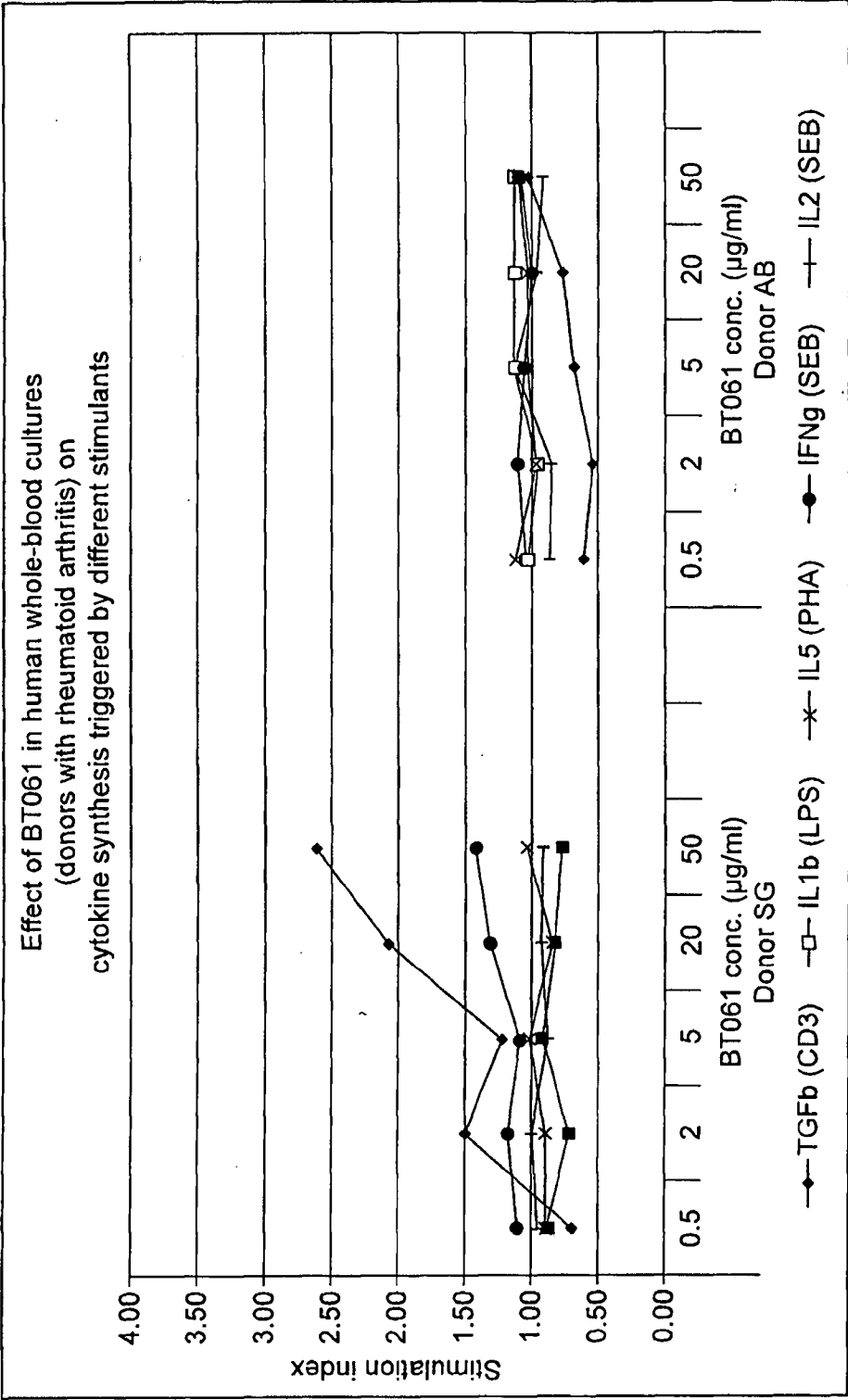


FIG. 2

83

mB-F5 V_H

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

FIGURE 3

84

mB-F5 V_k

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

FIGURE 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGURE 5

86

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

FIGURE 6

87



FIG. 7B

88

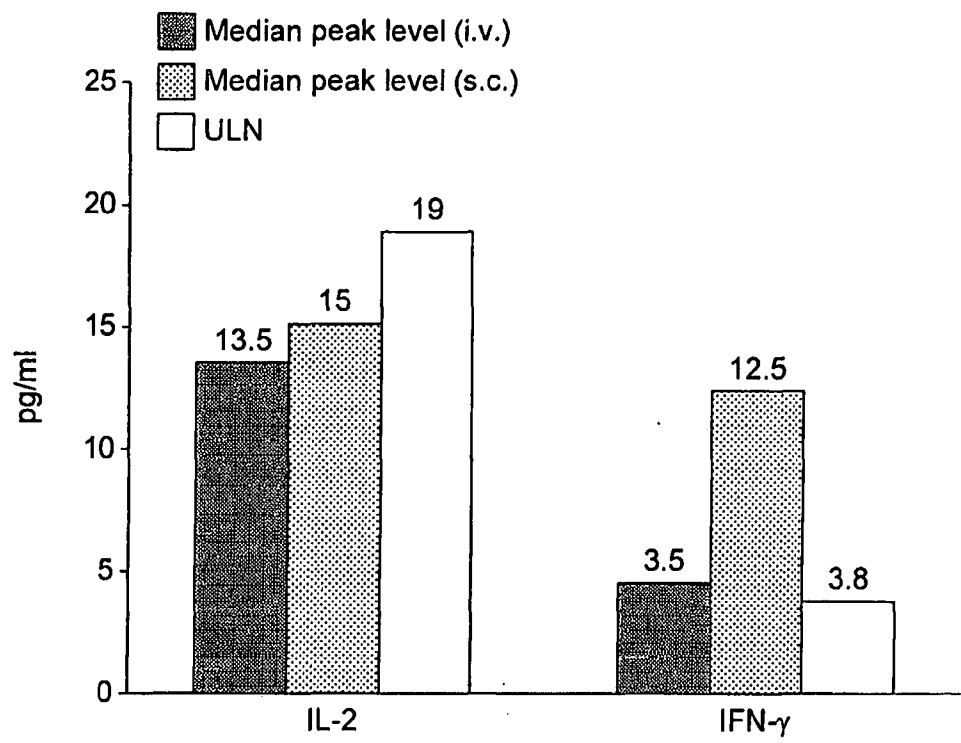


FIGURE 8

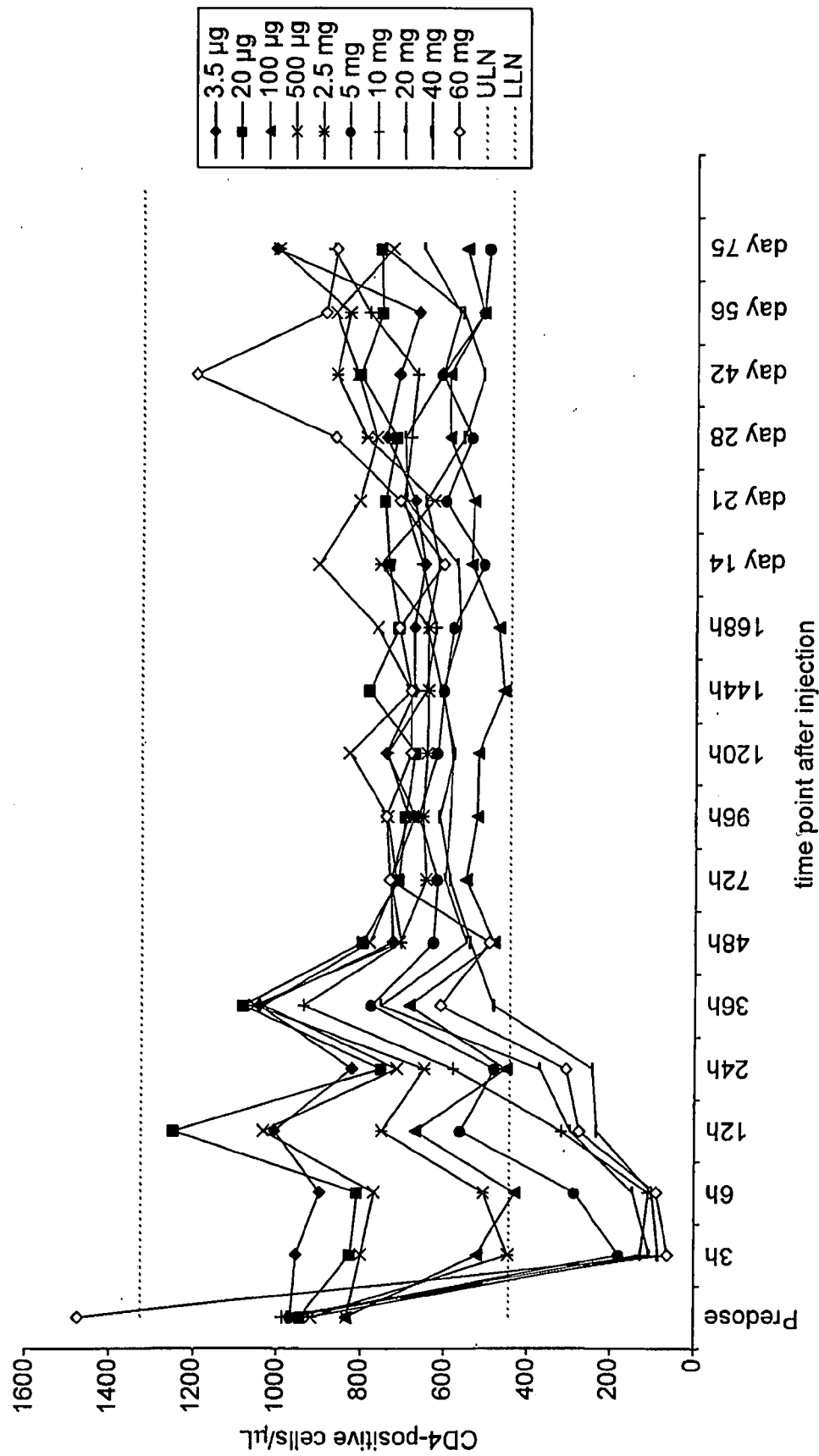


FIGURE 9

90

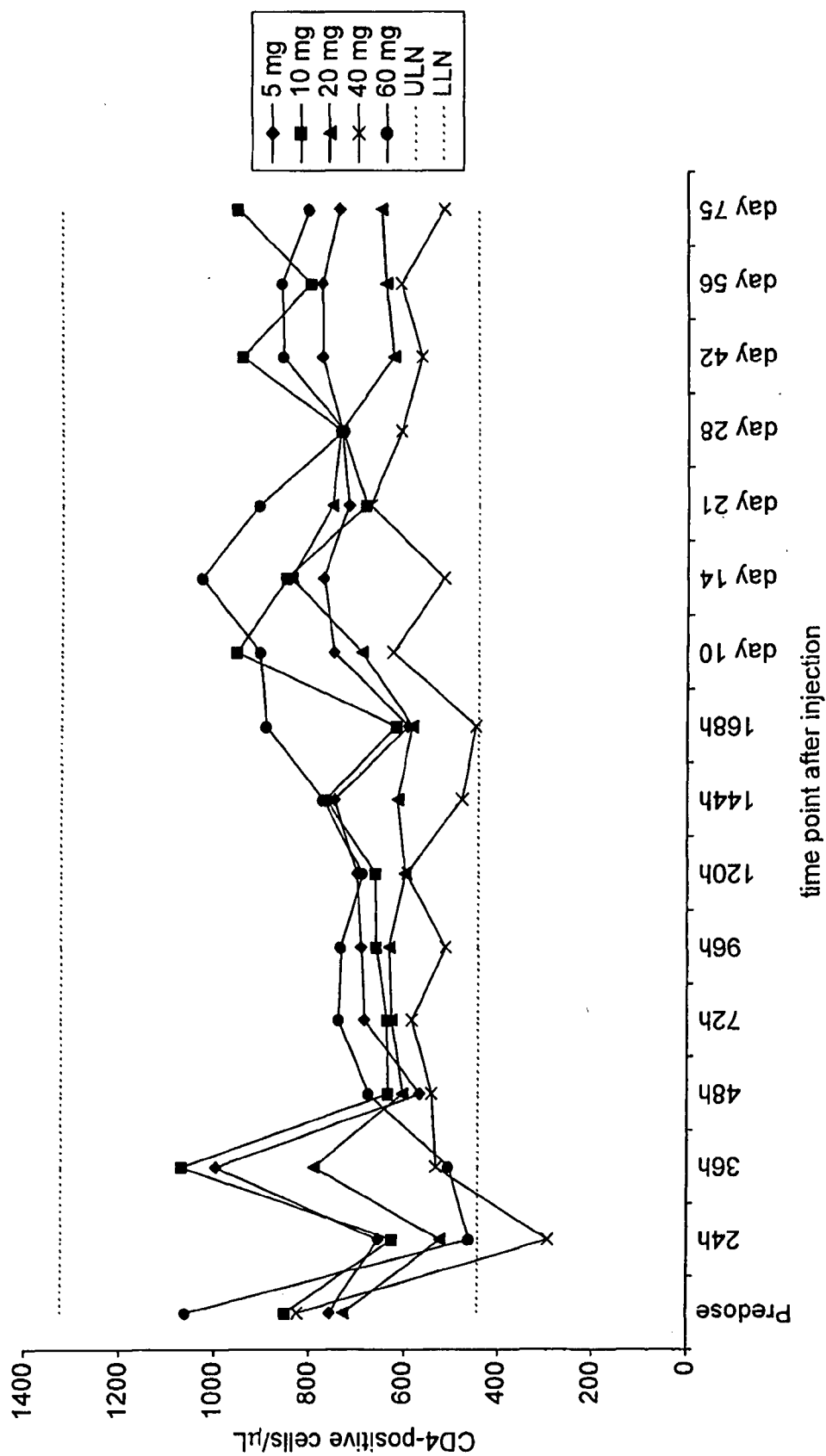


FIGURE 10

91

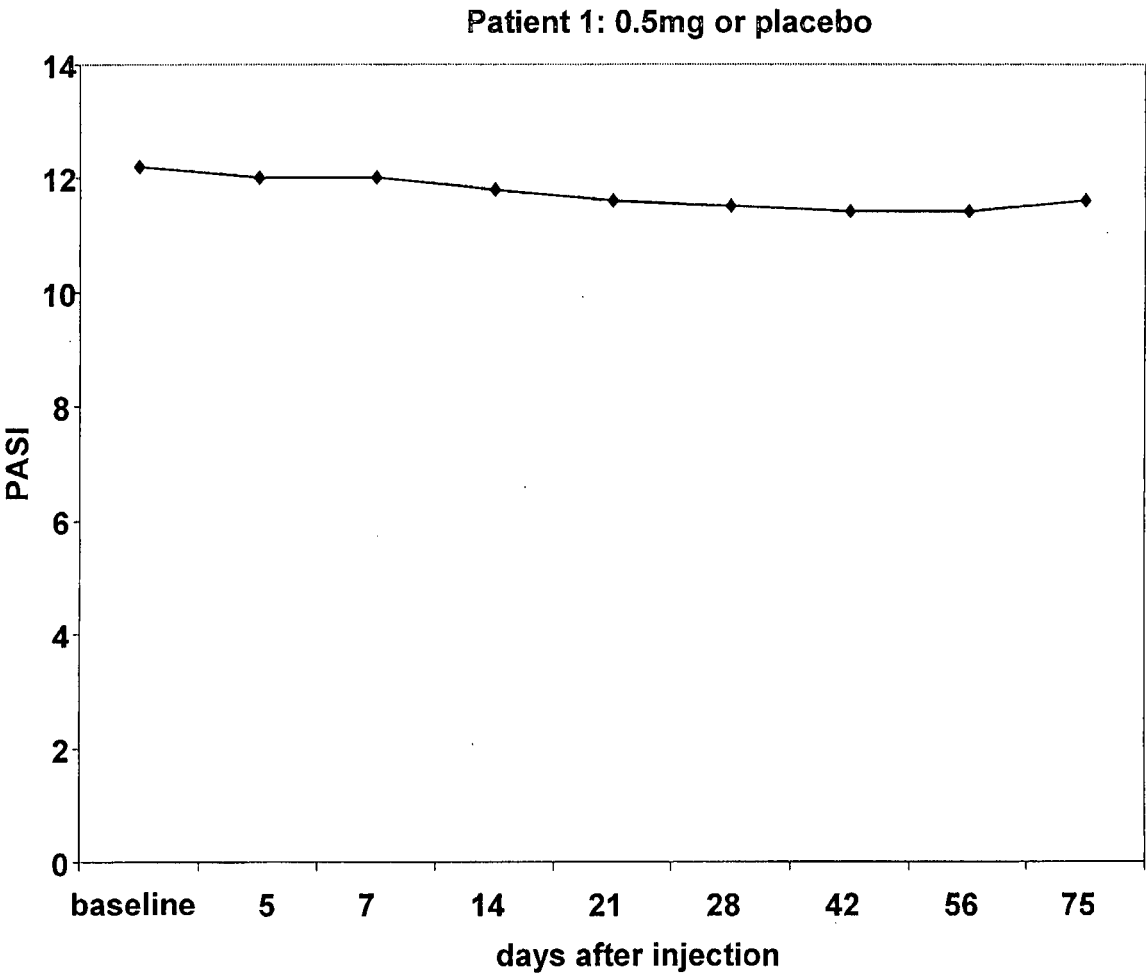


FIGURE 11 A

92

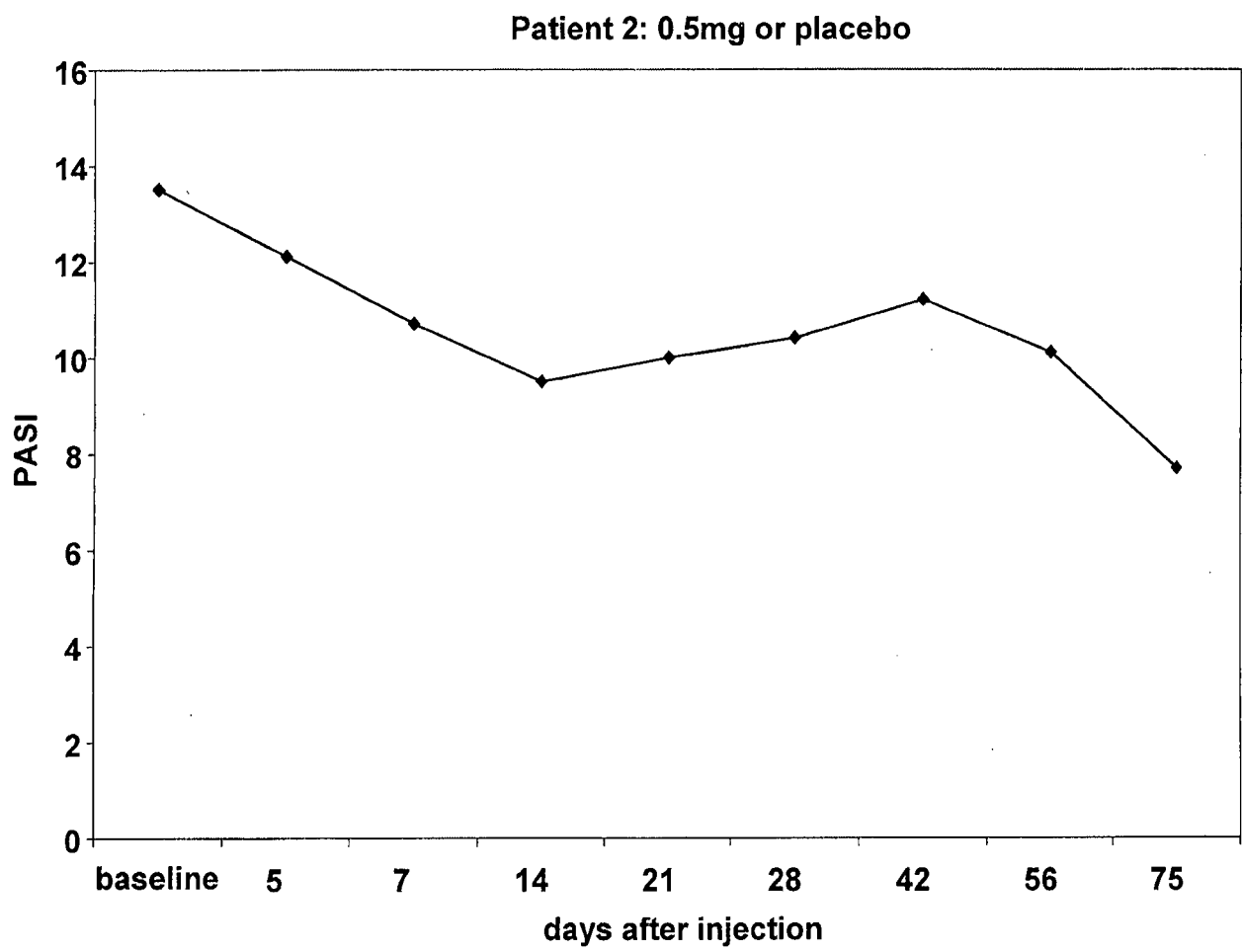


FIGURE 11 B

93

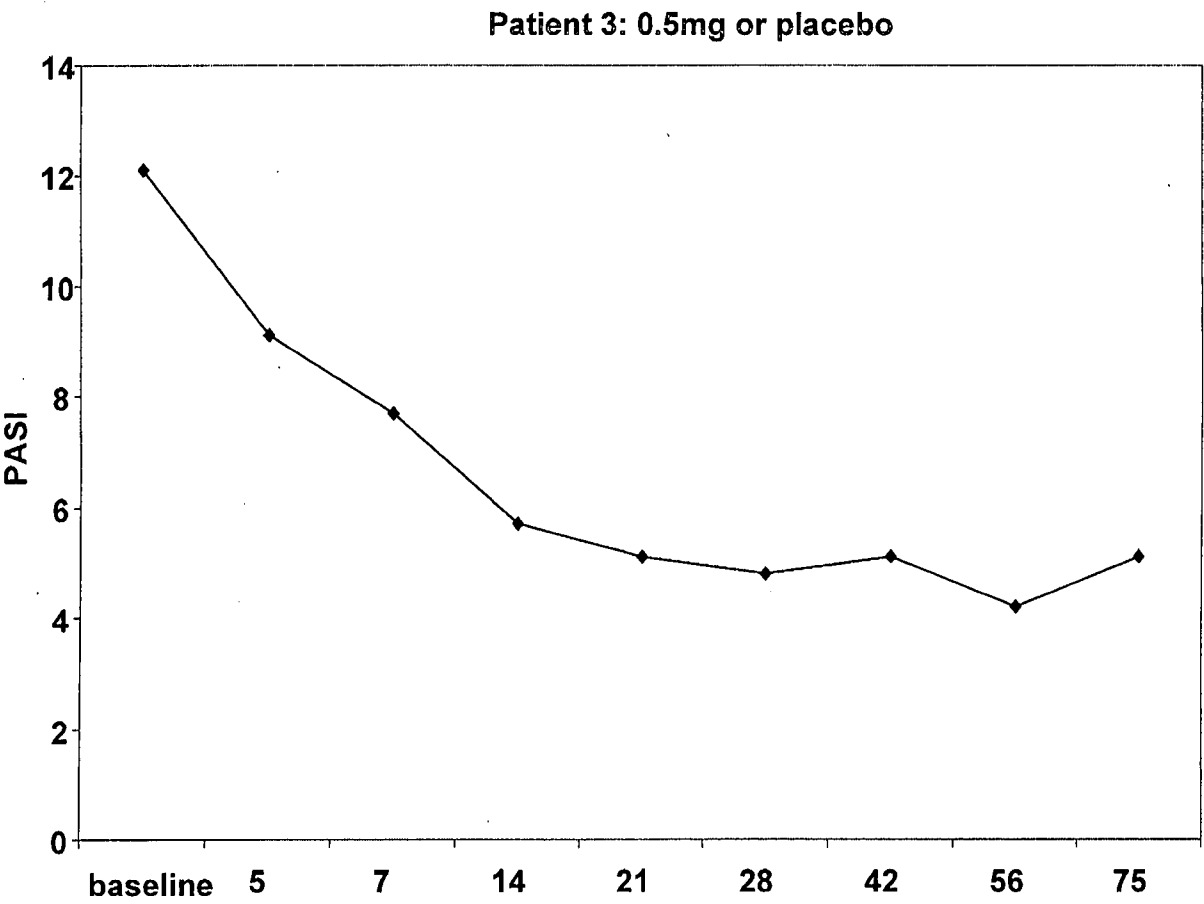


FIGURE 11 C

94

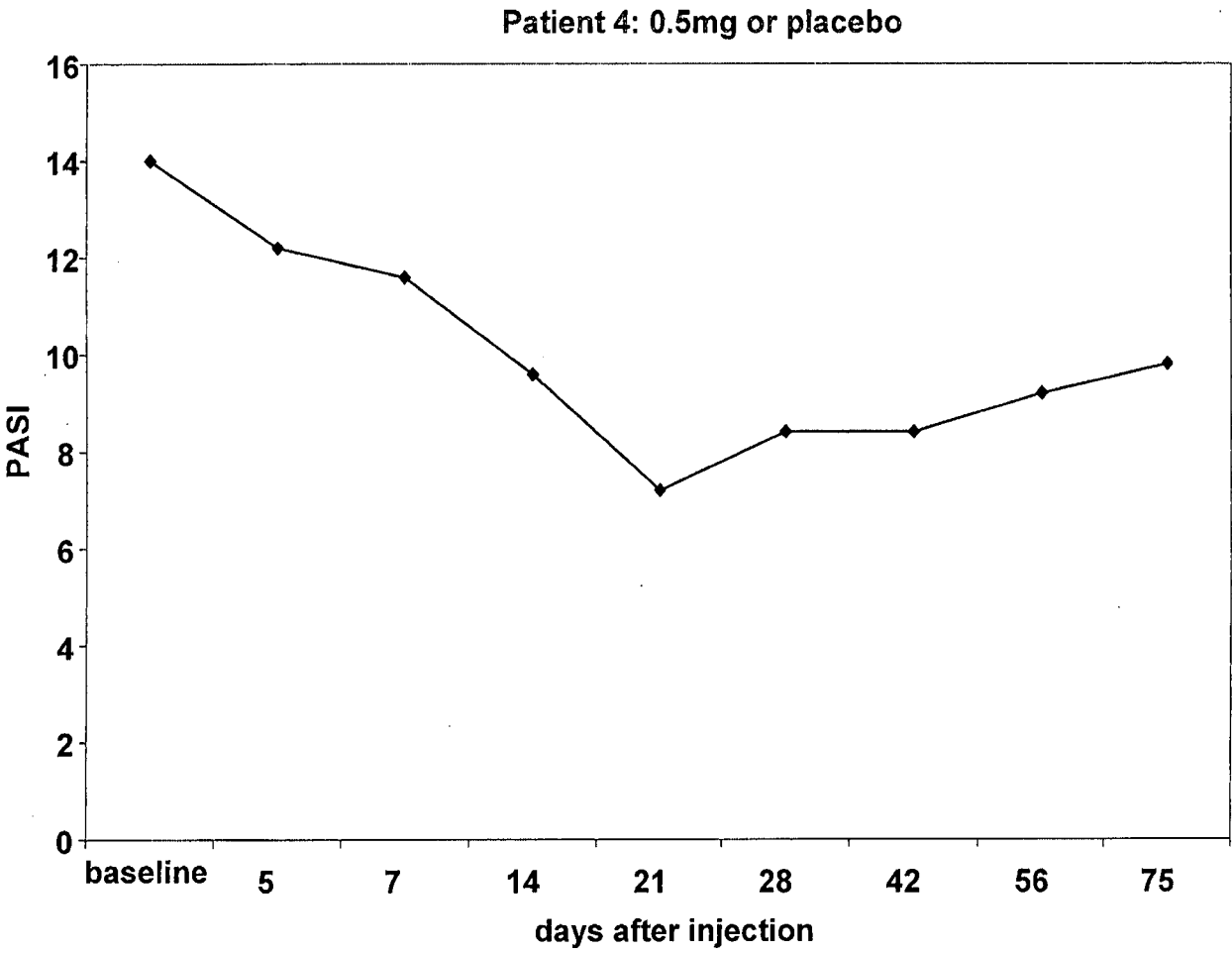


FIGURE 11 D

95

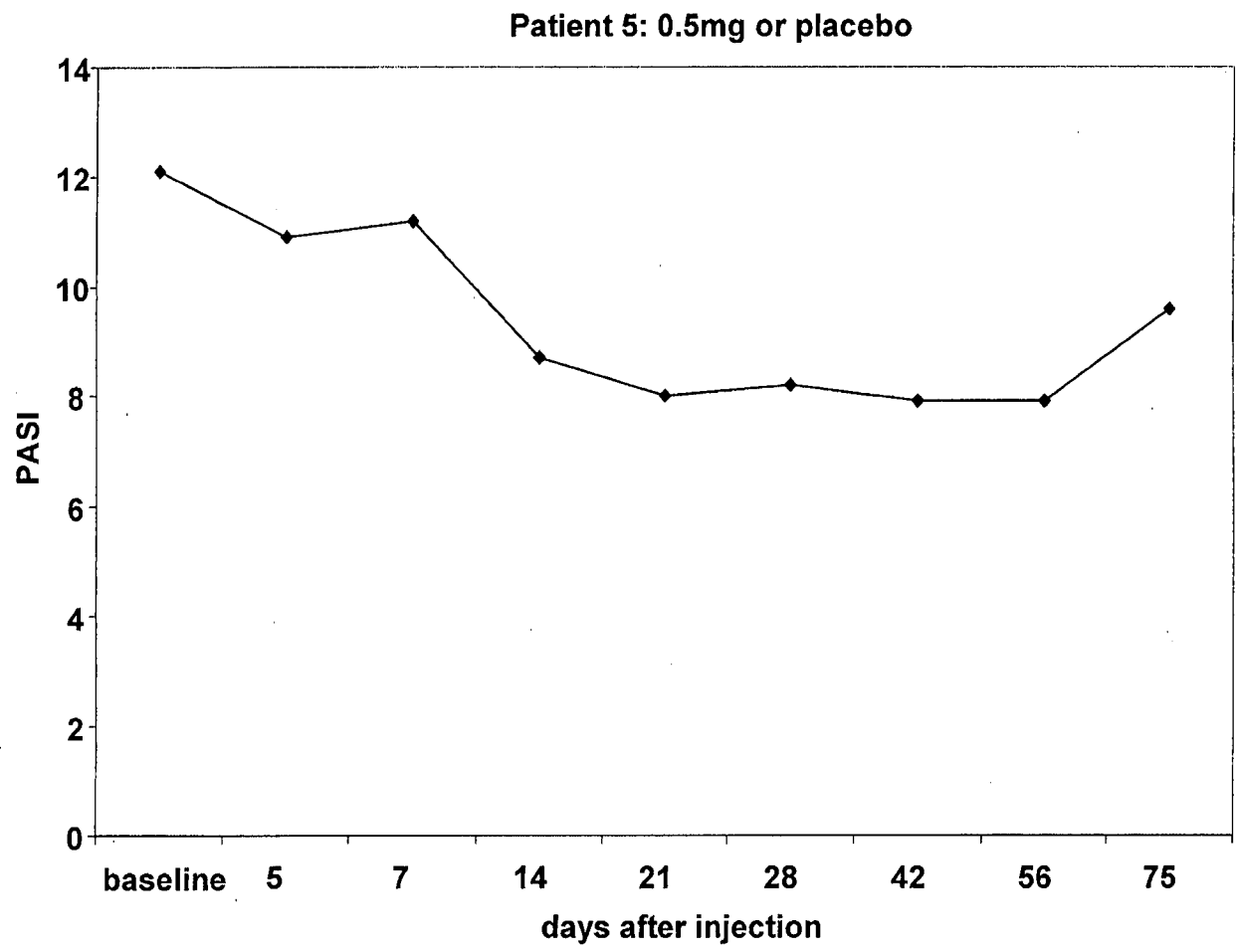


FIGURE 11E

96

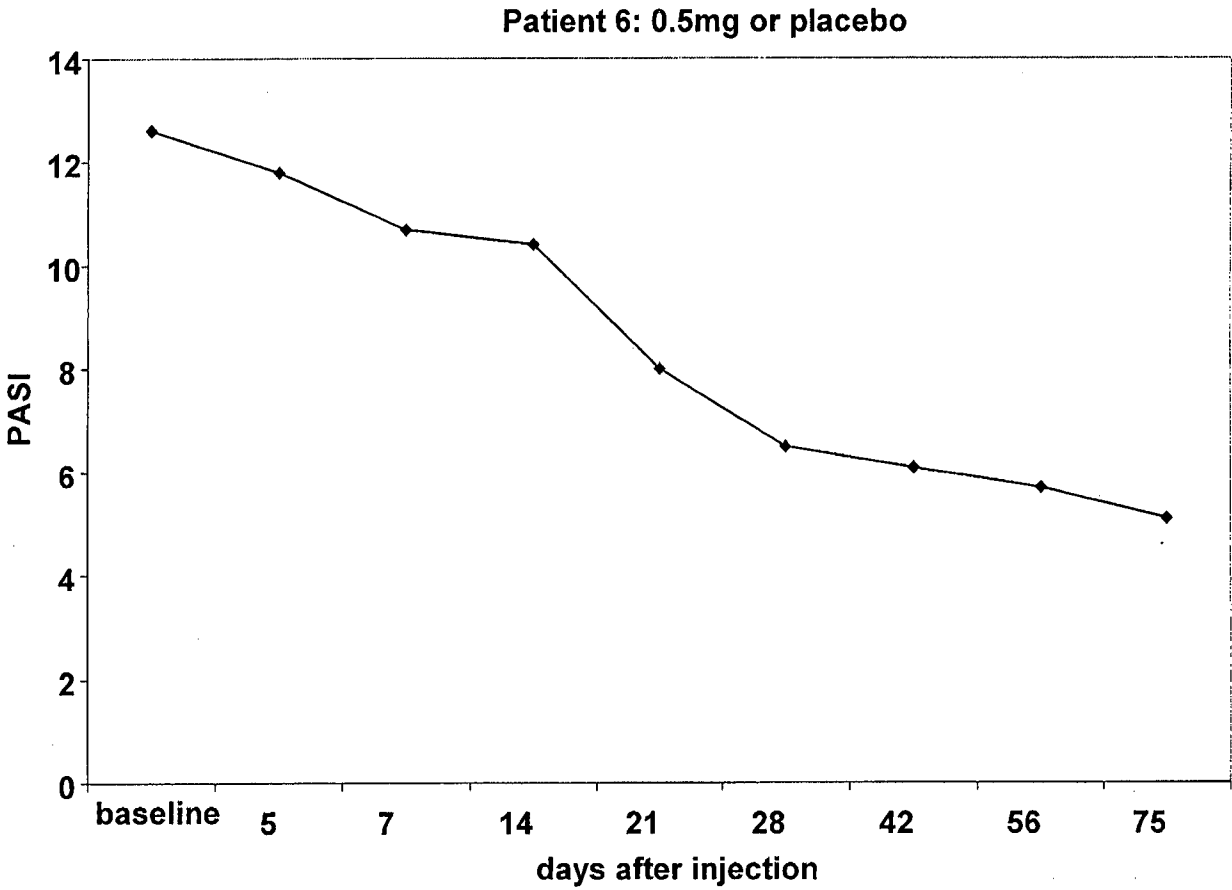


FIGURE 11 F

97

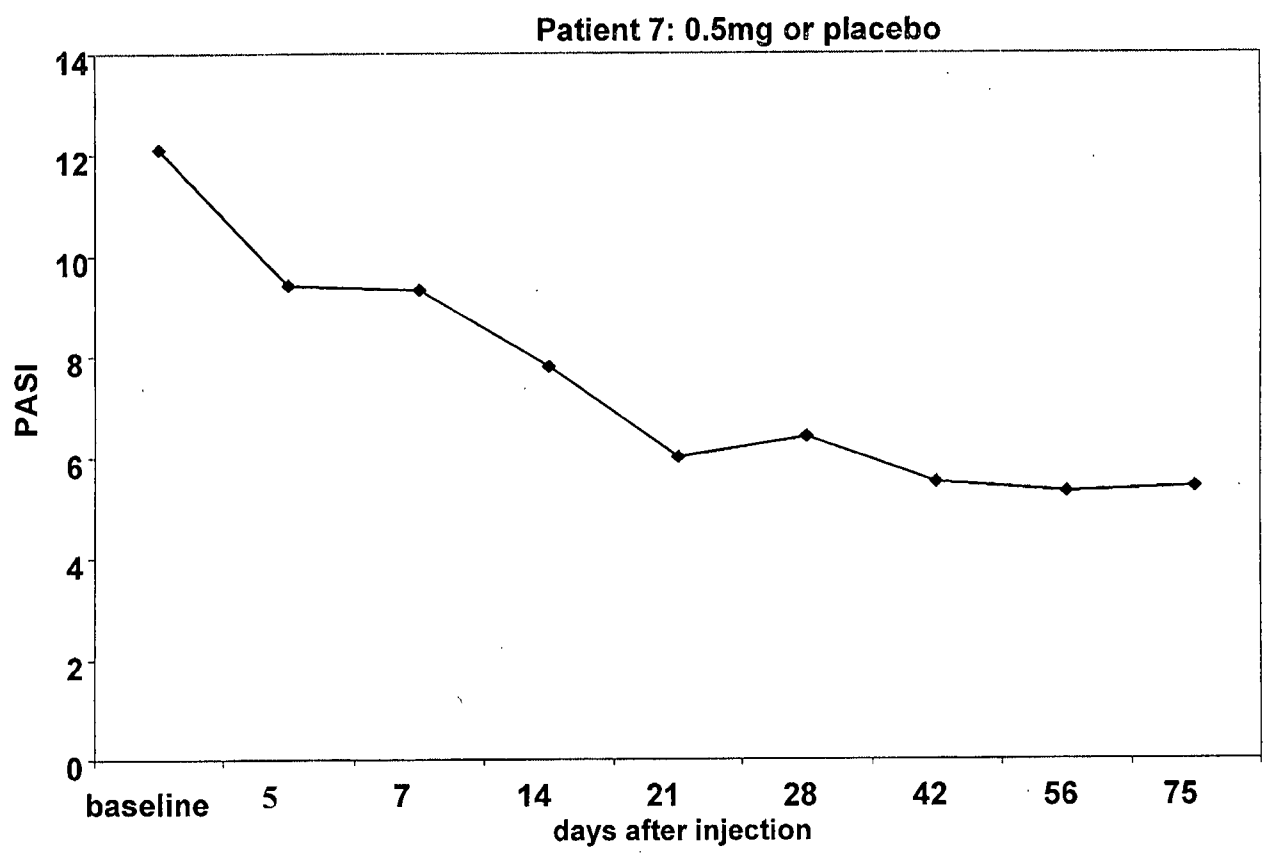


FIGURE 11 G

C18

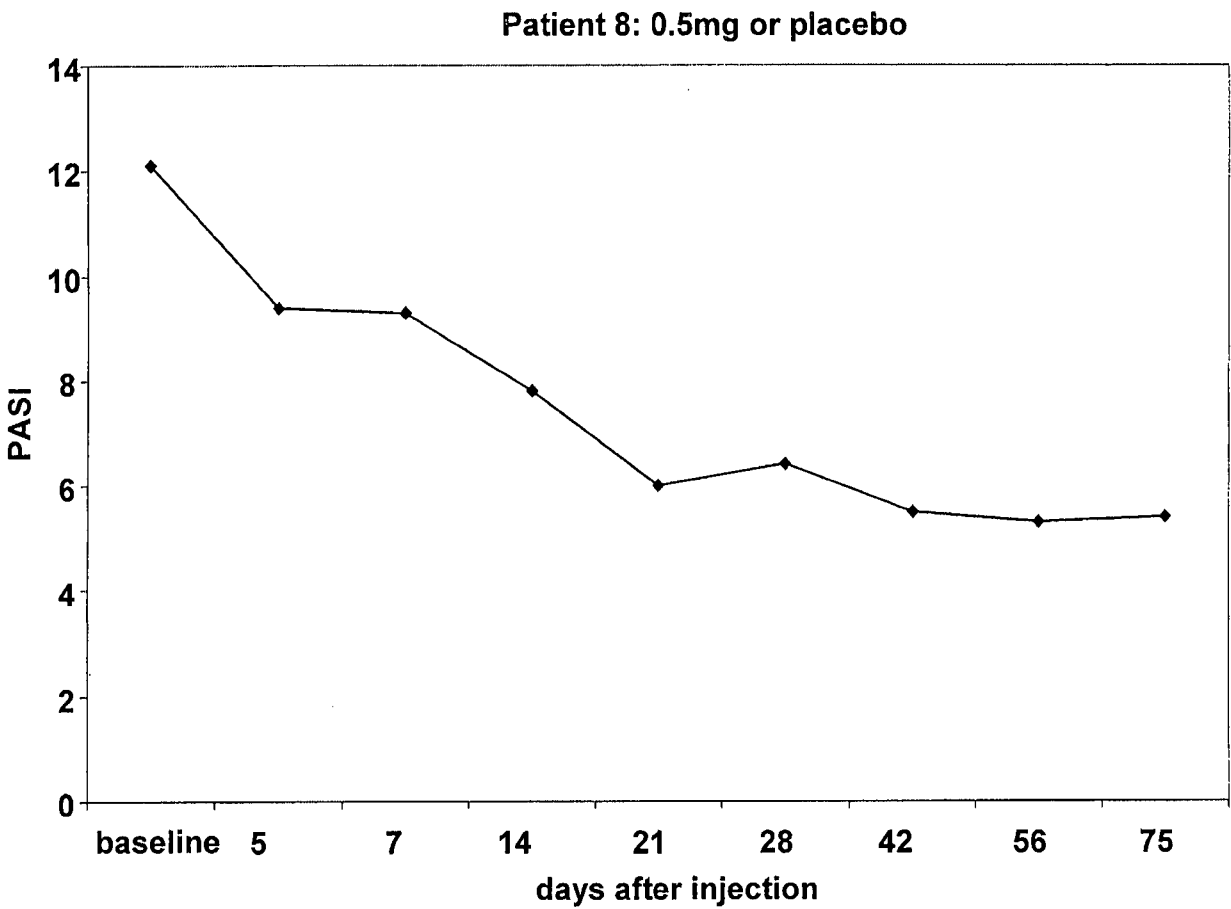


FIGURE 11 H

19

Patient 1: 2.5mg or placebo

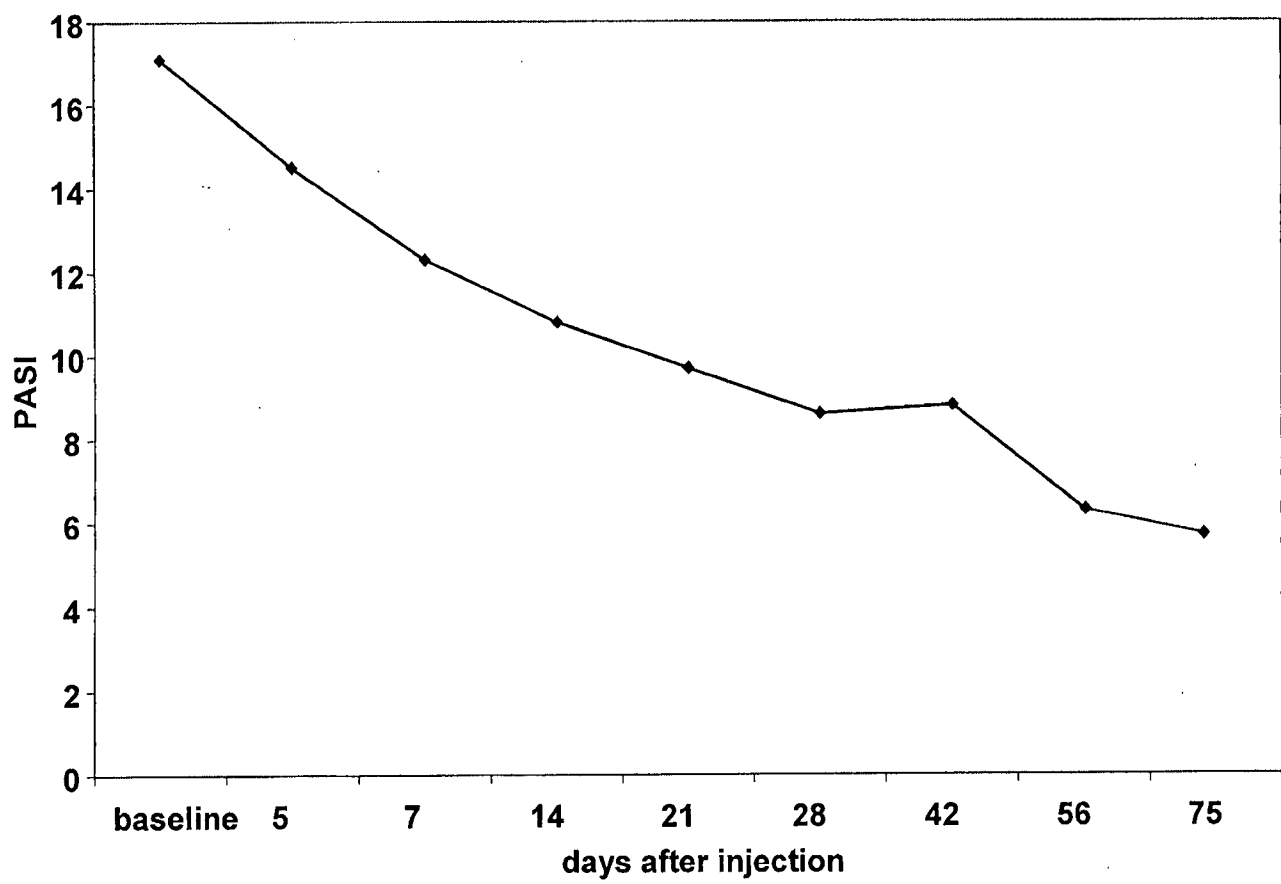


FIGURE 12 A

100

Patient 2: 2.5mg or placebo

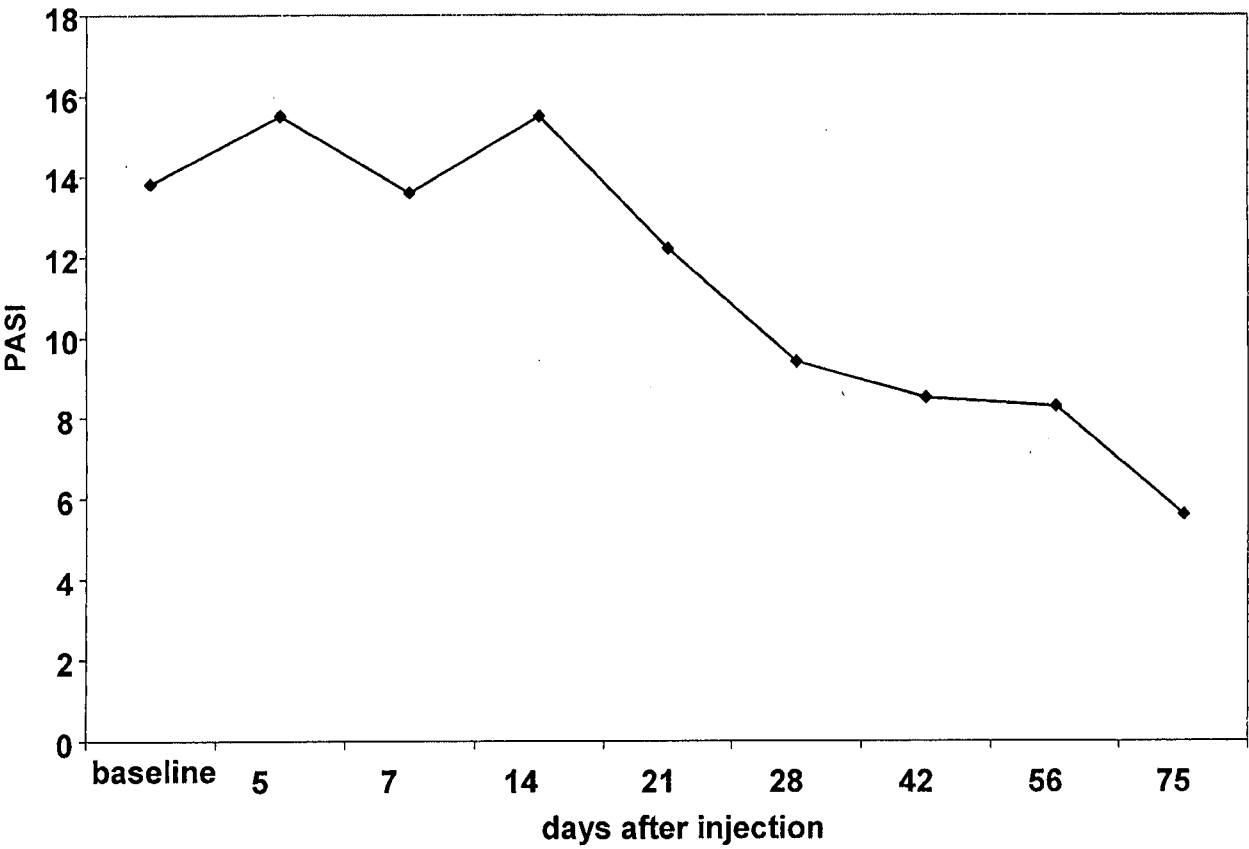


FIGURE 12 B

101

Patient 3: 2.5mg or placebo

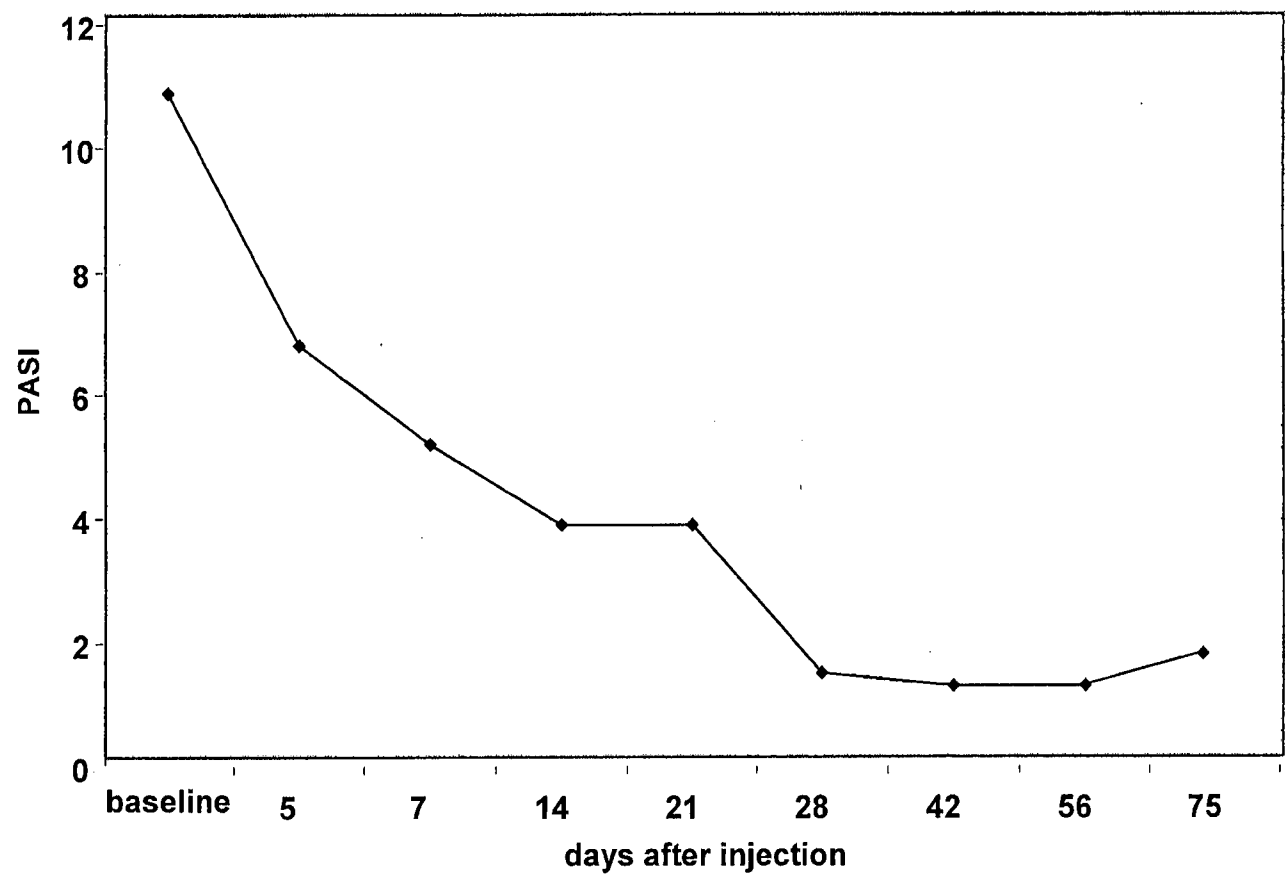


FIGURE 12 C

02

Patient 4: 2.5mg or placebo

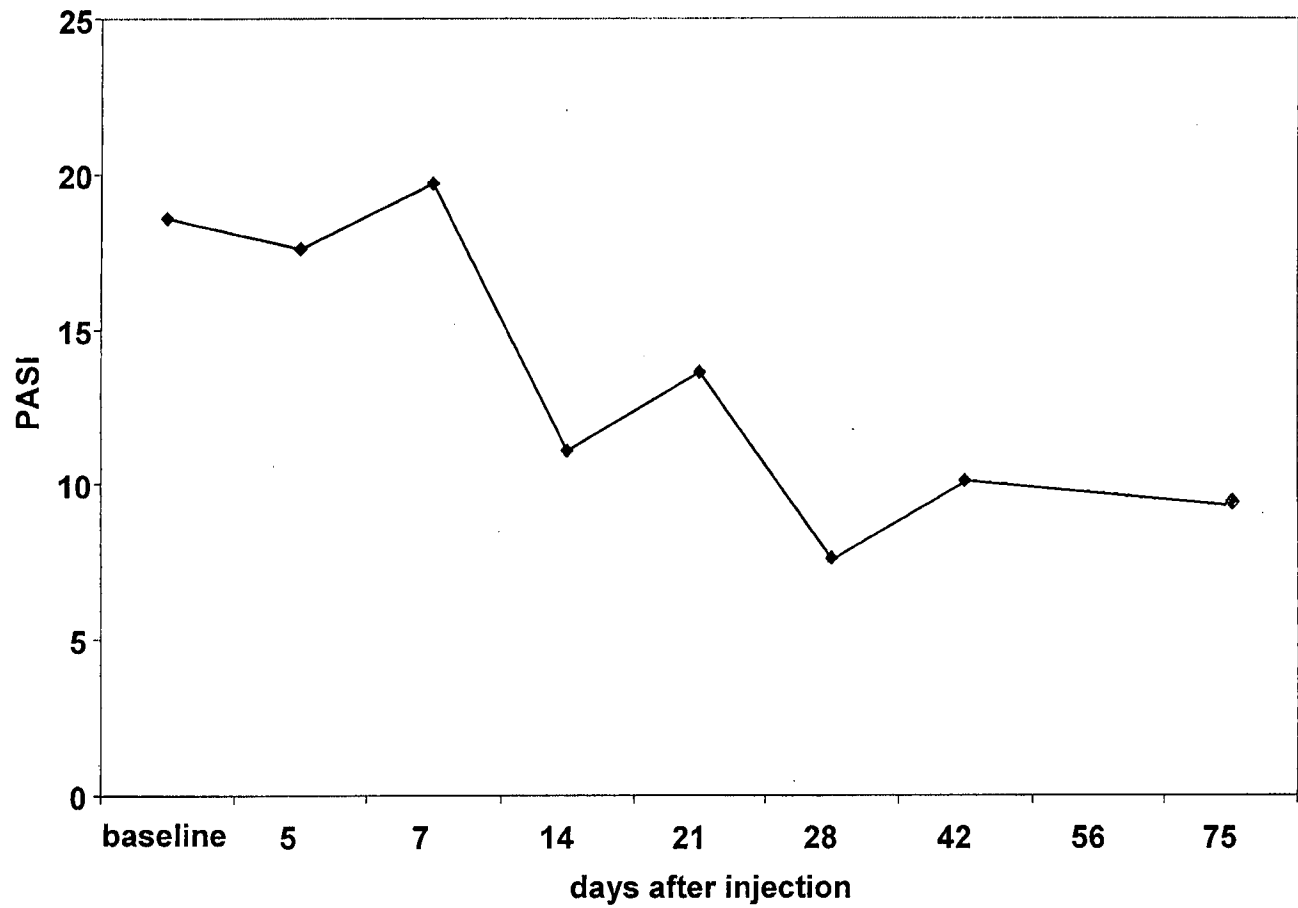


FIGURE 12D

103

Patient 5: 2.5mg or placebo

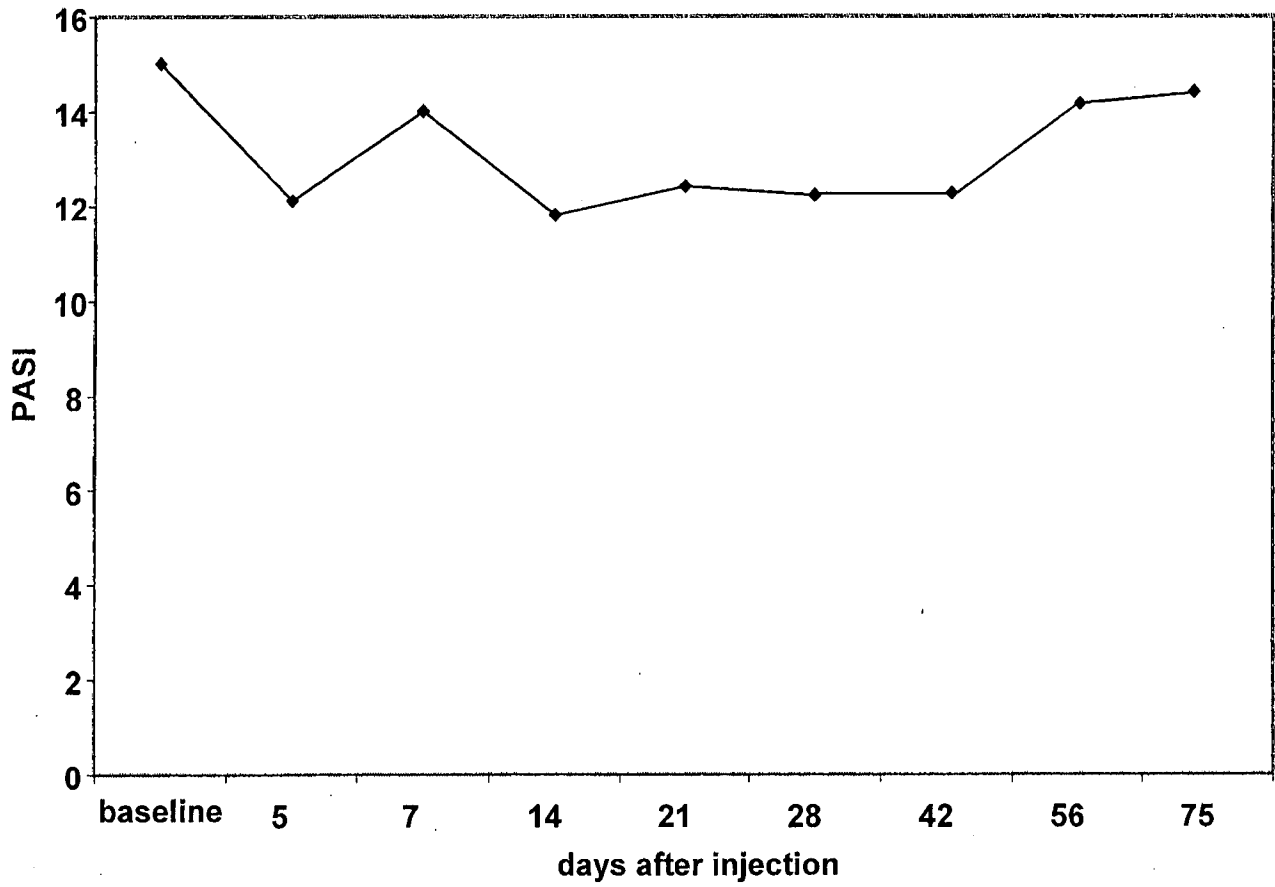


FIGURE 12 E

104

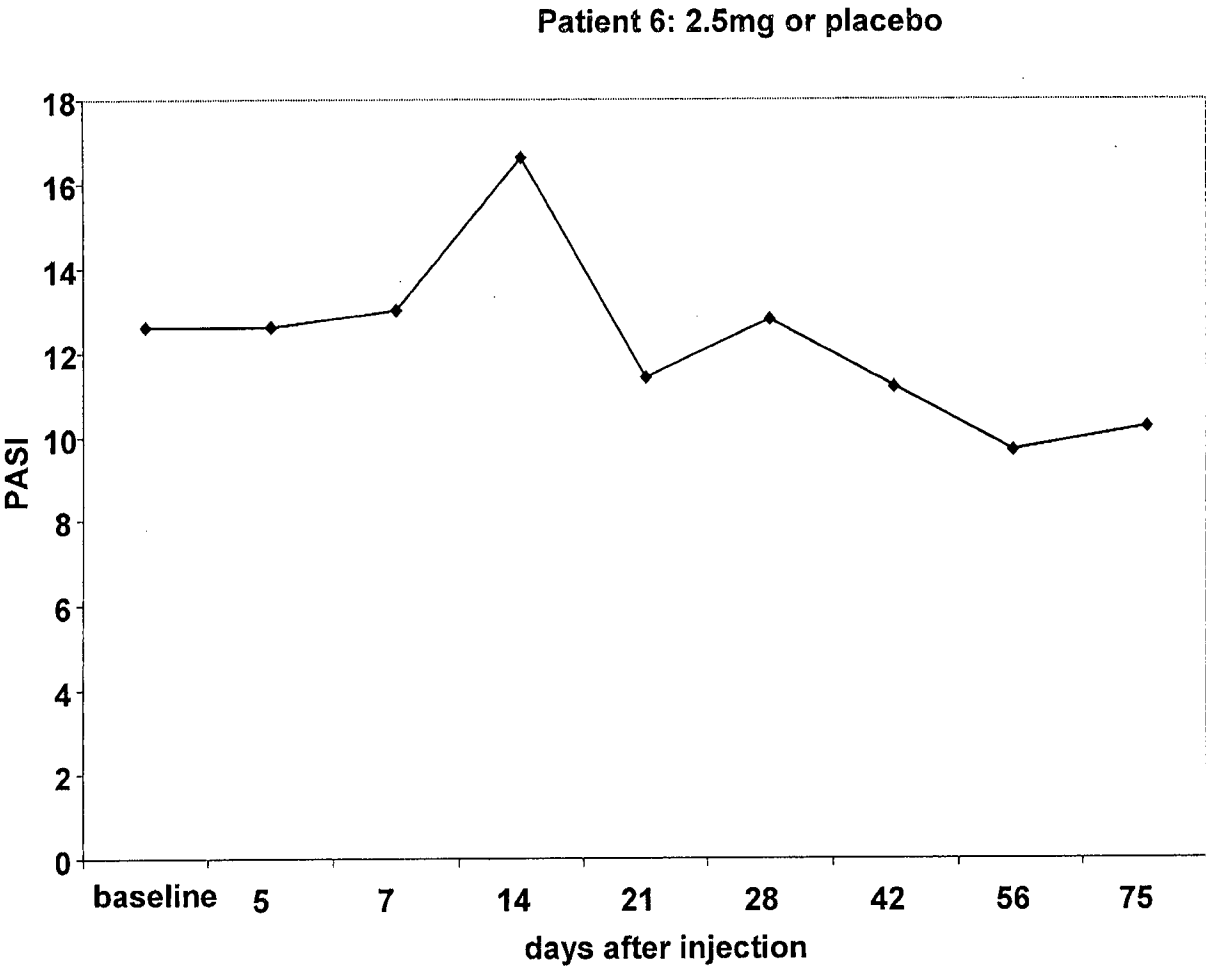


FIGURE 12F

PS

Patient 7: 2.5mg or placebo

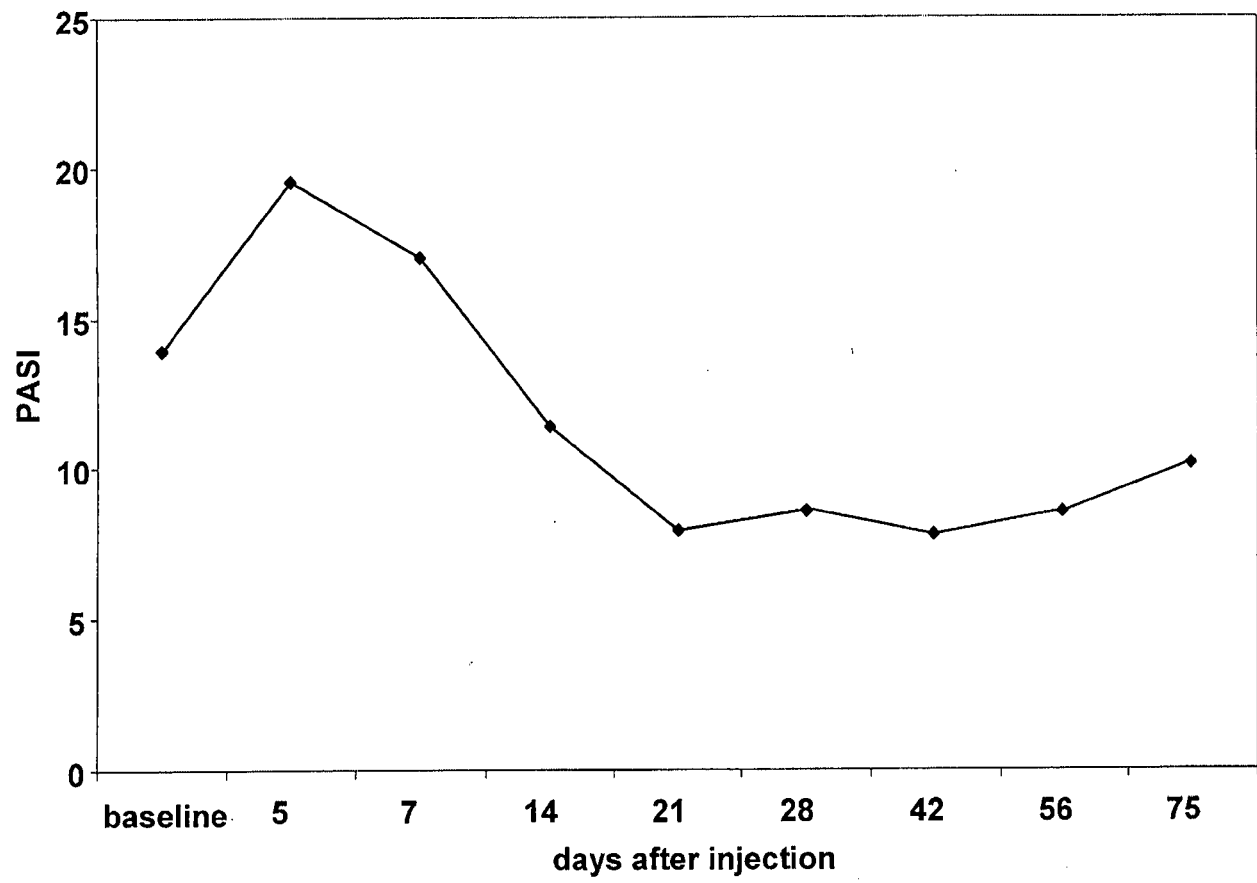


FIGURE 12 G

106

Patient 8: 2.5mg or placebo

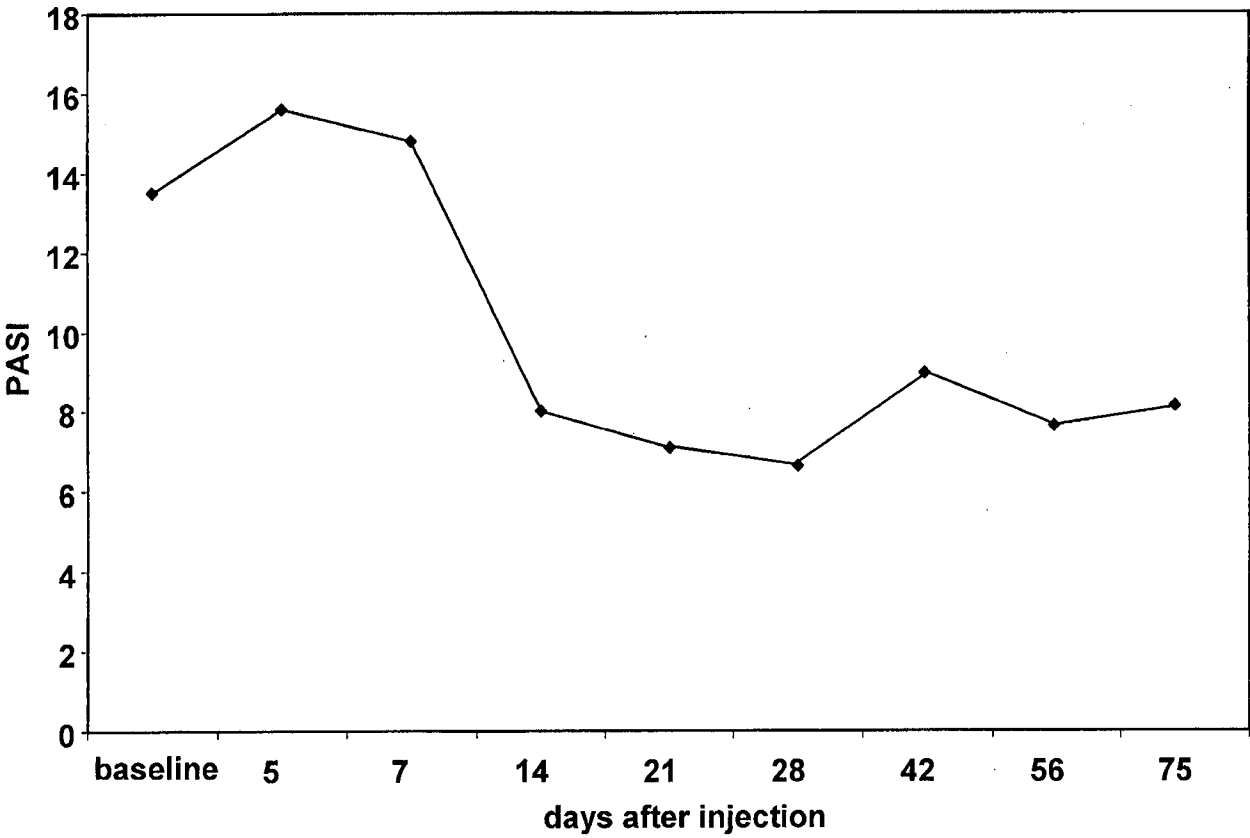


FIGURE 12H

207

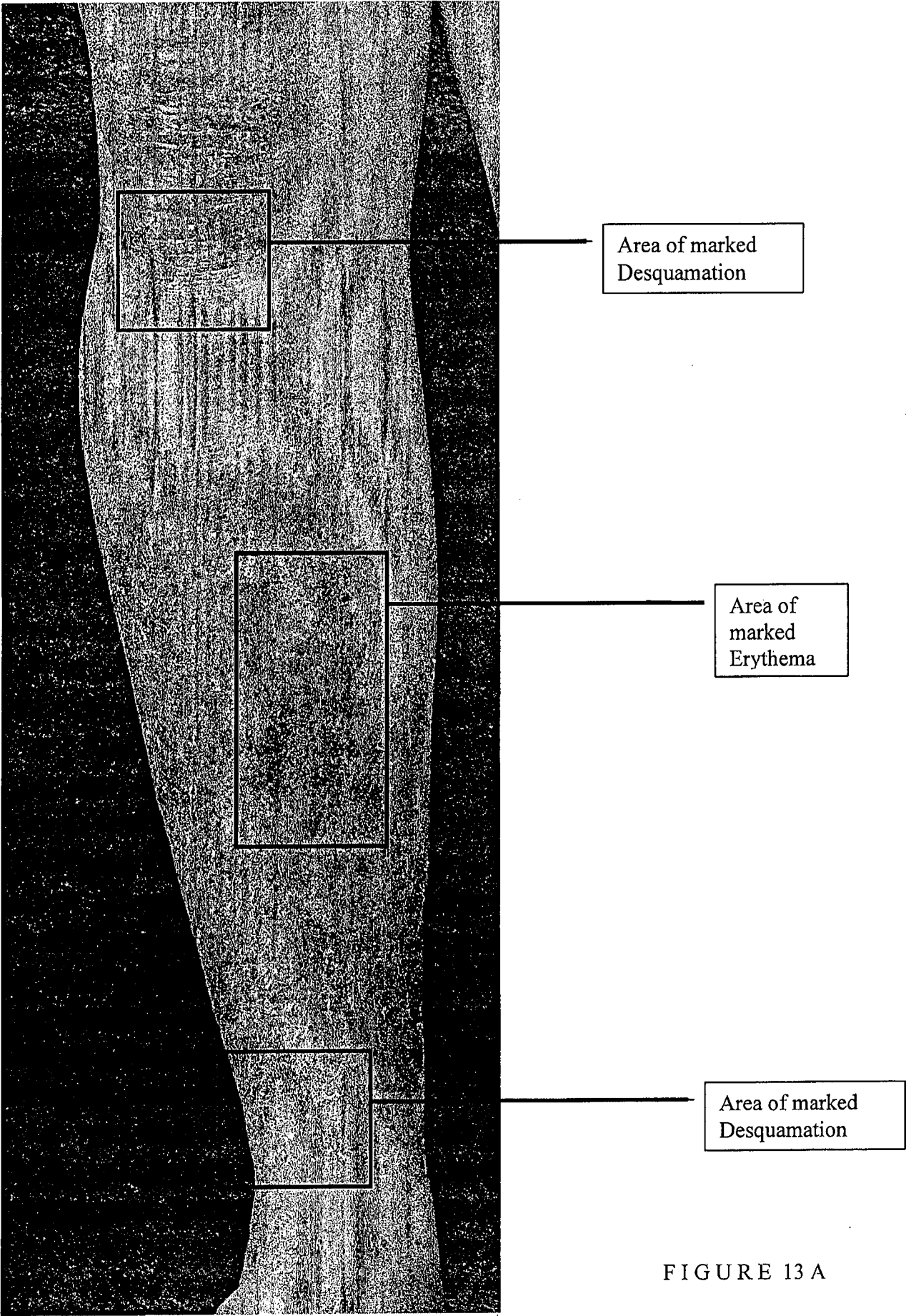


FIGURE 13 A

108

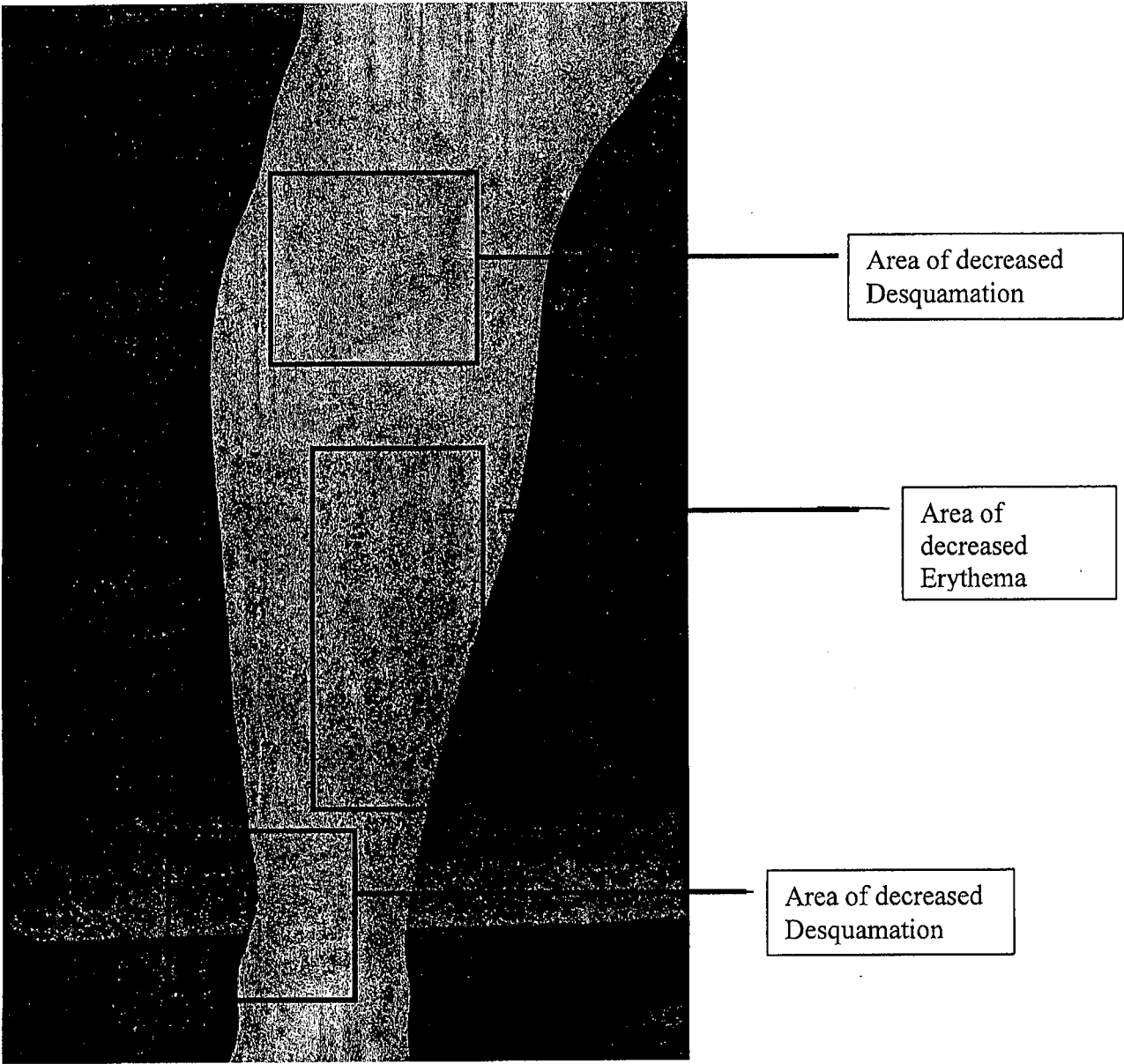


FIGURE 13 B

709

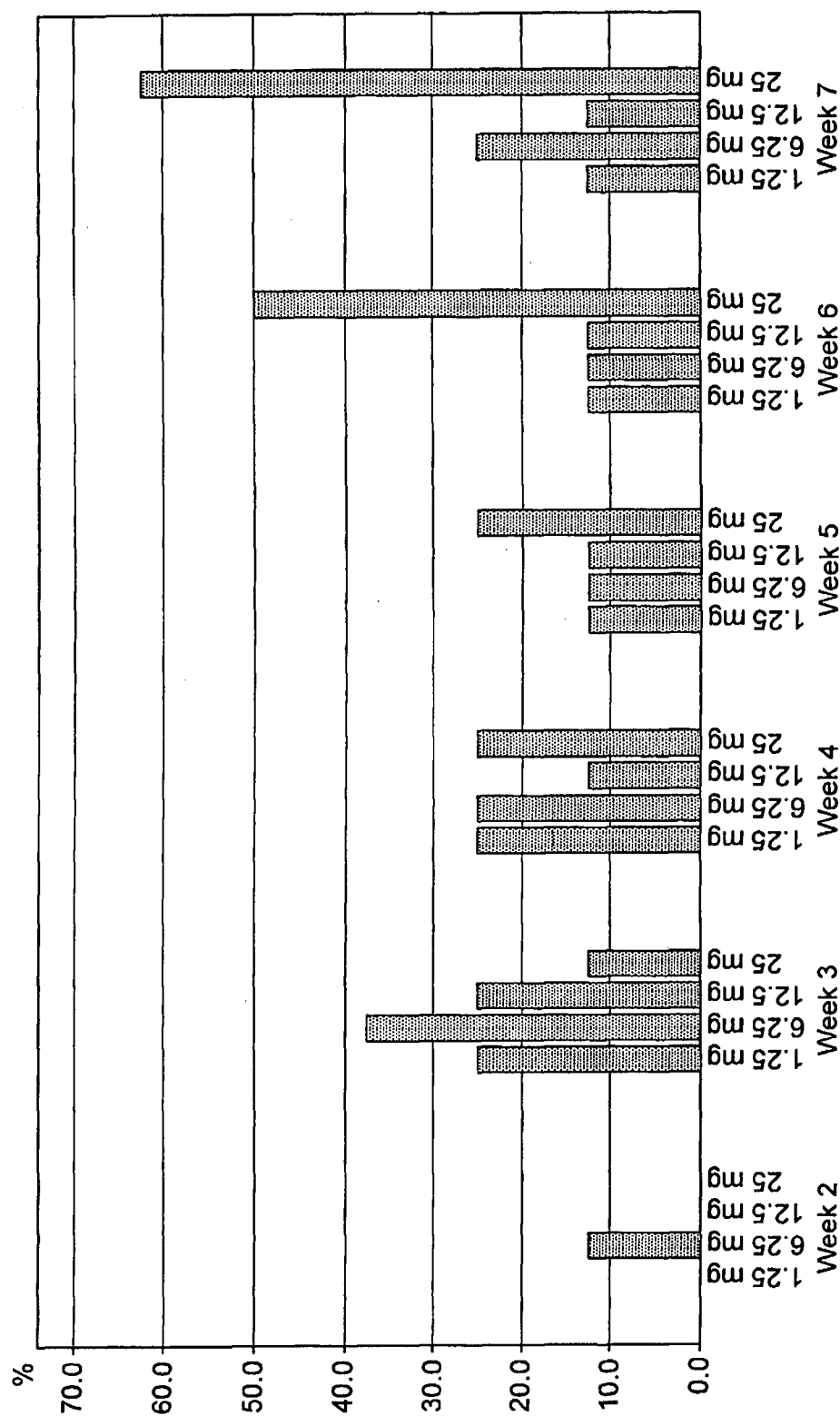


FIGURE 14

110

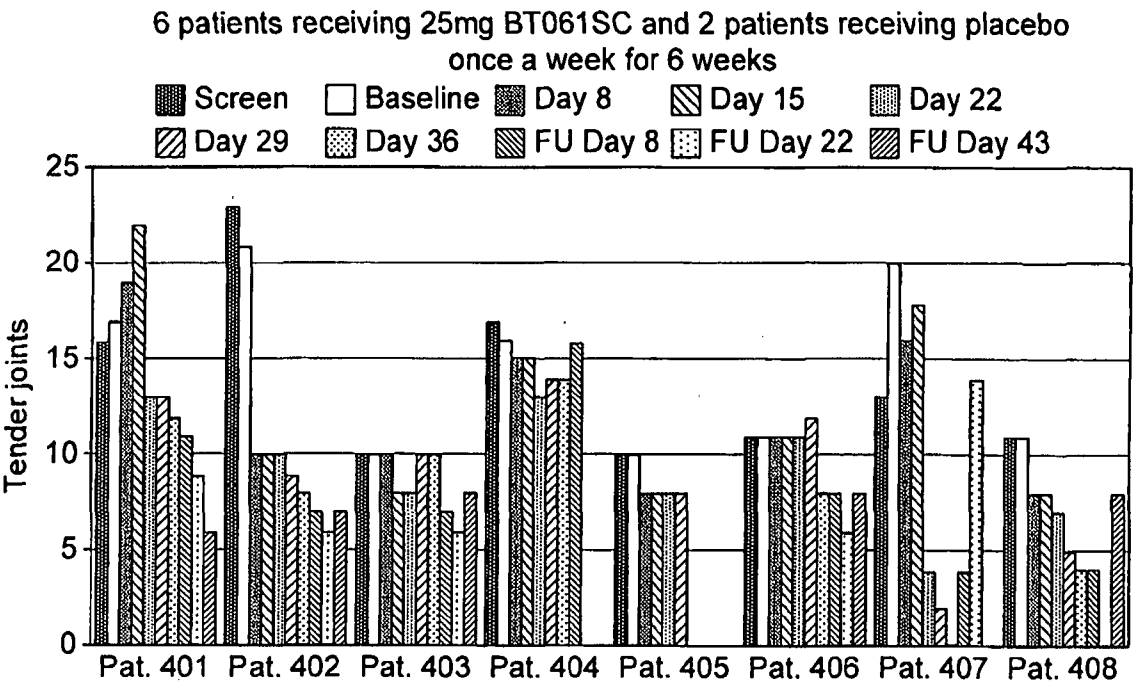


FIGURE 15 A

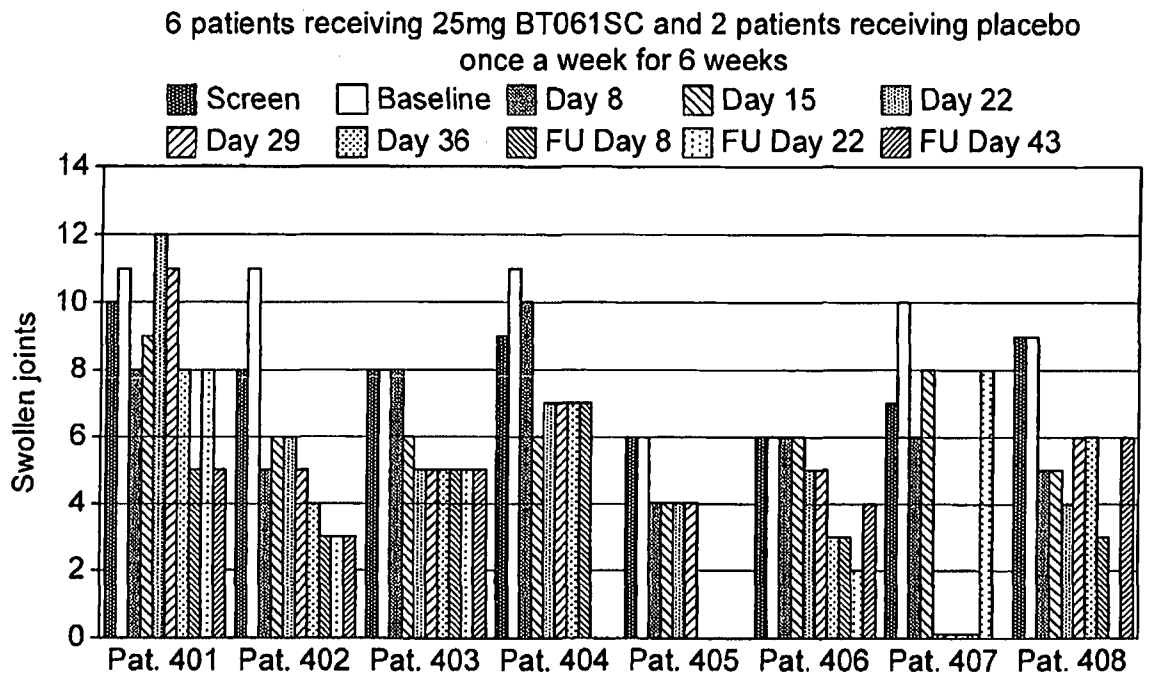


FIGURE 15 B

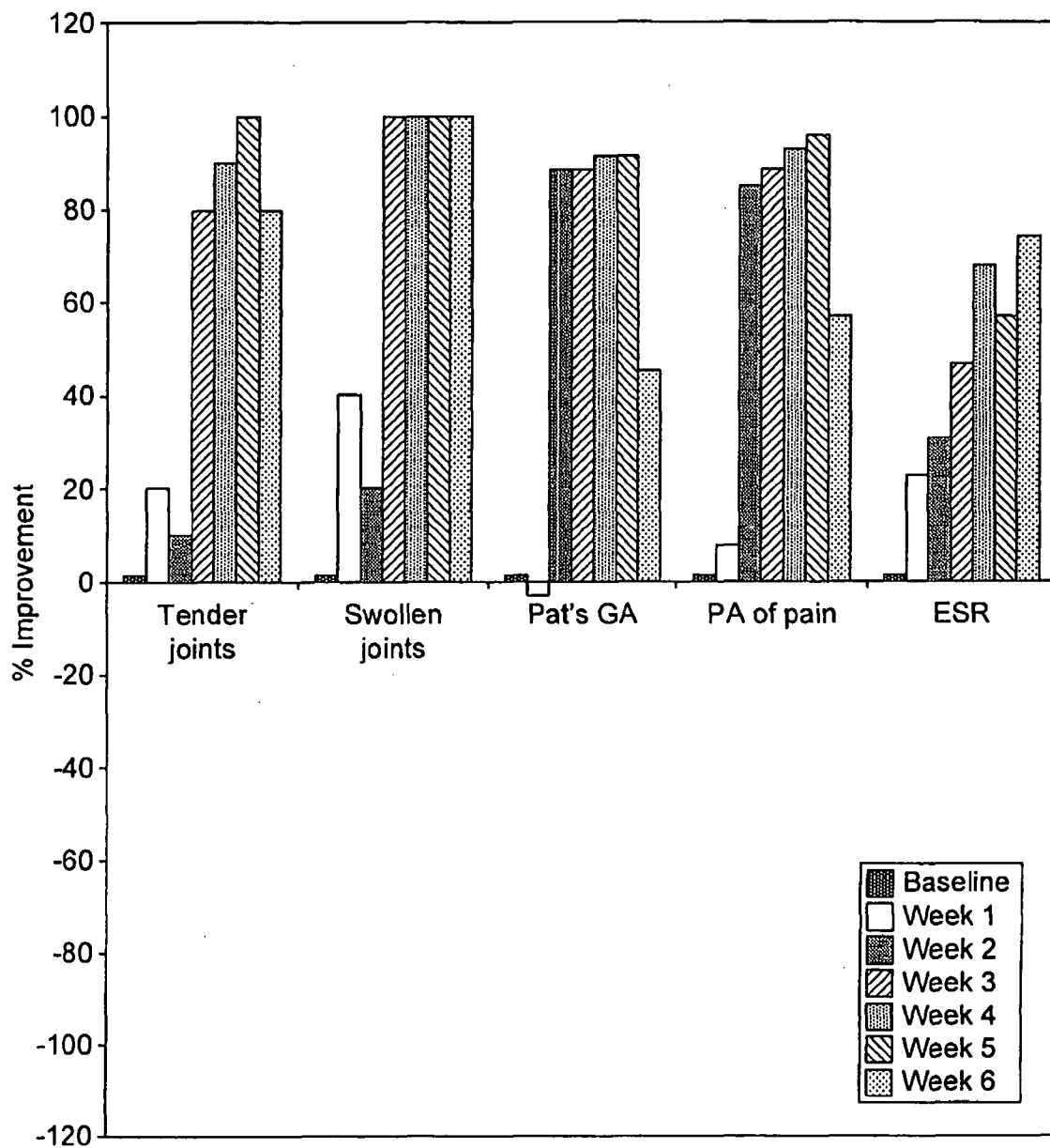


FIGURE 16 A

112

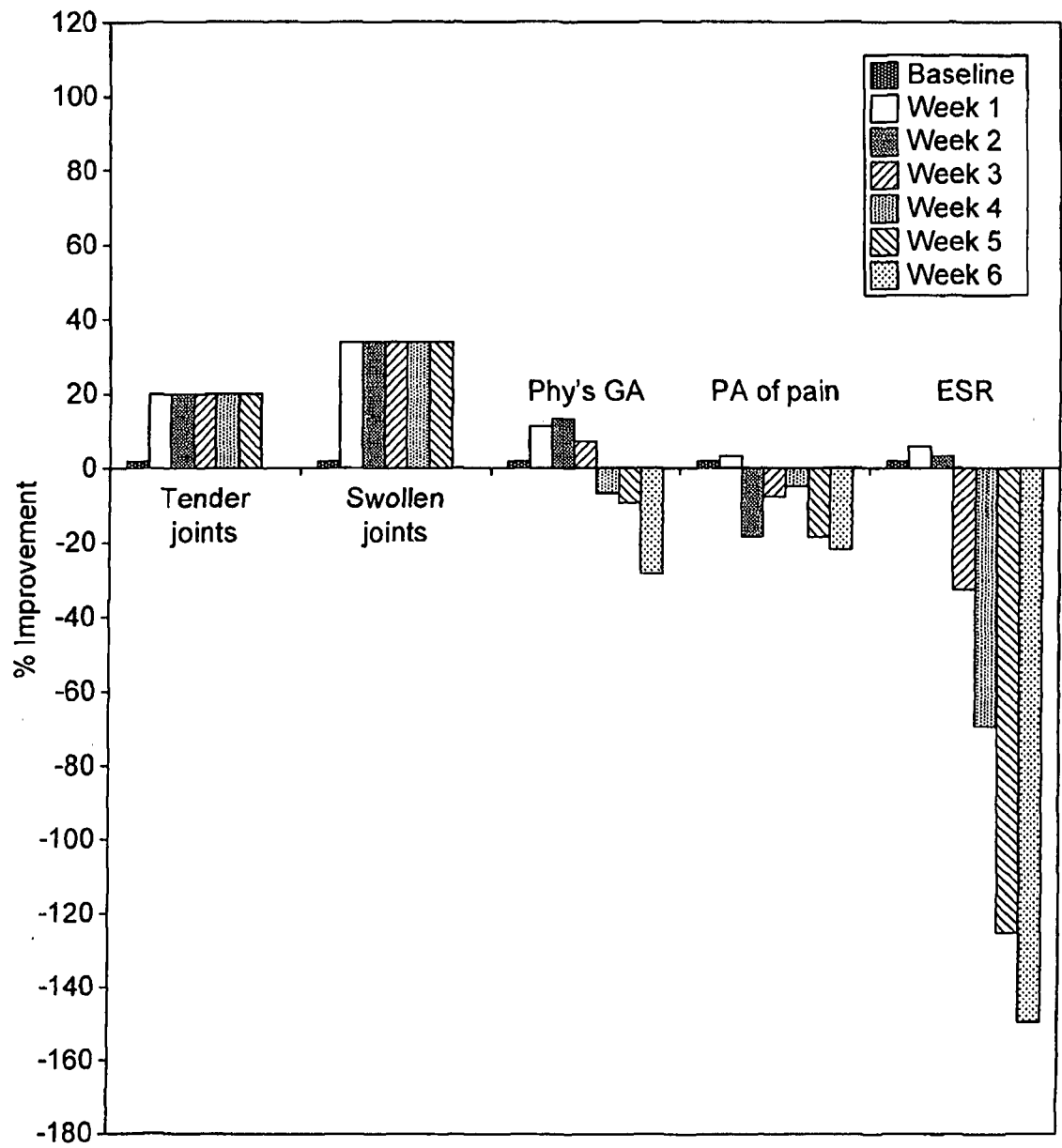


FIGURE 16 B

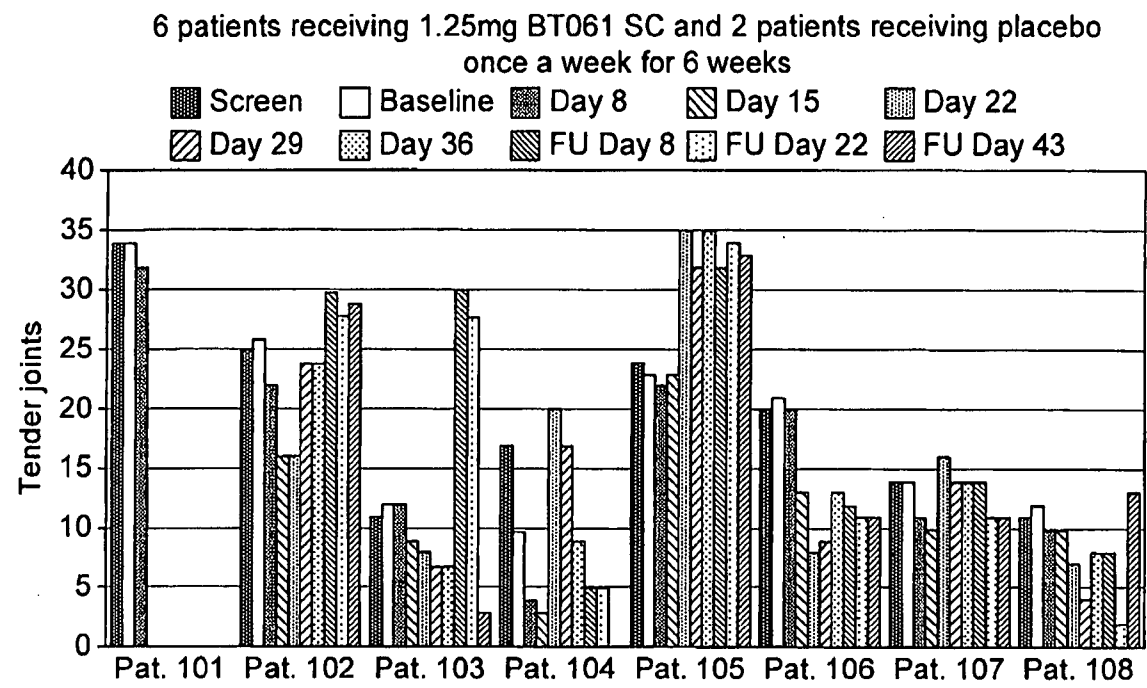


FIGURE 17 A

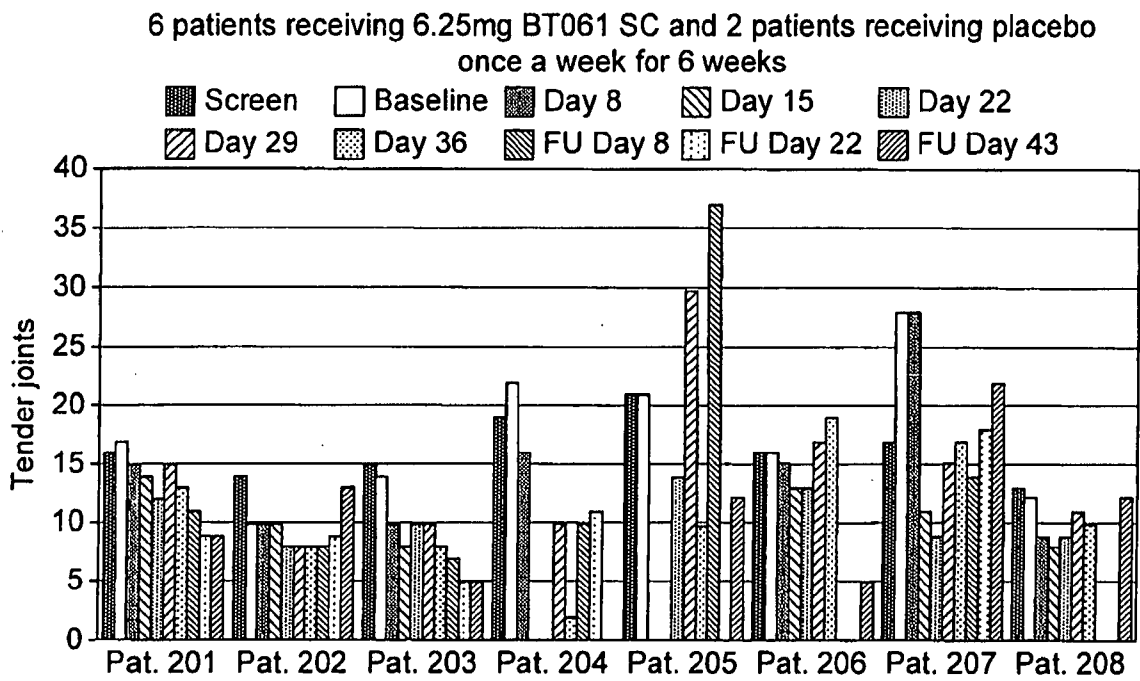


FIGURE 17 B

114

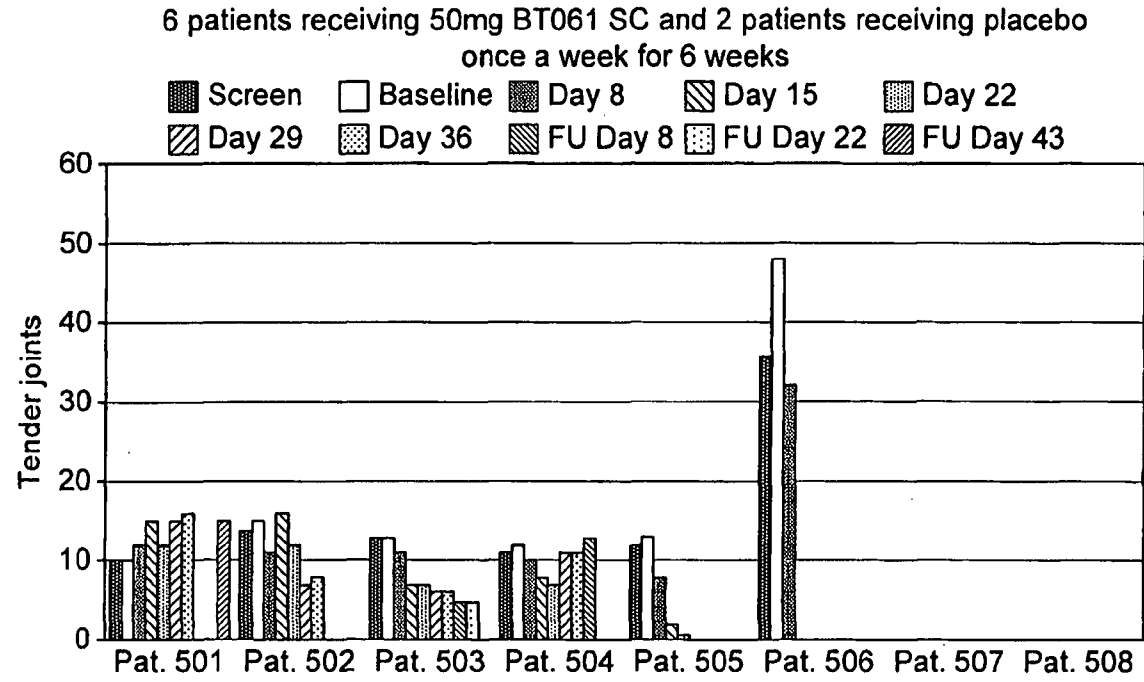


FIGURE 18A

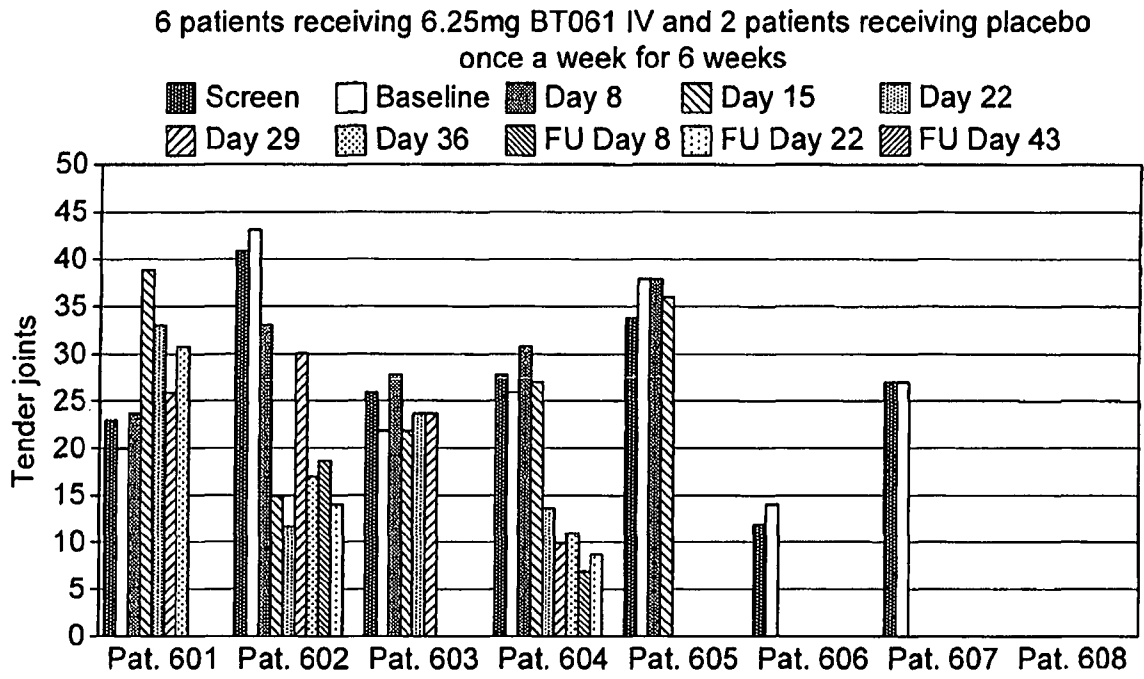


FIGURE 18B

115

	FR1	CDR1	FR2
	1	2	3
	4		5
	6	7	8
	9	10	
	11	12	13
	14	15	16
	17	18	19
	20	21	22
	23	24	25
	26	27	28
	29	30	31
	32	33	34
	35	36	37
	38	39	40
	41	42	43
	44	45	46
	47	48	49
	50	51	52
	53	54	55
	56	57	58
	59	60	61
	62	63	64
	65	66	67
	68	69	70
	71	72	73
	74	75	76
	77	78	79
	80	81	82
	83	84	85
	86	87	88
	89	90	91
	92	93	94
	95	96	97
	98	99	100
	101	102	103
	104	105	106
	107	108	109
	110	111	112
	113	114	115
	116	117	118
	119	120	121
	122	123	124
	125	126	127
	128	129	130
	131	132	133
	134	135	136
	137	138	139
	140	141	142
	143	144	145
	146	147	148
	149	150	151
	152	153	154
	155	156	157
	158	159	160
	161	162	163
	164	165	166
	167	168	169
	170	171	172
	173	174	175
	176	177	178
	179	180	181
	182	183	184
	185	186	187
	188	189	190
	191	192	193
	194	195	196
	197	198	199
	200	201	202
	203	204	205
	206	207	208
	209	210	211
	212	213	214
	215	216	217
	218	219	220
	221	222	223
	224	225	226
	227	228	229
	230	231	232
	233	234	235
	236	237	238
	239	240	241
	242	243	244
	245	246	247
	248	249	250
	251	252	253
	254	255	256
	257	258	259
	260	261	262
	263	264	265
	266	267	268
	269	270	271
	272	273	274
	275	276	277
	278	279	280
	281	282	283
	284	285	286
	287	288	289
	290	291	292
	293	294	295
	296	297	298
	299	300	301
	302	303	304
	305	306	307
	308	309	310
	311	312	313
	314	315	316
	317	318	319
	320	321	322
	323	324	325
	326	327	328
	329	330	331
	332	333	334
	335	336	337
	338	339	340
	341	342	343
	344	345	346
	347	348	349
	350	351	352
	353	354	355
	356	357	358
	359	360	361
	362	363	364
	365	366	367
	368	369	370
	371	372	373
	374	375	376
	377	378	379
	380	381	382
	383	384	385
	386	387	388
	389	390	391
	392	393	394
	395	396	397
	398	399	400
	401	402	403
	404	405	406
	407	408	409
	410	411	412
	413	414	415
	416	417	418
	419	420	421
	422	423	424
	425	426	427
	428	429	430
	431	432	433
	434	435	436
	437	438	439
	440	441	442
	443	444	445
	446	447	448
	449	450	451
	452	453	454
	455	456	457
	458	459	460
	461	462	463
	464	465	466
	467	468	469
	470	471	472
	473	474	475
	476	477	478
	479	480	481
	482	483	484
	485	486	487
	488	489	490
	491	492	493
	494	495	496
	497	498	499
	500	501	502
	503	504	505
	506	507	508
	509	510	511
	512	513	514
	515	516	517
	518	519	520
	521	522	523
	524	525	526
	527	528	529
	530	531	532
	533	534	535
	536	537	538
	539	540	541
	542	543	544
	545	546	547
	548	549	550
	551	552	553
	554	555	556
	557	558	559
	560	561	562
	563	564	565
	566	567	568
	569	570	571
	572	573	574
	575	576	577
	578	579	580
	581	582	583
	584	585	586
	587	588	589
	590	591	592
	593	594	595
	596	597	598
	599	600	601
	602	603	604
	605	606	607
	608	609	610
	611	612	613
	614	615	616
	617	618	619
	620	621	622
	623	624	625
	626	627	628
	629	630	631
	632	633	634
	635	636	637
	638	639	640
	641	642	643
	644	645	646
	647	648	649
	650	651	652
	653	654	655
	656	657	658
	659	660	661
	662	663	664
	665	666	667
	668	669	670
	671	672	673
	674	675	676
	677	678	679
	680	681	682
	683	684	685
	686	687	688
	689	690	691
	692	693	694
	695	696	697
	698	699	700
	701	702	703
	704	705	706
	707	708	709
	710	711	712
	713	714	715
	716	717	718
	719	720	721
	722	723	724
	725	726	727
	728	729	730
	731	732	733
	734	735	736
	737	738	739
	740	741	742
	743	744	745
	746	747	748
	749	750	751
	752	753	754
	755	756	757
	758	759	760
	761	762	763
	764	765	766
	767	768	769
	770	771	772
	773	774	775
	776	777	778
	779	780	781
	782	783	784
	785	786	787
	788	789	790
	791	792	793
	794	795	796
	797	798	799
	800	801	802
	803	804	805
	806	807	808
	809	810	811
	812	813	814
	815	816	817
	818	819	820
	821	822	823
	824	825	826
	827	828	829
	830	831	832
	833	834	835
	836	837	838
	839	840	841
	842	843	844
	845	846	847
	848	849	850
	851	852	853
	854	855	856
	857	858	859
	860	861	862
	863	864	865
	866	867	868
	869	870	871
	872	873	874
	875	876	877
	878	879	880
	881	882	883
	884	885	886
	887	888	889
	890	891	892
	893	894	895
	896	897	898
	899	900	901
	902	903	904
	905	906	907
	908	909	910
	911	912	913
	914	915	916
	917	918	919
	920	921	922
	923	924	925
	926	927	928
	929	930	931
	932	933	934
	935	936	937
	938	939	940
	941	942	943
	944	945	946
	947	948	949
	950	951	952
	953	954	955
	956	957	958
	959	960	961
	962	963	964
	965	966	967
	968	969	970
	971	972	973
	974	975	976
	977	978	979
	980	981	982
	983	984	985
	986	987	988
	989	990	991
	992	993	994
	995	996	997
	998	999	1000

FIGURE 19

FIGURE 20

AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunes. La invención involucra un agente tal como un anticuerpo monoclonal humanizado que puede administrarse a pacientes en dosis superiores a las previamente descritas. Es particularmente efectivo para pacientes que tienen enfermedades o características que requieren dosis superiores para tratamiento efectivo. La invención prevé una composición farmacéutica que comprende el agente, tal como el anticuerpo, en concentración eficaz, así como usos y métodos de tratamiento que emplea las composiciones y medicamentos que comprenden el agente.

La autoinmunidad es la falla de un organismo en reconocer sus propias partes constituyentes (hasta niveles sub-moleculares) como "propias", lo que resulta en una respuesta inmune contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que resulta de esta respuesta inmune aberrante, se denomina una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes incluyen esclerosis múltiple (MS = multiple sclerosis), artritis reumatoide (RA = rheumatoid arthritis), psoriasis, artritis psoriática, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia gravis (MG = myasthenia gravis), síndrome poliglandular autoinmune tipo II (APS-II), tiroiditis de Hashimoto (HT), diabetes tipo 1 (T1D), lupus sistémico eritematoso (SLE) y síndrome autoinmune linfoproliferativo (ALS).

La enfermedad de autoinmune ocurre cuando las células T reconocen y reaccionan con las moléculas "propias", esto es, moléculas producidas por las células del hospedero. La activación de las células T "auto-reactivas" por presentación de autoantígenos procesados por

células que presentan antígeno (APC = antigen presenting cells) lleva a su expansión clonal y migración a los tejidos específicos, en donde inducen inflamación y destrucción de tejido.

5 Normalmente, las células T son tolerantes respecto a tejido autólogo y solo reaccionan ante presentación de estructuras heterólogas. La tolerancia central y tolerancia periférica comprenden los dos mecanismos por los cuales el sistema inmune impide que
10 células T auto-reactivas induzcan sus funciones nocivas. La tolerancia central está mediada a través de selección negativa. Este proceso involucra la eliminación, a través de delección clonal de células T auto-reactivas, durante desarrollo ontogénico en el timo.

15 La tolerancia periférica es el respaldo disponible si la tolerancia central falla y células auto-reactivas escapan el timo. Este mecanismo de tolerancia ocurre en forma continua por toda la vida, manteniendo a
las células auto-reactivas comprobadas a través de
20 ignorancia inmune (anergia), delección periférica y/o supresión activa.

Las células regulatorias T (Tregs = T regulatory cells, anteriormente también designadas "células supresoras") como parte de supresión activa, mantienen
25 tolerancia periférica y regulan la autoinmunidad (Suri-Payer et al., J Immunol. 157: 1799-1805 (1996); Asano et al., J Exp. Med. 184:387-396 (1996); Bonomo et al., J. Immunol. 154: 6602-6611 (1995); Willerford et al., Immunity 3: 521-530 (1995); Takahashi et al., Int. Immunol. 10: 1969-1980 (1998); Salomon et al., Immunity 12: 431-440
30 (2000); Read et al., J Exp. Med. 192: 295-302 (2000). En

general, las células T regulatorias inhiben la activación y/o función de células efectoras tipo auxiliar T 1 (TH1) y TH2. La desregulación en frecuencia de células Treg o funcionamiento puede llevar a enfermedades autoinmunes debilitantes (Baecher-Allan et al., Immunol. Review 212: 203-216 (2006); Shevach, Annu. Rev. Immunol. 18: 423-449 (2000); Salomon et al., Immunity 12: 431-440 (2000); Sakaguchi et al., Immunol. Rev. 182: 18-32 (2001)).

Varios sub-conjuntos de células T regulatorias se han caracterizado. La familia de Tregs consiste de dos sub-conjuntos clave: de origen natural, por ejemplo Tregs CD4⁺CD25⁺ y Tregs inducidas periféricamente Tr1 y Th3. Además, NKTregs y Tregs CD8⁺ se han descrito en humanos y roedores (Fehérvári et al., J. Clin. Investigation 114: 1209-1217 (2004)).

Células Treg derivadas de timo (CD4⁺CD25⁺Treg de origen natural) son las células regulatorias principales involucradas en regular autoinmunidad o respuestas inmunes patogénicas.

i) son células T CD4⁺ y constituyen 5-10% de las células T CD4⁺ periféricas

ii) maduran en el timo

iii) en general se caracterizan por la expresión combinada del receptor IL-2 (CD25), la isoforma molecular baja de la molécula CD45, CD152 (CTLA-4), y el factor de transcripción FoxP3.

El papel de Tregs se ejemplifica mejor por experimentos que involucran reconstitución de ratones desnudos inmunodeficientes con células CD4⁺ que se agotan de células CD25⁺. Ratones desnudos reconstituidos con CD4⁺CD25⁻ desarrollan diversas enfermedades autoinmunes

específicas de órgano, tales como gastritis, ooforitis, orquitis y tiroiditis (Suri-Payeret al.; J. Immunol. 160: 1212-1218 (1998)).

La inclusión del sub-conjunto $CD4^+CD25^+$ en experimentos de reconstitución con ratones desnudos, evita el inicio de estas enfermedades (Sakaguchi et al., J Immunol. 155: 1151-1164 (1995)). El valor protector de células $CD4^+CD25^+$ contra autoinmunidad específica de órgano también se ha mostrado en varios otros modelos de autoinmunidad (por ejemplo gastritis autoinmune, prostatitis, ooforitis, glomerulonefritis, epididimitis y tiroiditis) provocado por timectomía neonatal realizada 3 días del nacimiento (d3Tx) o enfermedad intestinal inflamatoria provocada por reconstitución de ratones SCID con $CD45RB^{high}$, células $CD4^+CD25^-$ T. La administración de anticuerpo anti-CD25 *in vivo* en ratones también induce enfermedad autoinmune localizada de órgano.

El descubrimiento de la importancia de los reguladores de transcripción FoxP3 en la función de células regulatorias T $CD4^+CD25^+$ de ratón y las observaciones previas que pacientes con síndrome IPEX (desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, y herencia vinculada con X), una enfermedad inflamatoria severa similar a aquella vista en ratones deficientes en células regulatorias $CD4^+CD25^+$ (síndrome scurfy), tienen mutaciones en *FoxP3*, proporcionan una correlación directa entre un modelo de animal autoinmune, células T regulatorias de ratón, y una enfermedad autoinmune humana (Sakaguchi et al., J Immunol. 155: 1151-1164 (1995)).

El mecanismo farmacéutico de células T regulatorias no es completamente claro. $CD4^+CD25^+$ Tregs

inhiben activación de células T policlonales y específica de antígeno. La supresión está mediada por un mecanismo dependiente de contacto celular que requiere activación de CD4⁺CD25⁺ Tregs mediante TCR pero Tregs no muestra una
5 respuesta proliferativa en activación TCR o estímulo con anticuerpos mitogénicos (anérgicos) (Shevach, Nature Rev. Immunol 2: 389 (2002). Una vez estimulados, son competentes para suprimir en una forma independiente de antígeno la respuesta de células T CD4⁺ T y células T CD8⁺
10 así como inhibir la activación de célula B y su expansión clonal.

Hay datos adicionales que indican que la actividad supresora de CD4⁺CD25⁺ Tregs parcialmente también se basa en citoquinas anti-inflamatorias como TGF- β
15 (Kingsley et al., J Immunol. 168: 1080 (2002); Nakamura et al., J Exp. Med. 194: 629-644 (2001)). La significancia funcional de secreción TGF- β además está soportada por los hallazgos de que ratones deficientes en TGF- β desarrollan enfermedad autoinmune y que la administración de
20 anticuerpos neutralizantes a TGF- β abroga in vivo la prevención de autoinmunidad de actividad que induce tolerancia de células T CD4⁺ en algunos modelos.

Dentro del sub-conjunto de células T CD4⁺ al menos 2 tipos más diferentes de células con función
25 supresora pueden existir, que se inducen después de exposición a antígeno exógeno específico (denominadas "células T adaptativas o regulatorias inducibles"): células regulatorias T Tipo 1 (Tr1) y células Th3. Estos tipos de células parecen ser distinguibles de CD4⁺CD25⁺ Tregs con
30 base en sus perfiles de producción de citoquina. Sin embargo, la relación entre estos diferentes tipos no es

clara y los modos de acción se superponen.

Las células Tr1 se inducen por estímulo repetitivo de TCR en la presencia de IL-10 y se muestra que primordialmente reducen a la baja las respuestas inmunes por la producción de altos niveles de IL-10 junto con cantidades moderadas de TGF- β (Chen et al., J. Immunol. 171: 733-744 (2003)).

Las células Th3 (identificadas en un modelo de EAE después de suministro oral de antígeno) producen altas cantidades de TGF- β y cantidades variables de IL-4 y IL-10. IL-4, mismo, se mostró que un factor clave para diferenciación de células Th3, en contraste con células Tr1 que se diferencian con IL-10 (Chen et al., Science 265:1237-1240 (1994)).

La supresión de la función de células T al utilizar drogas o fármacos inmunosupresores es una estrategia terapéutica principal que se ha empleado exitosamente para tratar enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estas drogas inducen una inmunosupresión general debido a su deficiente selectividad, resultando en inhibición no solo de la función nociva del sistema inmune, sino también de útiles. Como consecuencia, pueden ocurrir varios riesgos como infección, cáncer y toxicidad de droga.

Agentes que interfieren con la función de célula T son soportes principales terapéuticos para diversas enfermedades autoinmunes.

El enfoque de utilizar agentes dirigidos a la activación de células T regulatorias para la terapia de enfermedades autoinmunes ha sido hasta el momento probado que es extremadamente difícil. La activación de Tregs por TCR utilizando el anticuerpo anti-CD3 agonista OKT-3

(Abramowicz et al, N Engl. J Med. 1992 Sep 3;327(10):736) o mediante la molécula co-estimuladora CD28 utilizando el anticuerpo anti-CD28 super-agonista TGN 1412 lleva a completo agotamiento de la población de células T regulatorias así como otras células T convencionales y la inducción sistémica y liberación de cantidades excesivas de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IFN- γ , TNF- α , IL-1 y IL-2, resultando en un síndrome relacionado a citoquina clínicamente aparente (CRS) en humanos (Suntharalingam et al, N Engl. J Med. 2006 Sep 7; 355(10):1018-28).

Después de las primeras dos a tres inyecciones de 5 mg del anticuerpo monoclonal OKT3, la mayoría de los pacientes desarrollan un síndrome de liberación de citoquina con altos niveles de factor de necrosis de tumor-alfa, interleucina-2, y gama-interferona que aparece dentro de 1-2 horas en la circulación de recipientes de trasplante de riñón. (Abramowicz et al., Transplantation. 1989 Apr; 47(4):606-8). Esto resulta en una estrecha ventana terapéutica que limita la utilidad de este anticuerpo en el tratamiento de enfermedad autoinmune.

Tratamiento con una dosis total de 5-10 mg de TGN1412 (0.1 mg de anti-CD28 por kilogramo de peso corporal), lleva a respuesta inflamatoria sistémica con falla de múltiples órganos dentro de 90 minutos después de recibir una sola dosis intravenosa de TGN 1412 (Suntharalingam et al, N Engl. J Med. 2006 Sep 7; 355(10):1018-28).

En general se conviene que células T CD4 juegan una parte principal para iniciar y mantener la autoinmunidad. De acuerdo con esto, se ha propuesto utilizar mAbs contra moléculas de superficie de células T

CD4, y en particular anti-CD4 mAbs, como agentes inmunosupresores. Aunque numerosos estudios clínicos confirman el interés potencial de este enfoque, también desarrollan varios aspectos a resolver a fin de hacer anti-
5 CD4 mAbs más adecuados para utilizar en la práctica clínica rutinaria.

Varios mecanismos diferentes de acción para CD4 mAbs se han propuesto incluyendo: (1) antagonismo de interacciones CD4-MHC II que resultan en inhibición de
10 activación de células T, (2) modulación de receptor CD4 como se determina por una disminución en expresión de superficie celular de CD4, (3) señalización parcial a través del receptor CD4 en la ausencia de entrelazamiento de receptor de células T, que puede suprimir activación de
15 célula T subsecuente y activar la muerte apoptósica de célula T CD4, (4) citotoxicidad dependiente de-complemento mediada por Fc (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que lleva a agotamiento de células T CD4, y (5) estímulo de células T regulatorias.

20 La citotoxicidad dependiente de complemento mediada por Fc (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que llevan a agotamiento de células T CD4 es el mecanismo observado principal y en especial se demuestra para anticuerpos de la sub-clase IgG1. Solo unos
25 cuantos anticuerpos CD4 se han atribuido a los otros mecanismos como TRX-1, TNX-355, IDEC-151, OKTcdr4A con solo TRX-1 que es un IgG1 (Schulze-Koops et al., J Rheumatol. 25(11): 2065-76 (1998); Mason et al., J Rheumatol. 29(2): 220-9 (2002); Choy et al., Rheumatology 39(10): 1139-46
30 (2000); Herzyk et al., Infect Immun. 69(2): 1032-43 (2001); Kon et al., Eur Respir J. 18(1): 45-52 (2001); Mourad et

al., Transplantation 65(5): 632-41 (1998); Skov et al., Arch Dermatol. 139(11): 1433-9 (2003); Jabado et al., J Immunol. 158(1): 94-103 (1997)).

Agotamiento dependiente de dosis de células T
5 CD4⁺ a dosis "altas" (múltiples ciclos con dosis > 100 mg)
y secuestro transitorio (agotamiento de vida corta) a dosis
"menores" (múltiples ciclos con dosis >10 mg), se observa
con varios anticuerpos CD4 (Mason et al., J. Rheumatol. 29
(2): 220-229 (2002); Kon et al., Eur. Respir J. 18(1):45-52
10 (2001)) and HuMax-CD4 (Skov et al., Arch Dermatol. 139(11):
1433-1439 (2003), Choy et al., Rheumatology 41 (10):1142-8
(2002)). A pesar de su actividad de de dilución, mAbs a
CD4 falló en proporcionar el beneficio clínico y eficacia
consistente en enfermedades autoinmunes investigadas, por
15 ejemplo artritis reumatoide (Strand et al., Nature Reviews
6: 75-92 (2007)). Mayor agotamiento de células T CD4⁺ en
general se considera como escenario, que puede provocar una
inmunosupresión severa.

El anticuerpo B-F5 (IgG1 murino anti-humano CD4)
20 se probó en diferentes enfermedades autoinmunes.

Una pequeña cantidad de pacientes con severa
psoriasis se ha tratado con el anticuerpo B-F5 murino y
algunos efectos positivos se describieron (Robinet et al.,
Eur J Dermatol 1996; 6: 141-6, y Robinet et al., J Am Acad
25 Dermatol 1997; 36: 582-8).

En pacientes de artritis reumatoide, los
resultados observados en una prueba controlada por placebo
con dosis diarias de B-F5 no indican una mejora
significante (Wendling et al. J Rheumatol; 25(8):1457-61,
30 1998).

En pacientes de esclerosis múltiple (MS), se

126

observaron algunos efectos positivos después de 10 días de tratamiento en pacientes con formas de remisión-relapso, algunos de los cuales todavía estarán libres de relapso al sexto mes posterior a terapia (Racadot et al., J Autoimmun, 5 6(6):771-86, 1993). Se observaron efectos similares por Rumbach et al. (Mutt Scler; 1(4):207-12, 1996).

En enfermedad de Crohn severa, no se observó mejora significativa en pacientes que reciben B-F5 por 7 días consecutivos (Canva-Delcambre et al., Aliment 10 Pharmacol Ther 10(5):721-7, 1996).

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

15 Aparece de lo anterior que un primer aspecto a resolver es la necesidad por utilizar altas dosis de mAb para obtener una mejora clínica. Esto puede resultar *inter alia* de la deficiente accesibilidad de los linfocitos a mAb en los tejidos objetivo. El uso de dosis superiores puede 20 resultar en una acción excesiva en linfocitos de sangre, induciendo efectos secundarios indeseados.

Otra desventaja de la terapia con anticuerpos monoclonales en humanos es que estos anticuerpos en general se obtienen de células de ratón, y provocan respuestas 25 anti-ratón en los recipientes humanos. Esto no solo resulta en una menor eficiencia del tratamiento y aún más de cualquier tratamiento futuro con anticuerpos monoclonales de ratón, sino también en un riesgo incrementado de anafilaxis.

30 Esta desventaja, en principio puede evitarse por el uso de anticuerpos humanizados, que se obtienen por

injerto de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo monoclonal de ratón que determina la especificidad de enlace de antígeno, en las regiones marco (FRs) de una molécula de inmunoglobulina humana. El objetivo de humanización es obtener un anticuerpo recombinante que tiene las mismas propiedades de enlace de antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón del cual se derivaron las secuencias CDR, y bastante menos inmunogénico en humanos.

En algunos casos, el sustituir CDRs del anticuerpo de ratón por las CDRs humanas en marcos humanos es suficiente para transferir las propiedades de enlace de antígeno (incluyendo no solo la especificidad, sino también la afinidad por antígeno). Sin embargo, en muchos anticuerpos, algunos residuos FR son importantes para enlace de antígeno, debido a que hacen contacto directo del antígeno en el complejo anticuerpo-antígeno, o debido a que influyen la conformación de las CDRs y de esta manera su desempeño de enlace de antígeno.

De esta manera, en la mayoría de los casos, también es necesario sustituir uno o varios residuos marco del anticuerpo de ratón por los residuos FR correspondientes humanos. Ya que el número de residuos substituidos debe ser lo más pequeño posible a fin de evitar reacciones anti-ratón, la cuestión es determinar que residuo o residuos amino ácidos son críticos para retener las propiedades de enlace de antígeno. Se han propuesto diversos métodos para pronosticar los sitios más apropiados para substitución. Aunque proporcionan principios generales que pueden ser de cierta ayuda en las primeras etapas de humanización, el resultado final varía de un

anticuerpo a otro. De esta manera, para un anticuerpo determinado, es muy difícil anticipar que substituciones proporcionan el resultado deseado.

Previamente, la humanización de B-F5 de ratón se ha intentado, y el éxito se ha logrado en producir B-F5 humanizado (a continuación referido como hB-F5) que tiene propiedades de enlace CD4 similares al ratón precursor B-F5.

De esta manera, en WO 2004/083247, el anticuerpo humanizado BT061 (B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) se ha encontrado que es útil para tratar enfermedades autoinmunes, tales como psoriasis y artritis reumatoide. Esta solicitud de patente describe composiciones para la administración parenteral, formuladas para permitir la administración de una dosis desde 0.1-10 mg, de preferencia de 1-5 mg. Regímenes de dosis previstos son 1 mg intravenoso por día de dosis y una dosis de 5 mg cada segundo día para pacientes de artritis reumatoide sobre un periodo de 10 días. De esta manera, la dosis más grande descrita es 5 mg en un tiempo y 25 mg sobre el curso de 10 días.

El estudio también se describió por Wijdenes et al., en un extracto y cartel presentado en la conferencia EULAR, junio 2005. El tratamiento de 11 pacientes que sufren de artritis reumatoide se describió. Los pacientes fueron tratados con 5 infusiones intravenosas de 5 mg de BT061 cada día salteado con tratamiento concomitante con 150 mg de Diclophenac.

El anticuerpo descrito en este estudio no se describe conveniente para utilizar a dosis superiores, y todavía es conveniente encontrar tratamientos a dosis

superiores para tratar una mayor cantidad de pacientes.

Considerando la técnica previa anterior, el objetivo de la presente invención es tratar pacientes que tienen enfermedad autoinmune que no responden aún en forma satisfactoria a tratamientos existentes. En particular, un
5 objetivo de la presente invención es encontrar tratamientos autoinmunes que pueden ser aplicados en altas dosis a pacientes a fin de mejorar la respuesta a tratamiento para pacientes que actualmente no responden.

10 De manera sorprendente, experimentos realizados por los inventores, revelaron que el anticuerpo IgG1 BT061 en contraste con otros CD4 mAbs, una vez ligado a CD4 de células objetivo ni induce ADCC, ni CDC o apoptosis.

De acuerdo con esto, la presente invención
15 proporciona composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 10 mg a
20 200 mg.

La invención además proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde
25 la composición se va a administrar a un sujeto en un dosis del agente de 5 a 60 mg/m².

Aún más, la invención proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente
30 capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis

del agente de 1 a 500 µg/kg.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células
5 T regulatorias CD4+CD25+, en donde el agente está presente en una concentración de 10 a 150 mg/ml.

En un aspecto preferido de la invención, el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado.

10 La invención también proporciona el uso de un agente como se define aquí para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedad autoinmune en donde el agente se va a administrar a un sujeto en una dosis como se define aquí. Además, la invención proporciona un agente
15 como se define aquí para utilizar en el tratamiento de enfermedad autoinmune en donde el agente se va a administrar a un sujeto en una dosis como aquí se define.

Se apreciará de las dosis anteriores que los inventores han encontrado que, de manera sorprendente, el
20 anticuerpo humanizado BT061 (B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) did?? no modula substancialmente ni induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en comparación con otros anticuerpos que interactúan con células T, por ejemplo anticuerpos anti-CD3. Además, el anticuerpo no
25 provoca agotamiento a largo plazo substancial de linfocitos CD4+.

La concentración del agente de la invención no se limita especialmente, siempre que esté presente en una concentración que sea elevada en comparación con
30 concentraciones conocidas. Sin embargo, de preferencia, la concentración del agente es desde 10 (o mayor a 10) a

150 mg/ml, de 15 a 150 mg/ml, de 15 a 100 mg/ml, de 15 (o mayor que 15) a 75 mg/ml, o de 20 a 60 mg/ml. Más preferible, la concentración del agente (es aproximadamente) cualquiera de 10 mg/ml, 12.5 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

El volumen de dosis aplicado a un sujeto que utiliza la composición no se limita especialmente siempre que suministre una dosis total elevada en comparación con dosis ya conocidas y por lo tanto es adecuado para tratar individuos que pueden beneficiarse de las altas dosis tales como, pero no limitadas a varios casos con una larga historia de la enfermedad e insuficiente respuesta a las terapias actuales. En particular, la concentración del agente dentro de los volúmenes de dosis puede variarse a fin de proporcionar las dosis requeridas, que se describen en esta solicitud.

El volumen de dosis variará dependiendo del método de administración. Se prefiere administración parenteral. Ejemplos de administración parenteral son administración intramuscular, administración intravenosa o administración subcutánea. Cuando la composición se va a administrar por infusión intravenosa, el volumen de dosis puede ser de 0.1 o 0.5 ml hasta 500 ml, de preferencia entre 15 y 25 ml, y típicamente aproximadamente 20 ml. Cuando la composición se va a administrar por inyección subcutánea o intramuscular, el volumen de dosis puede estar entre 0.1 a 3 ml, de preferencia entre 0.5 y 1.5 ml, y típicamente aproximadamente 1 ml.

Sin embargo, en algunas modalidades, la composición puede proporcionarse en forma concentrada y

diluirse a la concentración requerida para los individuos involucrados. De preferencia, en estas situaciones, la composición se proporciona en volúmenes relativamente pequeños de aproximadamente 1, 2, 3, 4 ó 5 ml. En 5 modalidades alternas, la composición se proporciona a la concentración y volumen de dosis requeridos anteriormente descritos (es decir, lista para administración). En una modalidad específica, las composiciones farmacéuticas para administración subcutánea se proporcionan en una forma 10 lista para administración, de manera tal que puedan administrarse fácilmente por personal no médico.

Como se ha mencionado previamente, no se conocía que los agentes capaces de tratar enfermedad autoinmune pudieran administrarse en las altas dosis que se conciben 15 por la presente invención. Mientras que dosis conocidas de agentes capaces de tratar enfermedad autoinmune son efectivas en algunos individuos o tipos de enfermedades, el darse cuenta que puede tolerarse con superiores dosis ha abierto el camino para un tratamiento más efectivo de 20 algunas enfermedades autoinmunes y clases de pacientes.

La invención será ilustrada a manera de ejemplo solamente, con referencia a las siguientes Figuras, en donde:

La Figura 1 muestra el efecto de BT061 en la 25 síntesis de citoquina de cultivos de sangre entera de 3 donadores sanos. Los cultivos fueron estimulados en experimentos separados con 4 diferentes tipos de activadores: (CD3 = anti-CD3 antibodies) anticuerpos CD3 = anti-CD3; LPS lipopolisacárido; PHA = fitohaemaglutinina + 30 anticuerpos anti-CD28; SEB=enterotoxina B de estafilococos + anticuerpos anti-CD28. Diferentes citoquinas se

determinó que miden efectos en diversas sub-poblaciones de leucocitos: células Treg (CD3: TGF- β , IL-10); monocitos/macrófagos (LPS: IL-10, TNF α , IL-1 β); células Th2 (PHA: IL-4, IL-5, IL-13); células Th1 (SEB: IL-2, IFN γ);

5 La Figura 2 muestra el efecto de BT061 en cultivos de sangre entera humana (donadores con artritis reumatoide) en síntesis de citoquina activada por diferentes estimulantes;

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

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

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 3) de un fragmento del plásmido que codifica la región V_H de BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está sub-rayada y la secuencia de polipéptidos correspondiente (SEQ ID No: 17) se indica abajo de la secuencia de nucleótidos;

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 4) de un fragmento del plásmido que codifica las regiones V_K de BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está sub-rayada y la secuencia de polipéptidos correspondiente (SEQ ID No: 2) se indica abajo de la secuencia de nucleótidos;

25 Las Figuras 7A y 7B respectivamente muestran la liberación de TNF α y IL-6 observada en una prueba clínica con BT061 (infusión intravenosa sencilla o inyección subcutánea) en voluntarios sanos en comparación con los niveles reportados con los anticuerpos monoclonales anti-CD3. Niveles de dosis y tiempo para recuperación se incluyen en las figuras. Resultados para TRX4 indicados en

las Figuras como "2)" reportados por Keymeulen et al., 2005 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes patients. Resultados para Teplizumab indicados en Figuras como "3)" reportados en Herold et al., 2002 N. Engl. J. Med. Type I Diabetes patients. Valores normales indicados en las Figuras como "4)" reportados en Straub et al., 2007, Athr. & Rheumat. "*" representa una sola dosis, "**)" representa una dosis acumulativa inyectada hasta que se alcanzó concentración pico.

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

15 La Figura 9 muestra una cinética de conteos celulares CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una sola dosis intravenosa de BT061. Valores promedio de 3 pacientes por grupo de dosis se muestran. Líneas punteadas indican el límite superior de (ULN) normal y el límite inferior normal (LLN).

La Figura 10 muestra una cinética de conteo celular CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con una sola dosis subcutánea de BT061. Valores promedio de 3 pacientes por grupo de dosis se muestran. Líneas punteadas indican el límite superior de normal (ULN) y el límite inferior de normal (LLN).

Figura 11 partes A a H proporcionan gráficas que muestran datos de las pruebas clínicas con pacientes de psoriasis de grupo de dosis I como se describe en el en Ejemplo 7, en donde los pacientes son tratados con una inyección intravenosa de 0.5 mg de BT061 o un placebo. Las

partes de A a H de la Figura 8 proporcionan gráficas de las calificaciones PASI de pacientes 1 a 8 del grupo de dosis I, respectivamente.

La Figura 12 partes A a H proporcionan gráficas que muestran datos de las pruebas clínicas con pacientes de psoriasis del grupo de dosis II como se describe en el Ejemplo 7, en donde los pacientes son tratados con una inyección intravenosa de 2.5 mg de BT061 o un placebo. Las partes A a H de la Figura 9 proporcionan gráficas de las calificaciones PASI de los pacientes 1 a 8 del grupo de dosis II, respectivamente.

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

La Figura 14 proporciona resultados para la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 8. La figura muestra una gráfica de barras del porcentaje de pacientes de los grupos de dosis que reciben 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg y 25 mg de BT061 subcutáneo logrando al menos una respuesta ACR20. Seis pacientes en cada grupo recibieron la dosis de anticuerpo mientras que dos pacientes recibieron un placebo.

La Figura 15A y 15B proporcionan resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 8. La Figura 15A muestra una gráfica de barras del número de articulaciones sensibles para pacientes del grupo de dosis que recibe 25 mg de

BT061 subcutáneos. La Figura 15B muestra una gráfica de barras del número de articulaciones sensibles en pacientes del mismo grupo de dosis. Seis pacientes en cada grupo recibió la dosis de anticuerpo mientras que dos recibieron un placebo.

Las Figuras 16A y 16 B proporciona resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 8. Las Figuras muestran los cambios de parámetros individuales (en %) para un paciente respondedor (Figura 16A) y un paciente no respondedor (Figura 16B) del grupo de dosis de 25 mg subcutáneos. En las Figuras "Pat's GA" y "Phy's GA" se refieren a la evaluación global del paciente y evaluación global del médico, respectivamente. El término "PA de dolor" se refiere a la evaluación del dolor del paciente.

Las Figuras 17A y 17B proporcionan adicionales resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 8. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis subcutáneas de 1.25 mg (Figura 17A) y del grupo de dosis subcutáneas de 6.25 mg (Figura 17B).

Las Figuras 18A y 18B proporcionan adicionales resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 8. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis subcutáneas de 50 mg (Figura 18A) y del grupo de dosis intravenosas de 6.25 mg (Figura 18B).

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

humanizada del B-F5 (es decir BT061).

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

La invención ahora se describirá con más detalles.

Los agentes que son adecuados para utilizar en la presente invención son aquellos que son capaces de activar células T CD4+CD25+ regulatorias. El agente puede ser un polipéptido, una proteína o un anticuerpo. Cuando el agente es un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. De preferencia, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD4 monoclonal. El anticuerpo también de preferencia puede ser un anticuerpo IgG1 y puede ser un anticuerpo IgG1 sin modificar.

En un aspecto preferido de la invención el agente no provoca un aumento substancial al nivel de citoquinas pro-inflamatorias en el plasma de sangre en el sujeto después de administración en comparación con anticuerpos anti-CD3. En particular, los niveles de IFN- , TNF- , IL-6 y/o IL-2 después de administración del agente no se elevan substancialmente en comparación con niveles de plasma medidos en sujetos sanos (ver Tabla A1). Específicamente, si el ULN para una citoquina específica dada en la Tabla A1 se toma como X, entonces dentro de 96 horas después de administración del agente de la invención puede haber menos de un incremento de 20 veces en X. De preferencia, puede haber menos de un incremento de 10 veces en X. Más preferiblemente, estos niveles son durante el periodo de 10

minutos después del inicio de administración a 96 horas después de completar la administración.

Es posible que en pacientes autoinmunes, los niveles de citoquina antes de administración del agente ya son superiores a aquellos observados en sujetos sanos (ULN dado en la Tabla A1) por ejemplo debido a un estado de activación modificado de células inmunes en comparación con el estado de activación de las células en sujetos sanos. En aquellos casos, la concentración para una citoquina específica directamente antes de administración del agente se toma como X y dentro de 96 horas después administración del agente de la invención puede haber menos de un aumento de 20 veces en X. De preferencia puede haber menos de un incremento de 10 veces en X. Más preferiblemente estos niveles son durante el periodo de 10 minutos después del inicio de administración a 96 horas después de completar la administración.

Citoquina	ULN (pg/mL)
Il-2	19.4
IL-6	4.4
TNF-alfa	2.8
IFN-gama	3.8

Tabla A1: Los niveles de citoquina medidos en plasma de voluntarios sanos. El ULN (límite superior de normal) se calcula con base en valores promedio medidos en 39 sujetos individuales + 2 x desviación estándar.

En un aspecto preferido adicional de la invención el agente no provoca una disminución de larga duración substancial en el conteo celular de linfocitos CD4+ en el plasma sanguíneo del sujeto. Específicamente, dentro del

periodo de 72 a 96 horas después de administración el conteo celular de linfocitos CD4+ en el plasma sanguíneo del sujeto puede estar sobre 250 células/ μ l (o al menos 250 células/ μ l).

5 De preferencia, los efectos de citoquina y linfocito CD4+ descritos anteriormente se ven en al menos 80% de los pacientes tratados.

Para evitar impacto negativo en el sistema inmune, por ejemplo en la disminución en el conteo de
10 células de linfocitos o inducción de liberación de citoquina, se conoce en la técnica el utilizar anticuerpos (en especial anticuerpos de interacción de célula T) de la subclase IgG2, IgG3 o IgG4 debido a que los anticuerpos de la subclase IgG1 exhiben superiores interacciones de
15 receptor Fc. También se conoce en la técnica el modificar anticuerpos (en especial anticuerpos que interactúan con células T) por mutación Fc, desglicosilación, glicomodificación o glicoingeniería para reducir interacciones de receptor Fc.

20 En los experimentos aquí descritos, los presentes inventores han encontrado que evitar anticuerpos de la subclase IgG1 y modificaciones no es necesario para el agente de la presente invención. En particular, datos presentados en esta solicitud de patente indican que el
25 agente de la presente invención no exhibe agotamiento de células CD4+ substancial y de larga duración o induce liberación de citoquina substancial en comparación con los anticuerpos anti-CD3.

De acuerdo con esto, en un aspecto preferido de
30 la invención, el agente es un anticuerpo IgG1 no modificado, es decir un anticuerpo que no incluye una

mutación Fc, y no ha sido sometido a desglicosilación, glicomodificación o glicoingeniería para reducir interacciones de receptor Fc o un fragmento o derivado del mismo.

5 Los anticuerpos que son más convenientes para utilizar en la presente invención son anticuerpos anti CD4 humanizados o sus fragmentos o derivados, que son capaces de activar células T regulatorias CD4+CD25+. Ejemplos de anticuerpos que son capaces de activar células T
10 regulatorias CD4+CD25+ se discuten por Becker et al., (European Journal of Immunology (2007), Vol. 37: pages 1217-1223).

En general, el anticuerpo empleado en la invención además comprende una región constante humana
15 (Fc). Esta región constante puede seleccionarse entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Regiones constantes preferidas se eligen entre dominios constantes de IgG, en
20 particular IgG1.

La presente invención también incluye cualquier fragmento del anticuerpo que comprende sus regiones V. Esto comprende en particular los fragmentos Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv y scFv.

25 En un aspecto particularmente preferido de la presente invención el anticuerpo es anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado, derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón. Un ejemplo de este anticuerpo es el anticuerpo BT061.

30 El anticuerpo BT061, sus fragmentos y derivados.

El anticuerpo humanizado BT061 (hB-F5) se deriva

de B-F5 mAb de ratón, y tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de polipéptidos:

- dominio V cadena H:
- EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA

5 PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCS
AS YYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V cadena L:
- DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ

KPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWT
10 FG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 2).

Derivados de este anticuerpo también son adecuados para utilizar en la presente invención. Derivados incluyen aquellos con dominios V definidos por las secuencias de polipéptidos que tienen al menos 80%, de
15 preferencia al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID No: 2.

Anticuerpos particularmente preferidos son aquellos que comprenden las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) del B-F5 mAb de ratón, y recibe la
20 capacidad hB-F5 para activar células regulatorias CD4+CD25+. La ubicación de las CDRs dentro de los dominios VH y VK se muestran en las Figuras 19 y 20. Estos anticuerpos opcionalmente pueden tener variaciones en la secuencia de las CDRs que no afectan substancialmente la
25 especificidad y/o afinidad de enlace.

En general, el anticuerpo hB-F5 empleado en la invención además comprende una región constante humana (Fc). Como se indicó anteriormente, esta región constante puede seleccionarse entre los dominios constantes de
30 cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2,

IgG3 y IgG4. Regiones constantes preferidas se eligen entre dominios constantes de IgG, en particular IgG1.

La presente invención también incluye cualquier fragmento de un anticuerpo BT061 que comprende sus regiones
 5 V. Esto comprende en particular los fragmentos Fab, Fab', F(ab)'2, Fv y scFv.

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

15 La invención también utiliza casetes de expresión en donde un polinucleótido como se describe anteriormente se enlaza a las secuencias del control apropiadas permitiendo la regulación de sus transcripción y traducción en una célula hospedera selecta, y vectores recombinantes
 20 que comprenden un polinucleótido o un casete de expresión de la invención.

Estas construcciones de ADN recombinante pueden obtenerse e introducirse en células hospederas por la técnica bien conocida de ADN recombinante e ingeniería
 25 genética.

La invención también utiliza una célula hospedera, transformada por un polinucleótido de la invención. Células hospederas útiles dentro del marco de la presente invención pueden ser células procarióticas o
 30 eucarióticas. Entre células eucarióticas convenientes, se mencionarán a manera de ejemplo, células de plantas,

células de levaduras tales como *Saccharomyces*, células de insectos tales como *Drosophila*, o *Spodoptera*, y células de mamífero tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

La construcción de vectores de expresión
5 empleados en la invención, y la transformación de células hospederas, puede hacerse por las técnicas estándar de biología molecular.

El anticuerpo BT061 (hB-F5) empleado en la invención, puede obtenerse al cultivar una célula hospedera
10 que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al anticuerpo, bajo condiciones adecuadas para su expresión, y recuperar el anticuerpo del cultivo de célula hospedera.

Construcción de B-F5 humanizado

15 *Diseño de regiones V_H y V_K B-F5 humanizadas*

Secuencias de ADN que codifican las regiones V_H y V_K B-F5 de ratón se muestran respectivamente en la Figura 3 y la Figura 4 y bajo identificadores de secuencia SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6. V_H y V_K humanas en las cuales las CDRs
20 de ratón se injertan, se seleccionaron al buscar bases de datos para V_H humana más semejante a V_H y V_K B-F5 de ratón original. La región V_H de un anticuerpo humano (M26; Número de Acceso A36006) tuvo la más alta homología con V_H de B-F5. La región V_K de otro anticuerpo humano (FK-001;
25 NAKATANI et al., *Biotechnology*, 7 (1989), 805-810)) tuvo la más alta homología con V_K de B-F5.

Dos tipos de V_K difieren entre ellas en que el 4° residuo fue Leucina o Metionina se construyeron y diseñaron como L4L y L4M. Dos tipos de V_H que difieren entre ellas en
30 que el 37° residuo amino ácido fue Leucina o Valina, se construyeron y diseñaron como H37L y H37V. El alineamiento

de las secuencias de polipéptidos de B-F5, FK-001, L4L, y L4M se muestra en la Figura 19. El alineamiento de las secuencias de polipéptidos de B-F5, M26, H37L, y H37V se muestra en la Figura 20. Los residuos FR previamente reportados como importantes para el empaque de CDRs (Chothia et al., Nature 342(1989), 877; Foote et al., J. Mol. Biol., 224(1992), 487), están encasillados.

Al combinar estas V_H y V_K , se diseñan 4 versiones de regiones V.

10 *Expresión de B-F5 humanizado*

Las etapas subsecuentes para la producción de B-F5 humanizado fueron las mismas que aquellas descritas en la patente de los E.U.A. Número 5,886,152 para B-B10 humanizado.

15 Brevemente, plásmidos de expresión para la cadena H (región humanizada V_H fusionada a la región constante de una cadena humana γ -1 (TAKAHASHI et al., Cell, 29 (1982), 671-679)) y la cadena L (región humanizada V_K fusionada a la región constante de la cadena K FK-001) de B-F5 humanizado se construyeron por separado. En estos plásmidos, la expresión de B-F5 humanizado es desplazada por el promotor/mejorador del gen de IgM monoclonal humano FK-001. Las Figuras 5 y 6 respectivamente muestran los fragmentos de los plásmidos que codifican las regiones V_H y V_K de BF-5 humanizado. Las secuencias que codifican la región V están subrayadas y las secuencias de polipéptidos correspondientes, se indican bajo la secuencia de nucleótidos. Ambos plásmidos y pSV2neo se introdujeron simultáneamente en el mieloma de ratón Sp2/0 (ATCC CRL-25 1581) utilizando Lipofectinⁿⁱ. Transfectomas que producen IgG humano se seleccionaron por ELISA, utilizando un

anticuerpo anti-humano IgG (cadena y) y un anticuerpo de cadena IgK anti-humano.

Caracterización de las diferentes versiones de B-F5 humanizado.

5 Estimación de actividad de enlace CD4.

Sobrenadantes de cultivo de transfectomas que producen las cuatro versiones de hB-F5, se recolectaron y concentraron. Los diferentes anticuerpos se purificaron de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad utilizando proteína A Sepharose y estimaron por su actividad de enlace CD4 al medir, mediante ELISA competitivo, sus actividades inhibitorias contra el enlace de mB-F5 biotinilado a CD4 soluble revestido en placas de microtitulación. El tiempo de incubación es de 2 horas por 37°C y durante la noche por 4°C.

Las actividades de enlace relativas de hB-F5s (actividad de enlace de mB-F5 se toman como 100%) se ilustran en la Tabla A siguiente:

Tabla A

20

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

H37V/L4M	37	10
	4	10-20
	37	10

De los resultados mostrados en la Tabla A, parece que el 37° residuo de leucina es crítico para mantener la actividad de enlace de CD4 de hB-F5, debido a que la actividad de enlace CD4 es varias veces reducida por conversión de ³⁷Leu a ³⁷Val. Por el contrario, el 4° residuo de VK se encuentra que no es tan importante para la actividad de enlace de CD4. Como la diferencia estructural entre ³⁷Leu y ³⁷Val de V_H no se demuestra claramente por modelado molecular, la superioridad de H37L a H37V en la actividad de enlace CD4 fue inesperada.

H37L/L4L y H37L/L4M se seleccionaron para evaluación.

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

Las actividades biológicas in vitro de B-F5 de ratón y B-F5s humanizado (H37L/L4M IgG1 y H37L/L4L IgG 1) se evaluaron. B-F5s humanizados de tipo IgG2 (H37L/L4M IgG2 y H37L/L4L IgG2) también se probaron.

Las actividades biológicas in vitro de mB-F5 cuatro tipos de hB-F5s se evaluaron utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donadores sanos. PBMCs se activaron por ConA (2.5 pg/ml, 3 días) o PPD (10 pg/ml, 4 días) en la presencia de murino o hB-F5s, y se supervisaron por sus respuestas proliferativas por incorporación de 3H-timidina.

Murinos y hB-F5s pudieron inhibir moderadamente

la proliferación inducida por ConA, pero las actividades variaron de anticuerpo en anticuerpo y/o de donador a donador. También murinos y hB-F5s fueron capaces de inhibir proliferación de PBMC específica de Ag inducida por PPD.

5 El tipo IgG1 de hB-F5 inhibe la proliferación inducida por PPD más efectivamente (tan alta como inhibición al 70%) que mB-F5. El tipo IgG1 parece ser más efectivo que el tipo IgG2 del cual la actividad inhibitoria fue casi la misma que mB-F5. Para el tipo IgG1, H37L/L4M
10 fue más efectivo que H37L/L4L. El tipo IgG2 de H37L/L4M y H37L/L4L tuvo casi las mismas actividades inhibitorias. En breve, las actividades inhibitorias de B-F5s contra proliferación PBMC inducida por PPD fueron como sigue:
H37L/L4M IgG1 > H37L/L4L IgG1 > H37L/L4M IgG2 = H37L/L4L
15 IgG2 = mB-F5.

Considerando la eficacia de la actividad biológica *in vitro* y el número menor de aminoácidos de ratón, H37L/L4M IgG1 se eligió para mayor evaluación y es este anticuerpo que se nombra BT061 y se emplea para
20 demostrar la presente invención en los ejemplos que se proporcionan en esta aplicación.

Composición y usos

Como se ha mencionado, la composición farmacéutica y medicamentos empleados en la presente
25 invención, de preferencia son capaces de tratar una enfermedad autoinmune en pacientes que se benefician de dosis superiores. Estos pacientes incluyen pero no están limitados a casos severos con una historia prolongada de la enfermedad.

30 En un aspecto, la presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado o

su fragmento o derivado, en la fabricación de un medicamento efectivo contra una enfermedad autoinmune, en donde el anticuerpo humanizado es capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, y en donde el medicamento
5 comprende el anticuerpo en una concentración desde 10 a 150 mg/ml, de preferencia 15 a 75 mg/ml, más preferiblemente 20 a 60 mg/ml.

La invención además proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado en
10 la fabricación de un medicamento efectivo contra una enfermedad autoinmune, en donde el anticuerpo humanizado es capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, y en donde el medicamento se administra a un sujeto en una sola dosis o una pluralidad de dosis en una cantidad del
15 anticuerpo desde 10 a 200 mg por dosis.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar las células T regulatorias
20 CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 10 mg a 100 mg, 10 mg a 80 mg, 15 mg a 80 mg, 20 mg a 75 mg, de preferencia desde más de 20 mg a 60 mg y más preferiblemente 25 mg a 60 mg.

En un aspecto de la invención, el sujeto va a
25 recibir una pluralidad de dosis. En estas situaciones, es conveniente que la dosis sobre un período de 10 días sea mayor a 25 mg pero menor que o igual a 200 mg, más preferiblemente entre 28 mg y 100 mg, y más preferible entre 30 mg y 100 mg. Además, la dosis sobre un periodo de
30 5 días de preferencia es mayor que 15 mg pero menor que o igual a 100 mg, más preferible entre 18 mg y 100 mg y más

preferiblemente entre 20 mg y 100 mg. En este aspecto de la invención, se prefiere particularmente que las dosis se administren en forma subcutánea.

La dosis también puede calcularse en base al área superficial del cuerpo (BSA = Body Surface Área) del sujeto. El área superficial del cuerpo (BSA) puede calcularse de acuerdo con cualquier método conocido. Ejemplos de métodos de cálculo de BSA son como sigue:

Fórmula Mosteller: $(BSA \text{ (m}^2\text{)}) = ([\text{Altura(cm)} \times \text{Peso(kg)}] / 3600)^{1/2}$

(Mosteller RD: Simplified Calculation of Body Surface Area. N Engl J Med 1987 Oct 22;317(17):1098)

Fórmula de DuBois y DuBois: $BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0.20247 \times \text{Altura(m)}^{0.725} \times \text{Peso(kg)}^{0.425}$

(DuBois D; DuBois EF: A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Int Med 1916 17:863-71.

Fórmula de Haycock: $BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0.024265 \times \text{Altura(cm)}^{0.3964} \times \text{Peso(kg)}^{0.5378}$

(Haycock G.B., Schwartz G.J., Wisotsky D.H. Geometric method for measuring body surface area: A height weight formula validated in infants, children and adults. The Journal of Pediatrics 1978 93:1:62-66)

Fórmula de Gehan y George: $BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0.0235 \times \text{Altura(cm)}^{0.42246} \times \text{Peso(kg)}^{0.51456}$

(Gehan EA, George SL, Estimation of human body surface area from height and weight. Cancer Chemother Rep 1970 54:225-35)

Fórmula de Boyd: $BSA \text{ (m}^2\text{)} = 0.0003207 \times \text{Altura(cm)}^{0.3} \times \text{Peso(gramos)}^{(0.7285 - (0.0188 \times \text{LOG(gramos)}))}$

De acuerdo con la invención, la dosis del agente

al sujeto es de 5 a 60 mg/m² de área superficial corporal del paciente, de preferencia de 6 a 50 mg/m², y más preferiblemente 8 a 40 mg/m².

Además, la dosis puede calcularse con base en el peso corporal del sujeto. De acuerdo con la invención, la dosis del agente al sujeto es de 0.1 a 2 mg/kg, de preferencia 0.15 a 1.5 mg/kg, y más preferiblemente 0.2 a 1 mg/kg.

En estos aspectos de la invención, cuando la dosis se basa en el área superficial del cuerpo o el peso corporal del sujeto, se prefiere que las dosis sobre un período de 10 días estén entre 10 mg/m² y 120 mg/m², más preferible entre 16 mg/m² y 120 mg/m², o entre 0.2 mg/kg y 4 mg/kg, más preferible entre 0.4 mg/kg y 4 mg/kg. En particular se prefiere que las dosis se administren subcutáneamente.

La frecuencia de administración no está limitada especialmente, siempre que no interfiera con la efectividad del tratamiento. En la invención, se prefiere que la pluralidad de dosis se administren en al menos una de las siguientes bases: diaria, cada día salteado, semanal, cada 4 semanas, cada 6 semanas, cada 12 semanas, cada 24 semanas, cada mes calendario, cada 3 meses calendario, cada 6 veces calendario, o anualmente. De esta manera, las dosis pueden ser separadas por al menos un día o en forma alterna en al menos una semana, por al menos un mes, por al menos 3 meses, por al menos 6 meses o por al menos un año (lo que significa que las dosis se toman al menos cada día, cada semana, cada mes, cada 6 meses o cada año). En una alternativa adicional, la pluralidad de dosis se toman de cada 1 a 31 días o cada 1-12 meses.

La duración del tratamiento no está limitada especialmente, y en forma típica en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, el tratamiento procede de forma indefinida o hasta que los síntomas se reducen a un nivel
5 manejable para el paciente. En general, la dosis se administra al sujeto por al menos 1 mes.

La invención también proporciona un equipo para uso como se definió anteriormente, en donde el equipo comprende una pluralidad de dosis de medicamento como se
10 definió anteriormente para administración simultánea, secuencial o separada a un sujeto.

También se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, este método comprende administrar una composición farmacéutica como se
15 definió anteriormente, a un sujeto.

También se proporciona un método para tratamiento de una enfermedad autoinmune, este método comprende administrar un medicamento a un sujeto, en donde el medicamento comprende un agente capaz de activar células T
20 regulatorias CD4+CD25+ y en donde el medicamento se administra al sujeto en una cantidad como se describió anteriormente.

Se prefiere que el agente sea un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado, derivado del
25 anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón.

Como ya se ha mencionado, la composición farmacéutica y los medicamentos empleados en la presente invención, de preferencia son capaces de tratar una enfermedad autoinmune en pacientes que se benefician de
30 dosis superiores. Estos pacientes incluyen pero no están limitados a casos severos con una larga historia de la

152
enfermedad.

De preferencia, la enfermedad autoinmune se elige de psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, lupus sistémico eritematoso, colitis ulcerativa, dermatitis atópica, miocarditis y enfermedades relacionadas a transplante tales como injerto-contrahospedero, reacciones de hospedero-
10 contra-injerto, o en general aspectos de tolerancia de órganos.

En un aspecto particularmente preferido de la invención, las composiciones farmacéuticas son para tratar la enfermedad autoinmune psoriasis. En particular, estas
15 composiciones farmacéuticas se van a administrar en forma intravenosa o subcutánea en las dosis aquí especificadas.

La psoriasis es un desorden que provoca lesiones o placas psoriásicas en la piel de quien la padece.

La Calificación del Área de psoriasis e Índice de Severidad (PASI = Psoriasis Area and Severity Index) se
20 emplea comúnmente para evaluar y registrar el nivel de psoriasis exhibido por quienes la sufren. La calificación PASI involucra la evaluación de eritema (E), infiltración (I), y descamación (D), y participación del área de
25 superficial corporal (A) sobre 4 regiones del cuerpo (cabeza (h), tronco (t), extremidades superiores (u) e inferiores (l)). La Tabla B siguiente muestra cómo funciona el sistema de calificación.

TABLA B - Sistema de Calificación PASI

30

Grado de Valor dado		Superficie Valor dado	
---------------------	--	-----------------------	--

severidad (por región del cuerpo)	
Sin síntomas	0
Ligero	1
Moderado	2
Marcado	3
Muy marcado	4

involucrada (por región del cuerpo)	
< 10%	1
10-29%	2
30-49%	3
50-69%	4
70-89%	5
90-100%	6

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

$$\text{PASI} = 0.1(E_h + I_h + D_h)A_h + 0.2(E_u + I_u + D_u)A_u + 0.3(E_t + I_t + D_t)A_t + 0.4(E_l + I_l + D_l)A_l$$

La calificación PASI está en el intervalo de 0-72. Una calificación de 0 significa que no hay psoriasis, mientras que una calificación de 72 representa la psoriasis más severa.

En una modalidad preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al menos 40%, de preferencia al menos 50% de mejora en la calificación PASI del paciente. De preferencia, el sujeto tiene una calificación PASI de al menos 10 antes de tratamiento. Estos efectos pueden verse al menos 56 días después de

administración, más preferiblemente al menos 75 días después de administración. En particular, estos efectos pueden verse en al menos 80% de los pacientes tratados.

En un aspecto adicional de la presente invención,
5 las composiciones farmacéuticas son para tratar artritis reumatoide.

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que provoca inflamación crónica de las articulaciones y tejidos circundantes y también puede
10 afectar a otros tejidos y órganos del cuerpo.

La mejora en artritis reumatoide exhibida por un paciente tratado se estima en forma común utilizando el conjunto de parámetros núcleo del Colegio Americano de Reumatología (ACR = American College of Rheumatology)
15 (Felson et al., Arthritis & Rheumatism, 1995, 38(6), 727-735). Este sistema define un valor de ACR 20 como una mejora del 20% en recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas y 20% de mejora en 3 de 5 medidas del conjunto núcleo ACR restante: evaluaciones globales de paciente y
20 médico, dolor, incapacidad y un reactivo de fase aguda, tal como proteína reactiva C (CRP = C-Reactive Protein).

En particular, las composiciones farmacéuticas para tratar artritis reumatoide de preferencia se van a administrar en forma intramuscular o subcutánea en las
25 dosis aquí especificadas.

El presente tratamiento de artritis incluye drogas o fármacos de primer línea para controlar dolor e inflamación clasificadas como drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs= Non Steroidal Anti Inflammatory
30 Drugs), por ejemplo, aspirina, ibuprofen, naproxen, etc.. Tratamiento secundario de artritis incluye corticosteroides

(por ejemplo prednisona y dexametasona), drogas antireumáticas de acción lenta (SAARDs = Slow Acting Antirheumatic Drugs) o drogas anti-reumáticas que modifican la enfermedad (DMARDs = Disease Modifying Antirheumatic Drugs), por ejemplo, metotrexato, penicilina, ciclofosfamida, sales de oro, azotioquina, leflunomida, etc.

Corticosteroides, las versiones sintéticas de la hormona cortisona del cuerpo, se emplean para inhibir el avance de RA (por ejemplo prednisona y dexametasona).

Otro grupo de fármacos denominados modificadores de respuesta biológica (BRMs = Biological Response Modifiers) también se desarrollaron para el tratamiento de RA incluyendo antagonistas a TNF-alfa (adalimumab, infliximab, etanercept) que funcionan a través de enlace a su receptor o directo a enlace a la proteína TNF-alfa.

En una modalidad de este aspecto de la invención, las composiciones se van a administrar en combinación con fármacos actualmente empleados para tratar artritis reumatoide. En particular, las composiciones se van a administrar con uno de los fármacos anteriormente mencionados, de preferencia metotrexato.

Fármacos conocidos tales como metotrexato y la composición farmacéutica de la presente invención, pueden administrarse en forma simultánea, secuencial o separada.

La invención ahora se describirá adicionalmente en relación a las siguientes modalidades específicas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - Investigación de las capacidades inmuno-moduladoras de BT061 respecto a proliferación de

células T.

Método

Cultivos de sangre entera se realizaron con sangre periférica recientemente extraída. Brevemente, utilizando agujas 19G se recolectó sangre de tres voluntarios sanos en jeringas heparinizadas. La sangre fue sembrada en placas de cultivo de 96 pozos no más tarde que 60 minutos después de donación.

El anticuerpo empleado en la invención (BT061, lote 40588, o lote 70A0013B) se agregó a los cultivos antes de estímulo de los leucocitos a 5 diferentes concentraciones (ver a continuación "Sustancias de prueba"). Se deja que las células interactúen con el anticuerpo por 90 min a 37 grados C, CO₂ al 5% en atmósfera humidificada, después se agregaron cuatro diferentes estimulantes a cultivos separados:

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

Todos los cultivos de sangre entera se incubaron por 24 horas a 37 grados C, CO₂ al 5% (atmósfera humidificada). Después, los sobrenadantes de cultivo se recolectaron para la determinación de los puntos extremo de citoquina, excepto por cultivos estimulados con PHA/antiCD28, que se incubaron por 48 horas a fin de

obtener un estímulo suficiente de células Th2.

Los resultados se establecen en la Figura 1.

Resultados

BT061 no exhibió efecto significativo en las actividades principales de monocitos/macrófagos y en Th1 así como actividades Th2 en cultivos de sangre entera de voluntarios sanos. Hubo un efecto dependiente de concentración en células Treg (demostrado como un incremento en liberación de TGF-beta).

En particular, los resultados confirman que:

- No hay modulación de la citoquina inflamatoria IL-2 a concentraciones de hasta 50 µg/ml correspondiente a aplicación de altas dosis de hasta 150 mg en pacientes
- No hay inducción de la citoquina inflamatoria IFN-gamma a concentraciones de hasta 50 µg/ml correspondientes a aplicación de altas dosis de hasta 150 mg en pacientes
- No hay modulación de las citoquinas Th1/Th2 a concentraciones de hasta 50 µg/ml correspondientes a aplicación a altas dosis en pacientes
- Solo regulación a la alta muy esporádica de IL-6 por un incremento marginal, las implicaciones de los cuales se discuten en forma controversial
- Incremento en la liberación de TGF-beta (células Treg)
- Sin efecto significativo en las mayores actividades regulatorias de monocitos/macrófagos y actividades Th1 y Th2.

EJEMPLO 2 - Prueba de BT061 por su influencia en PBMCs humanos cultivadas cebadas para una respuesta de

toxoides anti-tétano y ensayo de citoquina

Método

Ensayo de proliferación

PBMC recientemente aisladas se cultivaron en
5 placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos en un
volumen de 200 μ l/pozo (4×10^5 células/pozo). El ítem de
prueba (Anti CD4 AK BT061) se empleó en las concentraciones
de 20 μ g/ml, 4 μ g/ml y 0.8 μ g/ml (adicionalmente 40 μ g/ml
dentro de la pre-prueba); Toxoides de Tétanos se emplea en
10 concentraciones de 25 μ g/ml, 5 μ g/ml y 1 μ g/ml. Para
control negativo se tomó medio de cultivo celular. Todos
los cultivos se dispusieron como triplicados.

Para el estímulo con A, se empleó una
concentración de 2.5 μ g/ml y un volumen de 200 μ l/pozo. La
15 PBMC se ajustó a una densidad de 1×10^6 /ml y surtió en un
volumen de 100 μ l por pozo.

Al final del periodo de cultivo, se detectó
proliferación celular al agregar 0.4 μ Ci de 3H timidina por
pozo por dieciséis horas. Al final del periodo de cultivo,
20 las células se desprendieron de la superficie utilizando
solución EDTA y recolectaron en filtros de fibra de vidrio
utilizando un recolector de células scatron. La cantidad
de radioactividad incorporada en ADN en cada pozo se midió
en un contador de centelleo y es proporcional al número de
25 células proliferantes, que a su vez es una función del
número de leucocitos que se estimulan para entrar a la fase
S del ciclo celular. El parámetro de lectura fue recuentos
por minuto (cpm) y el índice de estímulo (SI = stimulation
index) por cada concentración definido como $\text{cpm}_{\text{compound}} /$
30 $\text{cpm}_{\text{blank}}$.

Ensayos de Citoquina

Todas las citoquinas se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo utilizando equipos de ELISA comerciales, de acuerdo con instrucciones respectivas de los fabricantes. Los reactivos empleados se establecen en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Sustancia	Fuente	código	Lote
Equipo IFN- γ BD		555142	MF31099
OptEIA Humano Biosciences			
Equipo IL-1 Bender		BMS243/2MST	n.a.
ELISA Humano			
Equipo IL-4 BD		555194	MF10142
OptEIA Humano Biosciences			
Equipo IL-5 BD		555202	MF31662
OptEIA Humano Biosciences			
Equipo IL-6 BD		555220	MF25815
OptEIA Humano Biosciences			
Equipo IL-10 BD		555157	MF24968
OptEIA Humano Biosciences			
Equipo TGF- β BD		559119	47704
OptEIA Humano Biosciences			
Equipo TNF- α BD		555212	MF31447
OptEIA Humano Biosciences			

* material adicional, requerido para ELISA de Interleuquina-1

Niveles de interleuquina (IL)-1 en sobrenadantes de cultivo se determinaron utilizando el equipo de prueba human IL-1 ELISA Set A (Bender) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El intervalo de la prueba, predeterminado por la norma suministrada con el equipo, se

especificó a 1.3 a 130 pg/ml para muestras sin diluir.

Los niveles IL-4, 5, 6 y 10 en sobrenadantes de cultivo así como factor de crecimiento de transformación (TGF = transforming growth factor) β 1 y factor de necrosis de tumor (TNF = tumour necrosis factor) α , se determinaron utilizando el equipo de prueba OptEIA (BD biosciences) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El intervalo de las pruebas predeterminado por las normas suministradas con los equipos se especificó a 3.8 a 330 pg/ml para IFN- γ , 6,3 a 616 pg/ml (para IL-4, 5, 10 y TNF), midiendo muestras sin diluir y 7.6 a 660 pg/ml para IL-6 utilizando diluciones dobles de las muestras.

Dos determinaciones de citoquina (para cultivos de monocito) u ocho (para cultivos PBMC) por ELISA, cada una de micro-cultivos independientes, se incluyeron en el cálculo de desviación estándar y promedio. Títulos sobre el intervalo superior de la prueba (por ejemplo 616 pg/ml en el caso de TNF) se ajustaron a este valor para cálculo. El intervalo inferior de la prueba se substrajo de cada valor promedio antes de cálculo.

Resultados

BT061 (también denominado B-F5 humanizado, o simplemente hB-F5) es capaz de suprimir en forma dependiente de dosis, la proliferación de célula T específica de toxoide-tétanos; no ha habido efecto en el número total de células T. Supresión general de liberación de citoquina se ha demostrado.

La Tabla 2 siguiente muestra la influencia del anti CD4 mAb BT061 en un ensayo de proliferación de células T específico de toxoide tétanos medido en triplicado.

Se exhiben los promedios y SD de la incorporación

³H-Tdr, medido en triplicado así como el índice de estímulo (SI, definido como $\text{cpm}_{\text{compound}} / \text{cpm}_{\text{nil}}$) para cada concentración y el nivel de significancia en la prueba t de dos lados no apareada contra el medio de control (n.s.: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Tabla 2

anti CD4 (BT061)	Toxoide Tétano			
	25	5	1	
20 µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	Nulo
Promedio (cpm)	5123	2426	2589	456
SD (cpm)	597	989	1069	363
Promedio (SI)	11.23	5.32	5.67	1.00
SD (SI)	10.24	6.40	6.85	1.59
Prueba-t (compuesto con- tra nulo) p=	0.000	0.032	0.031	
	***	*	*	
	25	5	1	
4 µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	Nulo
Promedio (cpm)	6591	5005	2957	358
SD (cpm)	468	518	1333	57
Promedio (SI)	18.39	13.97	8.25	1.00
SD (SI)	4.21	3.65	5.02	0.32
Prueba-t (compuesto con- tra nulo) p=	0.000	0.000	0.028	
	***	***	*	
	25	5	1	
0.8 µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	Nulo
Promedio (cpm)	8787	6748	3902	414

SD (cpm)	1886	763	218	12
Promedio (SI)	21.24	16.31	9.43	1.00
SD (SI)	5.18	2.32	0.80	0.06
Prueba-t (compuesto contra nulo) p=	0.002	0.000	0.000	
Nulo	25 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	Nulo
Promedio (cpm)	13783	10244	6970	650
SD (cpm)	1826	758	1351	95
Promedio (SI)	21.22	15.77	10.73	1.00
SD (SI)	5.91	3.47	3.65	0.29
Prueba-t (compuesto contra nulo) p=	0.000	0.000	0.001	
	***	***	**	
Viab-ctr	ConA	Nulo		
Promedio (cpm)	94473	404		
SD (cpm)	4200	239		
Promedio (SI)	233.94	1.00		
SD (SI)	148.86	1.18		
Prueba-t (compuesto contra nulo) p=	0.000			

Tabla 3

Esta tabla muestra la influencia de anti CD 4 mAb BT061 en la producción de citoquina de cultivos PBMC de 5 toxoide-tétano. Promedio y SD de ocho micro cultivos

163

individuales se dan.

BT061 µg/ml	Tox. Tet. µg/ml	IL-1 pg/ml		IL-4 pg/ml		IL-5 pg/ml		IL-6 pg/ml	
		Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
20	25	0.0	0.0	0.0	0.0	26.3	10.1	141.8	16.9
4	25	0.0	0.0	0.0	0.0	53.0	20.4	143.3	40.3
0.8	25	0.0	0.0	0.0	0.0	83.7	41.8	144.2	15.2
0	25	0.1	0.2	0.2	0.6	150.1	59.5	133.3	13.5
25	0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	124.8	16.9
0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	123.7	14.5

Tabla 3 (continúa)

BT061 µg/ml	IL-10 pg/ml		IFN γ pg/ml		TGF β1 pg/ml		TNF α pg/ml	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
20	22.9	4.5	0.9	1.6	35.5	46.1	2.2	3.1
4	20.9	5.3	3.3	3.6	15.9	23.8	2.1	2.2
0.8	21.4	4.1	17.9	24.1	14.3	27.1	5.5	4.0
0	27.2	5.9	41.0	34.8	12.4	27.6	8.5	5.5
25	8.7	2.5	0.0	0.0	8.8	18.4	0.0	0.0
0	6.7	1.9	0.0	0.0	5.4	13.1	0.0	0.0

Tabla 4

Esta tabla muestra la influencia de anti CD4 mAb BT061 en la producción de cultivos de monocitos estimulados por LPS, citoquinas inflamatorias. Se dan Promedio y SD de

dos micro cultivos individuales.

	IL-1 pg/ml				IL-6 pg/ml			
	LPS 1 µg/ml		nulo		LPS 1 µg/ml		Nulo	
µg/ml	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
20.0	40	14.7	0	0	253	2.4	121	12.2
4.0	39	8.1	0	0	256	14.9	135	8.9
0.8	34	14.8	0.2	0.3	257	16.6	128	5.9
0.0	56	2.2	0	0	233	16.6	117	14.1

Tabla 4 (continúa)

	TNF α pg/ml			
	LPS 1 µg/ml		Nulo	
µg/ml	Promedio	SD	Promedio	SD
20.0	609	0.0	0.3	0.4
4.0	597	12.7	0.0	0
0.8	605	5.7	0.0	0
0.0	600	3.2	0.6	0.8

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

- Una supresión dependiente de dosis de proliferación de células T inducidas por toxoide-tétanos (respuesta de memoria) se ha demostrado incluso a altas
10 dosis de BT061, mostrando que BT061 no abroga todas las respuestas inmunes. Dosis empleadas aplican a una aplicación de alta dosis correspondiente de hasta 60 mg en pacientes.
- Supresión general de liberación de citoquina
15 (reducción dependiente de dosis de IFN-gamma, IL-5 y TNF-alfa, sin cambio en IL-1, IL-4, IL-6, IL-10) y sin afectar el balance Th1/Th2.

- Un aumento en liberación de TGF-beta

EJEMPLO 3 - Una prueba citométrica de flujo para ADCC (citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo) inducida por BT061 (anti CD4 mAb)

5 Células diana HuT 78 se etiquetaron con BT061 (hB-F5) e incubaron con células PBMC como efectores. Células muertas pueden detectarse debido a la absorción del colorante de ADN yoduro de propidio después de un tiempo de incubación de 30 minutos. Los resultados se muestran en la

10 Tabla 5.

Tabla 5

Concen- tración [µg/ml]	Tecelac/AT G) (control positivo) Intensidad de fluo- rescencia promedio	Control negative intensidad de fluo- rescencia promedio	Muerte celular específica (ADCC) [%]
75	31.78	11.96	19.82
37.05	25.09	12.70	12.39
18.75	22.25	10.59	11.66
9.38	14.95	10.63	4.32

Concen- tración [µg/ml]	hB-F5 Intensidad de fluo- rescencia promedio	Control negative intensidad de fluo- rescencia promedio	Muerte celular específica (ADCC) [%]
-------------------------------	--	--	---

766

70.85	10.96	13.41	-2.45
35.43	11.06	14.05	-2.99
17.71	11.68	12.16	-0.48
8.86	10.54	10.23	0.31

Los datos en la tabla demuestran que no hubo inducción de ADCC por BT061 (hB-F5) incluso a altas concentraciones

5 EJEMPLO 4 - Apoptosis

En una prueba citométrica de flujo para apoptosis inducida por BT061 (anti CD4 mAb), PBMCs de sangre entera se incubaron con BT061 o el control positivo.

Después de un tiempo de incubación de 7 días, la
10 detección de células apoptóticas se realizó al teñir células apoptóticas con Anexina-V-Fluoresceína. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

15

Experi- mentos de estímulo 7 d	Estímulo	
	Control positivo (ATG/ Tecelac)	BT061
Concen- tración de anti- cuerpo [µg/ml]	Incremento de la proporción de células apoptóticas [%]	
400	0.8	-6.9

200	13.6	-6.4
100	19.5	-0.7
50	17.3	-0.4
25	18.3	-0.5
12.50	8.2	-0.1

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

EJEMPLO 5 - Enlace de complemento

5 En una prueba citométrica de flujo para ligar el factor de complemento ClqPBMCs se ha aislado e incubado con BT061 (anti CD4 mAb), seguido por una incubación con Clq recombinante purificado.

ATG (Tecelac) sirvió como el control positivo.

10 Se realizó detección con un anticuerpo de detección etiquetado con FITC contra Clq. Resultados se muestran en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7

Concentra- ción de anticuerpo [µg/ml]	anti CD4 mAb BT061	Control positivo
	Intensidad de flourescencia promedio	
150	199	782
75.0	200	766
37.5	205	732
18.8	217	672
9.4	210	541

4.7	198	491
2.3	199	371
1.2	193	302

Los datos muestran que no puede verse enlace
complemento, incluso a altas concentraciones.

EJEMPLO 6 - Seguridad y tolerabilidad de dosis en escala de
5 BT061

Un estudio se conduce para supervisar la
seguridad y tolerabilidad de BT061 utilizando dosis
escaladas del anticuerpo en voluntarios masculinos y
femeninos sanos entre las edades de ≥ 18 a ≤ 75 años.

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

TABLA 8 - Dosis intravenosa de BT061

Administración de BT061			
Dosis total de BT061 mab	Volumen de BT061- 12.5 mg	Volumen de BT061- 25 mg	Volumen de BT061- 50 mg
3.5 µg	0.28 µl	—	—
20 µg	1.6 µl	—	—
100 µg	8 µl	—	—
500 µg	40 µl	—	—
2.5 mg	0.2 ml	—	—

5 mg	0.4 ml	—	—
10 mg	0.8 ml	—	—
20 mg	—	0.8 ml	—
40 mg	—	—	0.8 ml
60 mg	0.8 ml	—	1 ml

Cada dosis se diluye con 0.9% de inyección de cloruro de sodio al 0.9% hasta un volumen total de 20 ml. La dosis se administra como una infusión intravenosa 5 continua sencilla durante 2 horas.

La administración de BT061 subcutáneamente se ilustra en la Tabla 9 siguiente:

TABLA 9 - Dosis subcutánea de BT061

Administración de BT061			
Dosis total de BT061 mab	Volumen de BT061- 12.5 mg	Volumen de BT061- 25 mg	Volumen de BT061- 50 mg
5 mg	0.4 ml	—	—
10 mg	0.8 ml	—	—
20 mg	—	0.8 ml	—
40 mg	—	—	0.8 ml
60 mg	—	—	1 ml + 0.2 ml

10

Cada dosis se inyecta como una inyección de un solo bolo.

Los voluntarios se estimaron sobre un periodo de 3 meses después de inyección.

15

Para aplicación subcutánea se tomaron muestras de

plasma antes de administración y a 3, 6, 12, 24, 36, 48, 56, 72, 88, 96, 120, 144 y 168 horas después de administración y en el día 75.

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

Las muestras de plasma se analizaron utilizando metodología ELISA estándar para establecer niveles de citoquina. Las citoquinas relevantes analizadas incluyeron: IFN- γ , TNF- α , IL-6 y IL-2.

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

15 *Resultados*

Se encontró que las dosis intravenosas y subcutáneas de hasta 60 mg en general fueron bien toleradas.

Niveles de citoquina

Inducción de liberación de citoquina es una complicación inmediata común que ocurre con el uso de anticuerpos terapéuticos que interactúan con célula T, tales como ATG, OKT3, CAMPATH-1H y anti-CD3 mAbs humanizado (TRX4, Visilizumab y Teplizumab). Los síntomas primordialmente incluyen fiebre moderada, dolores de cabeza y manifestaciones gastrointestinales auto-limitantes. Los efectos laterales correlacionados con inducción de citoquina después de administración de anticuerpo requieren la aplicación de fármacos adicionales tales como la antihistamina hidrocloreto difenhidramina y/o el agente anti-inflamatorio ibuprofen.

Con el uso de OKT3 (muromonab-CD3), un anticuerpo monoclonal terapéutico específico de CD3 murino, incluso se han reportado muertes, y varios efectos secundarios limitan el uso clínico de este anticuerpo primordialmente a
5 pacientes inmunosuprimidos.

Aunque anticuerpos monoclonales específicos de CD3 sin-enlace a FcR humanizados que actualmente se emplean en la clínica para el tratamiento de enfermedad autoinmune (Teplizumab y TRX4) exhiben reducidos efectos secundarios
10 inducidos por la activación de célula T y/o por activación de células que expresan receptor Fc después de la primera dosis, en comparación con anticuerpos específicos CD3 que ligan FcR tales como OKT3, cierto grado de activación e inactivación de células T de células que expresan receptor
15 Fc todavía se observa que lleva a liberación de citoquina generalmente conectada con efectos secundarios dependientes de citoquina.

En el presente estudio, se encontró de manera sorprendente que la inducción de citoquina observada en
20 voluntarios sanos después de aplicación intravenosa o subcutánea de BT061 fue baja y transitoria en comparación con anticuerpos anti-CD3. La inducción de citoquina generalmente aumenta al incrementar la dosis. Sin embargo, incluso las más altas dosis de 40 a 60 mg la inducción de
25 citoquina es mucho menor que la que se ve con otros anticuerpos monoclonales que interactúan con célula T (Figuras 7A y B).

Las concentraciones pico promedio para las citoquinas observadas en cualquier punto en tiempo dentro
30 de 96 horas después de administración utilizando las más altas dosis (40 mg a 60 mg de BT061) se ilustran en las

Figuras 7 y 8.

La concentración pico promedio o mediana para cada citoquina se calcula como sigue: la mediana de las concentraciones de citoquina más altas observadas después de administración del anticuerpo.

Las Figuras 7A y B muestran que la liberación de TNF α y IL-6 observada en voluntarios sanos después de administración intravenosa o subcutánea de BT061 en comparación con aquellas liberadas después de administración de anticuerpos monoclonales anti-CD3, Teplizumab y TRX4. Los valores normales de estas citoquinas se tomaron de Straub et al., (2007, Arthr. & Rheumat.). La Figura 8 muestra los niveles de plasma IL-2 y IFN- γ después de administración de BT061 intravenoso y subcutáneo. Los niveles picos medianos o promedios se calcularon de los grupos de dosis de 40 y 60 mg medido dentro de 4 días después de inyección de anticuerpo. El límite superior de lo normal (ULN) se calcula con base en niveles de citoquina medidos en 39 sujetos sanos, en donde ULN = valor promedio + 2 x desviación estándar.

En comparación con Teplizumab y TRX4 (resultados tomados de Herold et al., 2002, New Engl. J. Med, y Keymeulen et al., 2005 New Engl. J. Med, respectivamente), BT061 induce solo liberación de citoquina marginal y transitoria. Niveles de TNF- α y IL-6 se aumentaron ligeramente. La Figura 7 muestra que los valores pico medianos de IL-6 y los niveles de citoquina TNF α detectados en plasma después de aplicación de BT061 (40 y 60 mg) son menores que aquellos vistos después de tratamiento con anticuerpos terapéuticos específicos de CD3 Teplizumab y TRX4.

Además, en contraste con los anti-CD3 mAbs, BT061 no lleva a niveles substancialmente incrementados de IFN-γ y IL-2 (Figura 8) como se reportó para la aplicación de TRX4 (Keymeulen et al. 2005).

5 Linfocitos CD4+

Además, la prueba también incluye un estudio de los números de linfocitos CD4-positivos en muestras de plasma recolectadas.

Los resultados de la administración intravenosa se muestran a continuación en las Tablas 9, 10 y 11. La Tabla 12 muestra los resultados de la prueba con administración subcutánea. Los resultados se ilustran gráficamente en las Figuras 9 y 10.

15 **TABLA 9 Conteos celulares CD4+ en voluntarios sanos individuales después de administración intravenosa de 3.5 µg a 2.5 mg de BT061**

TIEMPO	DOSIS						
	3.5	3.5	3.5	20	20	20	100
	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg
Pre-dosis	998	878	1025	955	1209	666	1164
3h	1098	746	1020	708	1121	642	452
6h	922	710	1063	746	1091	590	353
12h	898	1183	942	1016	1667	1055	465
24h	868	825	769	699	1043	517	399
36h	948	1035	1148	861	1549	836	559
48h	798	542	834	566	1119	711	384
72h	798	626	766	622	942	575	400
96h	469	715	838	583	978	531	475
120h	736	643	843	604	942	472	401
144h	663	593	766	635	1200	510	372

174

168h	753	576	695	616	1012	505	348
Día 14	716	615	625	696	867	645	400
Día 21	941	378	707	637	971	633	391
Día 28	821	569	840	652	863	649	497
Día 42	922	442	784	676	1044	700	569
Día 56	573	597	828	839	871	553	489
Día 75	1821	512	692	659	1058	553	466
Día 90							
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	469	378	625	583	863	472	348
Reducción máxima de células CD4+ (%)	53.0	56.9	39.0	39.0	28.6	29.1	70.1

Tabla 9 (continúa)

TIEMPO	DOSIS						
	100	100	500	500	500	2.5	2.5
	µg	µg	µg	µg	µg	mg	mg
Pre-dosis	800	543	759	493	1240	891	782
3h	791	319	777	566	1058	392	461
6h	627	314	805	381	1115	487	512
12h	1065	477	955	643	1505	669	881
24h	606	347	687	439	1017	521	701
36h	1016	485	869	688	1542	976	1207
48h	644	413	730	509	1108	574	815
72h	749	503	696	484	969	537	689
96h	698	400	800	390	1026	499	785

175

120h	650	511	830	488	1168	501	782
144h	573	432	705	394	953	518	745
168h	646	426	740	475	1073	568	773
día 14	771	451	713	600	1398	663	883
día 21	805	404	651	533	1241	530	758
día 28	775	503	752	445	1109	590	914
día 42	758	455	700	617	1120	770	901
día 56	607	441	674	616	1311	634	1017
día 75	735	459	645	522	1026	731	1032
día 90							
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	573	400	645	390	953	499	689
Reducción máxima de células CD4+ (%)	28.4	26.3	15.0	20.9	23.1	44.0	11.9

TABLA 10 Recuentos celulares CD4+ en voluntarios sanos individuales después de administración intravenosa 2.5 mg a 20 mg de BT061

5

TIEMPO	DOSIS			
	2.5 mg	5 mg	5 mg	5 mg
Pre-dosis	1080	1116	623	1160
3h	488	313	108	111
6h	514	445	164	246

12h	699	763	346	573
24h	726	617	282	539
36h	985	1102	505	721
48h	738	807	390	687
72h	711	736	419	700
96h	680	791	395	806
120h	649	669	438	750
144h	662	723	407	676
168h	579	777	309	652
Día 14	726	692	354	475
Día 21	601	811	480	514
Día 28	874	681	339	602
Día 42	923	843	300	694
Día 56	847		450	571
Día 75	1239		365	627
Día 90		721		
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	579	669	300	475
Reducción máxima de células CD4+ (%)	46.9	40.1	51.8	59.1

Tabla 10 (continúa)

TIEMPO	DOSIS			
	10 mg	10 mg	10 mg	20 mg
Pre-	840	835	1281	700

777

Dosis				
3h	104	143	132	63
6h	122	82	120	110
12h	297	285	366	199
24h	470	496	772	351
36h	414	985	1417	677
48h	388	794	942	493
72h	440	830	919	504
96h	516	641	918	538
120h	543	674	1002	558
144h	448	549	942	579
168h	473	525	876	510
Día 14	357	701	908	484
Día 21	481	654	978	618
Día 28	414	755	887	496
Día 42	507	614	889	639
Día 56	551	805	1006	420
Día 75	685	853	1080	537
Día 90				
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	357	525	876	420
Reducción máxima de células CD4+ (%)	57.5	37.1	31.6	40.0

En particular, la Figura 9 muestra que los

178

recuentos de células CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con la dosis intravenosa sencilla de BT061. Los puntos de datos representan los valores promedio de 3 pacientes en cada grupo de dosis. Líneas punteadas indican el límite superior de lo normal (ULN) y el límite inferior de normal (LLN). ULN y LLN (valor promedio + (o -) la desviación estándar) se calcularon, con base en recuentos celulares de voluntarios sanos, como 443 células CD4 por μ l (límite inferior de normal; LLN) y 1324 células CD4 por μ l (límite superior de normal; ULN).

La Figura 10 muestra los recuentos celulares CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con la dosis subcutánea sencilla de BT061. Como con la Figura 9, los puntos de datos representan los valores promedio de 3 pacientes en cada grupo de dosis. Líneas punteadas indican el límite superior de lo normal (ULN) y el límite inferior de lo normal (LLN).

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

TIEMPO	DOSIS			
	20 mg	20 mg	40 mg	40 mg
Pre-dosis	843	1233	1152	789
3h	69	186	72	137
6h	83	245	87	147
12h	214	469	262	221
24h	266	490	208	222
36h	562	1019	489	475
48h	359	792	460	455
72h	392	909	591	545

179

96h	468	755	567	545
120h	391	795	578	517
144h	347	897	548	523
168h	331	853	630	577
día 14	334	899	683	495
día 21	396	1077	744	487
día 28	579	1030	637	458
día 42	346	847	439	472
día 56	337	947	556	557
día 75	597	824	986	440
día 90				
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	331	755	439	440
Reducción máxima de células CD4+ (%)	60.7	38.8	61.9	44.2

Tabla 11 (continúa)

TIEMPO	DOSIS			
	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
Pre-dosis	976	900	989	2539
3h	48	63	55	71
6h	69	81	78	109
12h	212	360	276	182
24h	292	315	285	313
36h		707	561	569
48h	703	413	500	565

72h	625	709	688	806
96h	733	717	737	774
120h	636	718	685	646
144h	760	714	732	606
168h	720	656	822	662
día 14	675	851	546	423
día 21	711	627	639	867
día 28	582	466	757	1376
día 42	619	1179	814	1607
día 56	570	686	686	1298
día 75	813	648	748	1199
día 90				
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	570	466	546	423
Reducción máxima de células CD4+ (%)	41.6	48.2	44.8	83.3

TABLA 12 Recuentos celulares CD4+ en voluntarios sanos individuales después de aplicación subcutánea de BT061

TIEMPO	DOSIS				
				10	10
	5 mg	5 mg	5 mg	mg	mg
Pre-dosis	1053	553	663	962	697
24h	858	402	707	640	623

181

36h	1131	916	946	1232	955
48h	625	526	550	610	757
72h	814	661	580	589	709
96h	799	582	694	666	732
120h	823	566	712	653	673
144h	890	543	809	744	767
168h	894	450	437	686	655
día 10	951	606	690	1213	724
día 14	719	647	948	969	724
día 21	859	552	750	655	708
día 28	894	546	758	778	653
día 42	854	461	1009	1235	805
día 56	806	560	958	977	665
día 75	852	592	772	1268	679
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	719	450	437	589	653
Reducción máxima de células CD4+ (%)	31.7	18.6	34.1	38.8	6.3

Tabla 12 (continúa)

TIEMPO	DOSIS				
	10	20	20	20	40 mg

182

	mg	mg	mg	mg	
Pre-dosis	891	863	692	621	689
24h	615	537	535	500	177
36h	1019	762	666	944	268
48h	537	628	599	587	354
72h	610	700	587	596	299
96h	579	643	665	589	283
120h	659	642	528	633	323
144h	784	603	620	627	239
168h	516	620	550	581	262
día 10	928	683	616	778	354
día 14	859	843	642	1033	307
día 21	685	904	605	752	293
día 28	766	757	680	768	298
día 42	785	775	469	634	308
día 56	753	801	589	531	342
día 75	906	714	688	551	340
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	516	603	469	531	239
Reducción máxima de células CD4+ (%)	42.1	30.1	32.2	14.5	65.3

Tabla 12 (continúa)

183

TIEMPO	DOSIS				
	40 mg	40 mg	60 mg	60 mg	60 mg
Pre-dosis	946	840	1114	719	1345
24h	326	379	580	470	333
36h	463	870	503	527	487
48h	586	686	739	735	551
72h	719	734	860	813	539
96h	605	653	852	743	608
120h	835	629	873	639	555
144h	626	568	801	924	591
168h	515	569	1010	843	820
día 10	715	809	757	1123	836
día 14	705	541	1198	1359	527
día 21	1097	630	1074	901	750
día 28	861	667		880	578
día 42	678	709	568	1149	854
día 56	541	948	1126	945	505
día 75	551	659			
Recuento celular mínimo (72 h a día 75)	515	541	568	639	505
Reducción máxima de	45.6	35.6	49.0	11.1	62.5

células					
CD4+ (%)					

Muchos anticuerpos monoclonales específicos de CD4 conocidos en la técnica (tales como aquellos revisados por Strand et al., 2007) lograron inmuno-supresión mediante agotamiento de linfocitos positivos CD4. La desventaja de
5 estos anticuerpos es que los individuos tratados se volvieron inmuno-comprometidos y son susceptibles a otras infecciones.

En contraste, este estudio mostró que BT061 no induce agotamiento de larga duración masivo de células CD4-positivas. Sin embargo, un declive transitorio de
10 linfocitos CD4-positivos se observa con una recuperación a los valores normales en la sangre periférica dentro de 72 h después de administración del anticuerpo.

En el punto en tiempo de 72 h después de aplicación de BT061, recuentos de células CD4 en cuatro voluntarios de los grupos de dosis intravenosas mostraron niveles CD4 que fueron inferiores a estos valores de norma como sigue: 1 voluntario de la dosis intravenosa de 100 µg: 400 células CD4 por µl; 1 voluntario del grupo 5 mg: 419
15 células CD4 por µl; 1 voluntario del grupo 10 mg: 440 células CD4 por µl; y 1 voluntario del grupo 20 mg: 392 células CD4 por µl.
20

Sin embargo, estos valores solo fueron ligeramente por debajo de valor de norma. Recuentos celulares CD4 en los 26 voluntarios restantes de los grupos de dosis intravenosas, estuvieron dentro de los valores de norma 72 horas después de administración de BT061.
25

En los grupos de dosis subcutáneos, después de 72 horas, solo uno de 15 voluntarios mostró recuentos de

células CD4 por debajo de los valores de norma.

En conclusión, en contraste a agotar mAbs
específicos de CD4, incluso a altas dosis de BT061 solo
inducen un declive transitorio de células CD4-positivas
5 seguido por una recuperación general. Del declive
transitorio y recuperación general rápida a valores de
norma se concluye que una redistribución transitoria de las
células CD4-positivas se ha llevado a cabo, en vez del
agotamiento de estas células.

10 EJEMPLO 7 - *Prueba clínica de BT061 en pacientes con
psoriasis moderada a crónica severa*

La capacidad de hB-F5 BT061 para tratar una
enfermedad autoinmune se prueba en 56 pacientes que sufren
de psoriasis moderada a crónica severa. La prueba
15 comprende un estudio de escala de dosis sencilla para
estimar la seguridad y eficacia de hB-F5.

Las condiciones de la prueba son como sigue:

Los 56 pacientes se dividen en siete grupos de
dosis, cada grupo comprende ocho individuos. Cinco grupos
20 de dosis (grupos de dosis I a V) van a recibir el
anticuerpo o placebo por administración intravenosa y dos
grupos de dosis (grupos de dosis VI y VII) van a recibir el
anticuerpo o placebo por administración subcutánea. Dos
pacientes en cada grupo de dosis reciben un placebo,
25 mientras que los seis pacientes restantes en cada grupo de
dosis reciben una dosis de BT061. En el grupo de dosis I,
los seis pacientes recibieron 0.5 mg de BT061 intravenoso.
En los grupos de dosis II a V, los seis pacientes
recibieron 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, o 20 mg de BT061,
30 respectivamente. En los grupos de dosis VI y VII en donde
la administración es subcutánea, los seis pacientes

recibieron 12.5 mg o 25 mg de BT061, respectivamente.

Para administración intravenosa, el anticuerpo/placebo se va a someter a infusión en la vena del ante-brazo de acuerdo con procedimientos médicamente aceptados. En el caso presente, el volumen total se administra como una infusión intravenosa continua sencilla sobre un periodo de 2 horas mediante una bomba de infusión (perfusor) (Fresenius Pilot C, Fresenius AG, Alemania). Cada dosis del anticuerpo se diluye con una inyección de cloruro de sodio a 0.9% (B. Braun Melsungen AG, Alemania) hasta un volumen total de 20 ml.

Para administración subcutánea, el anticuerpo se va a administrar como una inyección subcutánea sencilla. El mismo procedimiento aplica para el placebo.

El nivel de psoriasis exhibida por cada paciente se registra utilizando la calificación de Área de Psoriasis e Índice de Severidad (PASI). Como se describió anteriormente, calificaciones superiores de PASI corresponden a un nivel superior de psoriasis. Pacientes que participan en la prueba tienen psoriasis moderada a crónica severa, es decir una calificación PASI de 10 o superior.

La calificación PASI del paciente se estima antes de la prueba para proporcionar un valor de "línea base" el día 0, y repetidamente durante la prueba en los días 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56 y 75.

Grupo de Dosis I

Seis pacientes del grupo de dosis I recibieron una aplicación intravenosa sencilla de 0.5 mg de BT061, mientras que dos pacientes del grupo de dosis I recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área

superficial del cuerpo (BSA) por cada paciente se ilustran en la Tabla 13. El área superficial del cuerpo se calculó de acuerdo con la fórmula Mosteller descrita aquí.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis I se muestran en la Tabla 13 junto con la mejora en por ciento en la calificación PASI de línea base.

Grupo de Dosis II

Seis pacientes del grupo de dosis II recibieron una sola inyección intravenosa de 2.5 mg de BT061 mientras que dos pacientes del grupo de dosis II recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área superficial del cuerpo (BSA) para cada paciente se ilustran en la Tabla 14.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis II se ilustran en la Tabla 14 junto con la mejora porcentual en la calificación PASI de línea base.

Grupo de Dosis III

Seis pacientes del grupo de dosis III recibieron una sola inyección intravenosa de 5.0 mg de BT061, mientras que dos pacientes del grupo de dosis III recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área superficial del cuerpo (BSA) por cada paciente se ilustran en la Tabla 14B.

Las calificaciones PASI de los pacientes en el grupo de dosis III se ilustran en la Tabla 14B junto con el por ciento de mejora en la calificación PASI de línea base.

Grupo de Dosis IV

Seis pacientes del grupo de dosis IV reciben una sola inyección intravenosa de 10.0 mg de BT061 mientras que dos pacientes del grupo de dosis IV reciben el placebo. La dosis por peso y la dosis por área superficial de cuerpo

(BSA) para los pacientes se ilustran en la Tabla 14C.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis IV se ilustran en la Tabla 14C junto con el por ciento de mejora en la calificación PASI de línea base.

5 TABLA 13 - Calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis I (dosis intravenosa 0.5 mg) sobre el curso de la prueba

Paciente	1		2	3	4
Dosis Rel. [µg/kg] / [mg/m²]	5.2 / 0.23		5.9 / 0.25	4.6 / 0.22	5.3 / 0.24
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora a línea base)				
Línea base	12.2	13.5	12.1	14.0	
Día 5	12.0 (2%)	12.1 (10%)	9.1 (25%)	12.2 (13%)	
Día 7	12.0 (0%)	10.7 (21%)	7.7 (36%)	11.6 (17%)	
Día 14	11.8 (3%)	9.5 (30%)	5.7 (53%)	9.6 (31%)	
Día 21	11.6 (5%)	10.0 (26%)	5.1 (58%)	7.2 (49%)	
Día 28	-	10.4 (23%)	4.8 (60%)	8.4 (40%)	
Día 42	11.4 (7%)	11.2 (17%)	5.1 (58%)	8.4 (40%)	
Día 56	11.4 (7%)	10.1 (25%)	4.2 (65%)	9.2 (34%)	
Día 75	11.6	7.7	5.1	9.8 (30%)	

189

	(5%)	(43%)	(58%)	
--	------	-------	-------	--

Paciente	5	6	7	8
Dosis Rel. [µg/kg] / [mg/m²]	4.8 / 0.22	8.5 / 0.31	4.7 / 0.21	7.0 / 0.28
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora de línea base)			
Línea base	12.1	12.6	12.1	15.2
Día 5	10.9 (10%)	11.8 (6%)	9.4 (22%)	10.2 (33%)
Día 7	11.2 (7%)	10.7 (15%)	9.3 (23%)	9.0 (41%)
Día 14	8.7 (28%)	10.4 (17%)	7.8 (36%)	7.2 (53%)
Día 21	8.0 (34%)	8.0 (37%)	6.0 (50%)	6.5 (57%)
Día 28	8.2 (32%)	6.5 (48%)	6.4 (47%)	6.4 (58%)
Día 42	7.9 (35%)	6.1 (52%)	5.5 (55%)	5.5 (55%)
Día 56	7.9 (35%)	5.7 (55%)	5.3 (56%)	5.3 (56%)
Día 75	9.6 (21%)	5.1 (60%)	5.4 (55%)	7.8 (49%)

5

TABLA 14A - Calificaciones PASI para los
pacientes en el grupo de dosis II (2.5 mg de dosis
intravenosa) sobre el curso de la prueba

Paciente	1	2	3	4
Dosis Rel. [µg/kg] / [mg/m²]	27.8 / 1.20	31.6 / 1.30	31.8 / 1.28	23.6 / 1.08
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora de línea base)			
Línea base	17.1	13.8	10.9	18.6
Día 5	14.5 (15%)	15.5 (+12%)	6.8 (38%)	17.6 (5)
Día 7	12.3 (28%)	13.6 (1%)	5.2 (52%)	19.7 (+6%)
Día 14	10.8 (37%)	15.5 (+12%)	3.9 (64%)	11.1 (40%)
Día 21	9.7 (43%)	12.2 (12%)	3.9 (64%)	13.7 (26%)
Día 28	8.6 (50%)	9.4 (32%)	1.5 (86%)	7.6 (59%)
Día 42	8.8 (49%)	8.5 (38%)	1.3 (88%)	10.2 (45%)
Día 56	6.3 (63%)	8.3 (40%)	1.3 (88%)	-
Día 75	6.0 (65%)	5.6 (59%)	1.9 (83%)	9.2 (51%)

Tabla 14A (continúa)

Paciente	5	6	7	8
Dosis Rel.	28.4 /	39.4 /	26.5 /	

[µg/kg] / [mg/m²]	1.19	1.49	1.17	28.4 / 1.19
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora de línea base)			
Línea base	15.0	12.6	13.9	13.5
Día 5	12.1 (19%)	12.6 (0%)	19.5 (+40%)	15.6 (+16%)
Día 7	14.0 (7%)	13.0 (+3%)	17.0 (+22%)	14.8 (+10%)
Día 14	11.8 (21%)	16.6 (+32%)	11.4 (18%)	8.0 (41%)
Día 21	12.4 (17%)	11.4 (10%)	7.9 (43%)	7.1 (47%)
Día 28	12.2 (19%)	12.8 (+2%)	8.2 (41%)	6.5 (52%)
Día 42	12.2 (19%)	11.0 (13%)	7.8 (44%)	9.0 (33%)
Día 56	14.2 (5%)	9.7 (23%)	8.2 (41%)	7.8 (42%)
Día 75	14.7 (2%)	10.4 (17%)	10.2 (27%)	8.1 (40%)

TABLA 14B - calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis III (5.0 mg dosis intravenosa) sobre el curso de la prueba

5

Paciente	1	2	3	4
Dosis	70.4 /	57.5 /	43.9 /	59.5 /
Rel.	2.73	2.40		

[µg/kg] / [mg/m²]				
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora de línea base)			
Línea base	15.8	14.1	17.4	12.4
Día 5	13.0 (18%)	27.2 (+93%)	17.7 (+2%)	12.0 (3%)
Día 7	14.3 (9%)	18.9 (+34%)	15.6 (10%)	11.1 (10%)
Día 14	13.5 (15%)	30.3 (+115%)	14.0 (20%)	9.3 (25%)
Día 21	10.1 (36%)	23.1 (+64%)	14.4 (17%)	9.2 (26%)
Día 28	9.6 (39%)	23.1 (+64%)	13.4 (23%)	10.2 (18%)
Día 42	9.2 (42%)	20.1 (+43%)	14.4 (17%)	10.2 (18%)
Día 56	10.0 (37%)	20.1 (+43%)	15.8 (9%)	-
Día 75	12.8 (19%)	22.5 (+60%)	16.0 (8%)	9.0 (27%)

Tabla 14B (continúa)

Paciente	5	6	7	8
Dosis Rel. [µg/kg] / [mg/m²]	52.4 /	56.8 /	71.4 /	66.2 /
	Calificación PASI (cambio relativo /			

	mejora de línea base)			
Línea base	17.3	12.4	13.5	10.4
Día 5	16.8 (3%)	10.6 (15%)	-	-
Día 7	17.6 (+2%)	11.4 (8%)	11.0 (19%)	8.2 (21%)
Día 14	14.4 (17%)	13.0 (+5%)	9.4 (30%)	7.6 (27%)
Día 21	14.7 (15%)	11.6 (6%)	9.4 (30%)	-
Día 28	13.8 (20%)	11.2 (10%)	8.3 (39%)	8.6 (17%)
Día 42	13.2 (24%)	12.6 (+2%)	8.3 (39%)	-
Día 56	13.2 (24%)	10.6 (15%)	9.6 (20%)	-
Día 75	13.2 (24%)	13.2 (+6%)	13.4 (1%)	9.6 (8%)

TABLA 14C - Calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis IV (10.0 mg dosis intravenosa) sobre el curso de la prueba

Paciente	1	2	3	4
Dosis Rel. [µg/kg] / [mg/m ²]	173.0 /	142.9 /	102.8 /	115.6 /
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora de línea base)			
Línea base	14.6	11.0	21.6	22.0
Día 5	12.8 (12%)	11.0 (0%)	21.6 (0%)	16.8 (24%)
Día 7	12.8 (12%)	11.0 (0%)	21.6 (0%)	16.8 (24%)
Día 14	11.4 (22%)	11.0 (0%)	21.6 (0%)	18.1 (18%)
Día 21	11.4 (22%)	11.0 (0%)	22.5 (+4%)	19.0 (14%)
Día 28	11.4 (22%)	8.9 (19%)	22.0 (7%)	17.7 (20%)
Día 42	11.0 (25%)	9.4 (15%)	22.6 (+5%)	18.8 (15%)
Día 56	11.4 (22%)	9.8 (11%)		
Día 75				

195

Paciente	5	6	7	8
Dosis Rel. [µg/kg]/ [mg/m ²]	119.6/	108.8/	75.9/	106.6/
	Calificación PASI (cambio relativo / mejora de línea base)			
Línea base	19.0	11.6	14.0	12.4
Día 5	18.8 (1%)	11.2 (3%)	14.2 (+1%)	11.4 (8%)
Día 7	18.2 (4%)	11.2 (3%)	14.2 (+1%)	8.4 (32%)
Día 14	16.7 (12%)			
Día 21	17.3 (9%)			
Día 28				
Día 42				
Día 56				
Día 75				

Además, las calificaciones PASI contra el tiempo para pacientes individuales, se ilustran en la forma de gráfica en las Figuras 11A a 11H y en las Figuras 12A a 12H. Las gráficas ilustradas en las Figuras 11A a 11H representan calificaciones PASI para pacientes del grupo de dosis I, mientras que las gráficas mostradas en las Figuras 12A a 12H representan calificaciones PASI para pacientes del grupo de dosis II.

Como puede verse de los resultados mostrados en las Tablas 13 y 14, 75% de todos los pacientes del grupo de dosis I y el grupo de dosis II muestran una clara mejora en

sus calificaciones PASI, es decir al menos 40% de mejora sobre el valor de línea base, después de una sola dosis. Habrá de notarse que 25% de los pacientes en el grupo de dosis I y el grupo de dosis II recibieron un placebo.

De hecho, en ambos grupos de dosis, 50% de los pacientes mostraron al menos 50% de mejora en sus calificaciones PASI, con solo un paciente en el grupo de dosis II que muestra una mejora del 88% en la calificación PASI al día 56, (es decir, el paciente 3 en la Tabla 14). Además, el efecto terapéutico es de larga duración incluso a estas bajas dosis, con las mejoras que aún se ven en muchos pacientes al final de la prueba, 75 días después de administración.

Pacientes en el grupo de dosis III también mostraron una mejora en su calificación PASI, con seis de ocho pacientes que muestran una mejora mayor al 20% y dos de estos seis que muestran una mejora mayor al 30%, después de tratamiento. Sin embargo, la mejora no fue tan significativa como la que se ve en pacientes del grupo de dosis I y el grupo de dosis II que reciben una menor dosis del anticuerpo. Cierta eficacia también se ve en los pacientes del grupo de dosis IV. En particular los pacientes 1, 4, 5 y 8 en este grupo de dosis (como se ilustra en la Tabla 14C) muestran una clara mejora en sus calificaciones PASI, aunque esto está limitado en comparación con los pacientes de los grupos de dosis I a III.

El número de pacientes que muestran al menos 40%, 50%, 60% y 75% de mejora en calificación PASI, se ilustra en la Tabla 15.

TABLA 15 - Resumen de Resultados de los Grupos de

Dosis I a III

	Grupo de dosis I* 0.5 mg BT- 061	Grupo de dosis II* 2.5 mg BT- 061	Grupo de dosis III* 5.0 mg BT061
Mejora $\geq$ 40%	6/8 pacientes	6/8 pacientes	1/8 pacientes
Mejora $\geq$ 50%	4/8 pacientes	4/8 pacientes	0/8 pacientes
Mejora $\geq$ 60%	1/8 pacientes	2/8 pacientes	0/8 pacientes
Mejora $\geq$ 75%	0/8 pacientes	1/8 pacientes	0.8 pacientes

- por grupo de dosis: 75% de pacientes recibieron BT061, 25% de pacientes recibieron placebo

5 Las Figuras 13A y 13B proporcionan evidencia fotográfica de la mejora en el nivel de psoriasis antes y después de tratamiento. La Figura 13A muestra un área de psoriasis en la piel de un paciente en el grupo de dosis II antes de administración. La Figura 13B muestra la misma

10 área de psoriasis 28 días después de administración. Las áreas de mejora están marcadas en la Figura 13B con casillas negras.

De estos resultados, puede verse claramente que BT061 proporciona tratamiento efectivo de psoriasis

15 moderada y severa crónica.

Los resultados de este estudio, en combinación con aquellos anteriormente descritos en el Ejemplo 6 que muestran que altas dosis del anticuerpo de la invención en

general son bien toleradas en humanos, demuestran la capacidad de las composiciones farmacéuticas de la invención para proporcionar tratamiento efectivo de enfermedades autoinmunes a las dosis aquí descritas.

5 EJEMPLO 8 - *Prueba clínica de BT061 en pacientes con artritis reumatoide*

La capacidad de BT061 en tratar artritis reumatoide se prueba en pacientes que sufren de esta enfermedad. La prueba comprende un estudio de dosis
10 múltiple que involucra 96 pacientes, divididos en 12 grupos. En cada grupo, dos pacientes reciben un placebo mientras que 6 pacientes reciben BT061. Los pacientes se dosifican una vez a la semana por un periodo de 6 semanas.

Los pacientes se dividen en aquellos que reciben
15 el anticuerpo en forma subcutánea y aquellos que reciben el anticuerpo en forma intravenosa. Los grupos de dosis subcutáneas son: 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg y 100 mg. Los grupos de dosis intravenosas son: 0.5 mg, 2 mg, 6.25 mg, 12.5 mg y 25 mg.

20 En el grupo de dosis subcutáneas de 1.25 mg, los pacientes son numerados 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108. En el grupo de dosis subcutáneas de 6.25 mg, los pacientes son numerados 201-208. En el grupo de dosis subcutáneas de 12.5 mg, los pacientes son numerados 301-
25 308. En el grupo de dosis subcutáneas de 25 mg, los pacientes se numeran 401-408. En el grupo de dosis subcutáneas de 50 mg, los pacientes se numeran 501-508. En el grupo de dosis intravenosas de 6.25 mg, los pacientes son numerados 601-608.

30 El procedimiento de administración intravenosa y subcutánea fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 7

para la prueba de psoriasis.

El nivel de artritis reumatoide se registra semanalmente al estimar los parámetros ACR y en particular estudiar el número de articulaciones sensibles e hinchadas y seguir los niveles de proteína reactiva C (CRP) y la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR). Estos parámetros se estiman antes de la prueba para proporcionar un valor de "línea base" o de referencia en el día 0, y repetidamente durante el periodo de prueba y posteriormente a 8, 22 y 43 días después que el periodo de administración se termina (es decir seguimiento (FU = follow up) día FU 8, día FU 22 y día FU 43).

Las Tablas siguientes proporcionan los datos obtenidos de la prueba. Específicamente, las Tablas 16 a 21 proporcionan el número de articulaciones sensibles e hinchadas durante el curso de la prueba.

Tabla 16 - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis subcutáneas de 1.25 mg.

Pacientes	Articulaciones (no.)	Visita de Criba	Visitas			
			Día 1 Se- mana 1	Día 8 Se- mana 2	Día 15 Se- mana 3	Día 22 Se- mana 4
101	Sensible	34	34	32	-	-
	Hinchada	10	10	18	-	-
102	sensible	25	26	22	16	16
	hinchada	12	13	9	10	9
103	sensible	11	12	12	9	8
	hinchada	7	8	8	6	6

200

104	sensible	17	10	4	3	20
	hinchada	8	6	0	0	0
105	sensible	24	23	22	23	35
	hinchada	14	14	14	17	18
106	sensible	20	21	20	13	8
	hinchada	9	12	9	10	5
107	sensible	14	14	11	10	16
	hinchada	8	9	8	8	5
108	sensible	11	12	10	10	7
	hinchada	10	11	7	11	10

Tabla 16 (continúa)

		Visitas			
Pacientes - 1.25 mg grupo de dosis SC	Día 29 Sema- na 5	Día 36 Se- mana 6	Día FU 43 Semana 7	Día FU 57 Semana 9	Día FU 78 Semana 12
101	-	-	-	-	0
	-	-	-	-	0
102	24	24	30	28	29
	15	12	9	18	15
103	7	7	30	28	3
	6	6	9	18	2
104	17	9	5	5	0
	8	2	0	0	0
105	32	35	32	34	33
	18	19	19	20	20
106	9	13	12	11	11
	5	6	5	5	7
107	14	14	14	11	11

	5	5	6	6	6
108	4	8	8	2	13
	9	11	7	6	8

Tabla 17 - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis subcutáneas de 6.25 mg.

5

Pacientes - 6.25 mg grupo de dosis SC	Arti- cula- ciones (no.)	Visitas				
		Visi- ta de Criba	Día 1 Se- mana 1	Día 8 Se- mana 2	Día 15 Se- mana 3	Día 22 Se- mana 4
201	sensible	16	17	15	14	12
	hinchada	9	10	7	6	6
202	sensible	14	10	10	10	8
	hinchada	10	8	6	6	4
203	sensible	15	14	10	8	10
	hinchada	11	11	10	9	9
204	sensible	19	22	16	0	0
	hinchada	10	10	5	0	0
205	sensible	21	21	0	0	14
	hinchada	9	9	0	0	14
206	sensible	16	16	15	13	13
	hinchada	10	12	12	10	14
207	sensible	17	28	28	11	9
	hinchada	11	12	13	7	10
208	sensible	13	12	9	8	9
	hinchada	10	10	9	9	10

Tabla 17 (continúa)

202

		Visitas			
Pacientes	Día	Día			
- 6.25 mg	29	36	Día FU	Día FU	Día FU
grupo de	Se-	Se-	43	57	78
dosis SC	mana	mana	Sema-	Sema-	Semana
	5	6	na 7	na 9	12
201	15	13	11	9	9
	5	6	5	6	6
202	8	8	8	9	13
	4	4	4	4	6
203	10	8	7	5	5
	10	7	7	6	7
204	10	2	10	11	0
	4	0	0	10	0
205	30	10	37	-	12
	16	6	25	-	8
206	17	19	-	-	5
	11	11	-	-	4
207	15	17	14	18	22
	11	8	10	11	10
208	11	10	-	-	12
	10	9	-	-	8

Tabla 18 - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis subcutáneas de 12.5 mg.

		Visitas
--	--	---------

Pacientes - 12..5 mg grupo de dosis SC	Arti- cula- ciones (no.)	Visi- ta de Criba	Día 1 Se- mana 1	Día 8 Se- mana 2	Día 15 Se- mana 3	Día 22 Se- mana 4
301	sensible	18	18	16	16	16
	hinchada	8	8	8	8	8
302	sensible	36	36	34	35	31
	hinchada	20	20	19	19	17
303	sensible	20	19	19	16	15
	hinchada	10	11	12	13	13
304	sensible	10	10	10	10	10
	hinchada	6	6	6	6	6
305	sensible	16	16	14	14	13
	hinchada	8	8	8	8	6
306	sensible	27	27	18	18	12
	hinchada	14	14	20	11	16
307	sensible	25	23	23	17	17
	hinchada	8	8	8	8	8
308	sensible	20	20	18	8	8
	hinchada	12	12	8	6	6

Tabla 18 (continúa)

Pacientes - 12..5 mg grupo de dosis SC	Día 29 Semana 5	Visitas			
		Día 36 Se- mana 6	Día FU 43 Semana 7	Día FU 57 Semana 9	Día FU 78 Semana 12
301	16	16	20	14	14

	8	8	6	6	6
302	-	-	-	-	30
	-	-	-	-	18
303	14	16	18	-	19
	14	13	14	-	14
304	10	10	10	10	8
	6	6	6	6	4
305	13	13	12	10	10
	6	6	6	4	4
306	23	28	-	-	29
	13	17	-	-	24
307	17	17	15	13	11
	8	8	6	6	4
308	8	8	8	8	4
	5	6	6	6	4

Tabla 19 - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis subcutáneas de 25 mg.

Pacientes - 25 mg grupo de dosis SC	Arti- cula- ciones (no.)	Cri- ba de Visi- ta	Visitas			
			Día 1 Se- man a 1	Día 8 Se- mana 2	Día 15 Se- mana 3	Día 22 Se- mana 4
401	sensible	16	17	19	22	13
	hinchada	10	11	8	9	12
402	sensible	23	21	10	10	10
	hinchada	8	11	5	6	6
403	sensible	10	10	10	8	8
	hinchada	8	8	8	6	5
404	sensible	17	16	15	15	13

	hinchada	9	11	10	6	7
405	sensible	10	10	8	8	8
	hinchada	6	6	4	4	4
406	sensible	11	11	11	11	11
	hinchada	6	6	6	6	5
407	sensible	13	20	16	18	4
	hinchada	7	10	6	8	0
408	sensible	11	11	8	8	7
	hinchada	9	9	5	5	4

Tabla 19 (continúa)

		Visitas			
Pacientes	Día	Día			
- 25 mg grupo de dosis SC	29	36			Día FU
	Se-	Se-	Día FU	Día FU	78
	mana	mana	43	57	Semana
	5	6	Semana 7	Semana 9	12
401	13	12	11	9	6
	11	8	5	8	5
402	9	8	7	6	7
	5	4	3	3	3
403	10	10	7	6	8
	5	5	5	5	5
404	14	14	16		
	7	7	7		
405	8	8	10	-	10
	4	4	6	-	6
406	12	8	8	6	8
	5	3	3	2	4
407	2	0	4	14	
	0	0	0	8	

408	5	4	4	-	8
	6	6	3	-	6

Tabla 20 - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis subcutánea de 50 mg.

Pacientes - 50 mg grupo de dosis SC	Arti- cula- ciones (no.)	Cri- ba de Vi- sita	Visitas			
			Día 1 Se- mana 1	Día 8 Se- mana 2	Día 15 Se- mana 3	Día 22 Se- mana 4
501	sensible	10	10	12	15	12
	hinchada	10	10	10	10	10
502	sensible	14	15	11	16	12
	hinchada	5	9	10	10	7
503	sensible	13	13	11	7	7
	hinchada	8	8	8	6	6
504	sensible	11	12	10	8	7
	hinchada	8	8	8	6	7
505	sensible	12	13	8	2	1
	hinchada	7	7	5	0	0
506	sensible	36	48	32		
	hinchada	8	8	4		
507	sensible					
	hinchada					
508	sensible					
	hinchada					

Tabla 20 (continúa)

5

		Visitas
--	--	---------

207

Pacientes - 50 mg grupo de dosis SC	Día 29 Sema- na 5	Día 36 Se- mana 6	Día FU 43 Semana 7	Día FU 57 Semana 9	Día FU 78 Semana 12
501	15	16	-	-	15
	13	13	-	-	13
502	7	8			
	4	5			
503	6	6	5	5	
	3	3	2	3	
504	11	11	13		
	7	7	8		
505					
506					
507					
508					

Tabla 21 - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis intravenosas de 6.25 mg.

Pacientes - 6.25 mg grupo de dosis IV	Arti- cula- ciones (no.)	Cri- ba de Visi- ta	Visitas			
			Día 1 Se- mana 1	Día 8 Se- mana 2	Día 15 Se- mana 3	Día 22 Se- mana 4
601	sensible	23	20	24	39	33

208

	hinchada	13	15	15	25	26
602	sensible	41	43	33	15	12
	hinchada	13	12	8	10	10
603	sensible	26	22	28	22	24
	hinchada	10	4	8	4	4
604	sensible	28	26	31	27	14
	hinchada	8	8	8	10	6
605	sensible	34	38	38	36	
	hinchada	22	18	22	20	
606	sensible	12	14			
	hinchada	8	9			
607	sensible	27	27			
	hinchada	17	19			
608	sensible					
	hinchada					

Tabla 21 (continúa)

		Visitas			
Pacientes - 6.25 mg grupo de dosis IV	Día 29 Se- mana 5	Día 36 Se- mana 6	Día FU 43 Semana 7	Día FU 57 Semana 9	Día FU a 78 Semana 12
601	26	31			
	20	21			
602	30	17	19	14	
	6	5	5	7	
603	24				
	6				
604	10	11	7	9	
	2	2	3	1	
605					

299

606					
607					
608					

La Figura 14 muestra el por ciento de pacientes de los grupos de dosis que reciben 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg y 25 mg subcutáneos de BT061 logrando cuando menos un 20% de mejora de parámetros ACR relevantes durante el curso de la prueba, y el por ciento de pacientes que logran al menos una respuesta ACR20 en la semana 7.

En particular, puede verse que el 50% de los pacientes en el grupo de dosis subcutáneas de 25 mg (es decir 4 de los 8 pacientes en donde 2 de los pacientes reciben un placebo) logrando al menos un 20% de mejora de parámetros ACR relevantes en la semana 6. Estas cifras aumentan a 5 de los 8 pacientes en la semana 7, es decir 5 de 8 pacientes lograron al menos ACR20. Un paciente en este grupo de dosis logró una mejora del más del 50% de parámetros ACR relevantes en la semana 5 y 6 (conjunto completo de datos no mostrado).

Resultados positivos también se obtuvieron por pacientes en otros grupos de dosis. Un paciente en el grupo de dosis subcutáneas de 6.25 mg, logró al menos un 50% de mejora de parámetros ACR relevantes en la semana 4, mientras que otro logró al menos un 70% de mejora de parámetros ACR relevantes en la semana 3 (conjunto de datos completo no se muestra).

Las Figuras 15A y 15B muestran resultados para el

número de articulaciones sensibles e hinchadas que exhiben pacientes del grupo de dosis subcutáneas BT061 de 25 mg durante un periodo de seis semanas. Varios pacientes exhibieron una reducción en el número de articulaciones sensibles e hinchadas sobre un periodo del tratamiento. Los resultados de un paciente que responde o respondiente y un paciente no respondiente de este grupo de dosis se muestra en las Figuras 16A y 16B, respectivamente. El respondiente muestra una mejora significativa en el número de articulaciones sensibles e hinchadas y en niveles de dolor.

Una reducción en los números de articulaciones sensibles e hinchadas también se ve en pacientes de los otros grupos de dosis. Las Figuras 17A, 17B, 18A y 18B muestran los números de articulaciones sensibles en los grupos de dosis subcutáneas de 1.25 mg, 6.25 mg subcutáneas, 50 mg subcutáneas y 6.25 mg intravenosa respectivamente, sobre el curso de la prueba y en las semanas posteriores.

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de
5 activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 10 mg a 200 mg.

2. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el agente se
10 va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 15 mg a 80 mg.

3. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el agente se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 20
15 mg a 60 mg.

4. Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la
20 composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 5 a 60 mg/m² de área superficial del cuerpo del sujeto.

5. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la
25 composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 6 a 50 mg/m².

6. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis
30 del agente de 8 a 40 mg/m².

7. Una composición farmacéutica para tratar una

enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis
5 del agente de 0.1 a 2 mg/kg.

8. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.15 a 1.5 mg/kg.

10 9. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.2 a 1 mg/kg.

10. Una composición farmacéutica de conformidad
15 con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque la enfermedad autoinmune se elige de psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo-1, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, tireoiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune,
20 lupus sistémico eritematoso y enfermedades relacionadas a transplante tales como de injerto-contrahospedero o aspectos de tolerancia general de órganos.

11. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la
25 enfermedad es psoriasis.

12. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque la composición es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al menos una mejora del 40% en la calificación de Área de
30 psoriasis e Índice de Severidad (PASI) del paciente.

13. Una composición farmacéutica de conformidad

con la reivindicación 12, caracterizada porque la composición es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al menos un 50% de mejora en la calificación de Área de Psoriasis e Índice de Severidad (PASI) del paciente.

5 14. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la enfermedad es artritis reumatoide.

 15. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada
10 porque la composición es para administración parenteral.

 16. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque la composición es para administración intramuscular, administración intravenosa o administración subcutánea.

15 17. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque la composición es para administración intravenosa y se proporciona en un volumen de dosis de 0.5 a 500 ml o en una forma para dilución al volumen de dosis de 0.5 a 500 ml.

20 18. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque el volumen de dosis es 15 a 25 ml.

 19. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque la
25 composición es para administración subcutánea y se proporciona en un volumen de dosis de 0.1 a 3 ml.

 20. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque el volumen de dosis es 0.5 a 1.5 ml.

30 21. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque la

composición es para administración intramuscular y se proporciona en un volumen de dosis de 0.1 a 3 ml.

22. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque el volumen
5 de dosis es 0.5 a 1.5 ml.

23. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, que es para utilizar como una sola dosis o como parte de una pluralidad de dosis.

10 24. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque la composición es parte de una pluralidad de dosis y cada dosis se va a administrar en forma diaria, cada dos días, semanal, cada dos semanas, cada cuatro semanas, cada seis
15 semanas, cada doce semanas, cada veinticuatro semanas, cada cuarenta y ocho semanas, cada seis meses o cada año.

25. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es psoriasis y la dosis se va a
20 administrar una vez cada dos semanas.

26. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es psoriasis y la dosis se va a administrar una vez cada cuatro semanas.

25 27. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide y la dosis se va a administrar una vez cada dos semanas.

28. Una composición farmacéutica de conformidad
30 con la reivindicación 24, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide y la dosis se

va a administrar una vez cada cuatro semanas.

29. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde el
5 agente está presente en una concentración de 10 a 150 mg/ml.

30. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque el agente está presente en una concentración de 15 a 75 mg/ml.

10 31. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada porque el agente está presente en una concentración de 20 a 60 mg/ml.

32. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31,
15 caracterizada porque el volumen de la composición es de 0.5 a 500 ml.

33. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque el volumen de la composición es de 15 a 25 ml.

20 34. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, caracterizada porque el volumen de la composición es 0.5 a 3 ml.

35. Una composición farmacéutica de conformidad
25 con la reivindicación 34, caracterizada porque el volumen de la composición es 1 a 1.5 ml.

36. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque dentro del periodo de 10 minutos después del inicio
30 de administración a 96 horas después de completar la administración, el nivel de una citoquina en el plasma de

sangre del sujeto es menor a un aumento de 20 veces del nivel inmediatamente antes de administración, y en donde la citoquina se elige de IFN- γ , TNF- α , IL-6 y IL-2.

37. Una composición farmacéutica de conformidad
5 con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, caracterizada porque dentro del periodo de 10 minutos después del inicio de administración a 96 horas después de completar la administración, el nivel de una citoquina en el plasmas de sangre de un sujeto es menor a un aumento de
10 20 veces del valor límite superior de lo normal (ULN), en donde la citoquina se elige de IFN- γ , TNF- α , IL-6 y IL-2, y en donde el valor ULN es 3.8, 2.8, 4.4 y 19.4 pg/ml respectivamente.

38. Una composición de conformidad con cualquier
15 reivindicación precedente, caracterizada porque dentro del periodo de 72 a 96 horas después de administración el conteo celular de linfocitos CD4+ en el plasma de sangre del sujeto es cuando menos 200 células/ μ l.

39. Una composición farmacéutica de conformidad
20 con la reivindicación 38, caracterizada porque el conteo celular es al menos 250 células/ μ l.

40. Una composición farmacéutica de conformidad
con la reivindicación 38 ó 39, caracterizada porque el agente se administra subcutáneamente y la dosis del agente
25 es hasta 39.5 mg.

41. Una composición farmacéutica de conformidad
con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, caracterizada porque el agente se administra en forma subcutánea y la dosis del agente es hasta 39.5 mg, y en
30 donde durante el periodo de 0 a 72 horas después de administración, el recuento celular de linfocitos CD4+ en

el plasma de sangre del sujeto es al menos 300 células/ μ l.

42. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, caracterizada porque durante el periodo de 72 horas a 30 días después de administración, el recuento celular de linfocitos CD4+ en el plasma sanguínea del sujeto es al menos 300 células/ μ l.

43. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque el agente es un anticuerpo monoclonal humanizado o su fragmento o derivado.

44. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 43, caracterizada porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 o su fragmento o derivado.

45. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado, o su fragmento o derivado que tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias polipéptido:

- dominio V cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYVLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPELLIYLASILE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 2).

o dominios V que comprenden secuencias de polipéptidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

46. Una composición farmacéutica de conformidad

con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón.

47. Un método para tratamiento de una enfermedad autoinmune, este método comprende administrar una composición farmacéutica a un sujeto, en donde la composición comprende un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, y en donde el agente se administra al sujeto en una dosis como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

48. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque la enfermedad autoinmune es como se define en la reivindicación 10, reivindicación 11 o reivindicación 14.

49. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 47 o 48, caracterizado porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado, derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón.

50. Un método para tratamiento de conformidad con la reivindicación 47 o la reivindicación 48, caracterizado porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado que tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias de péptidos:

- dominio V cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG
ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ

ID NO: 2).

o dominios V que comprenden secuencias de polipéptidos que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

5 51. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es psoriasis y la dosis se va a administrar una vez cada semana.

10 52. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide y la dosis se va a administrar una vez cada semana.

15 53. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque dentro del periodo de 3 a 6 horas después de administración, el recuento celular de linfocitos CD4+ en el plasma sanguíneo del sujeto es inferior a 250 células/ μ l.

20 54. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, caracterizada porque dentro del periodo de 72 a 96 horas después de administración, el recuento celular de linfocitos CD4+ en el plasma sanguíneo del sujeto es igual a o superior que 50% del recuento celular del sujeto
25 inmediatamente antes de administración.

 55. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, caracterizada porque la mejora se ve a 56 días después de administración de una sola dosis de la composición.

30 56. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 12 o la reivindicación 13,

caracterizada porque la mejora se ve a 75 días después de administración de una sola dosis de la composición.

221

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoimmune, que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente
5 capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 10 mg a 200 mg.

10

15

20

222

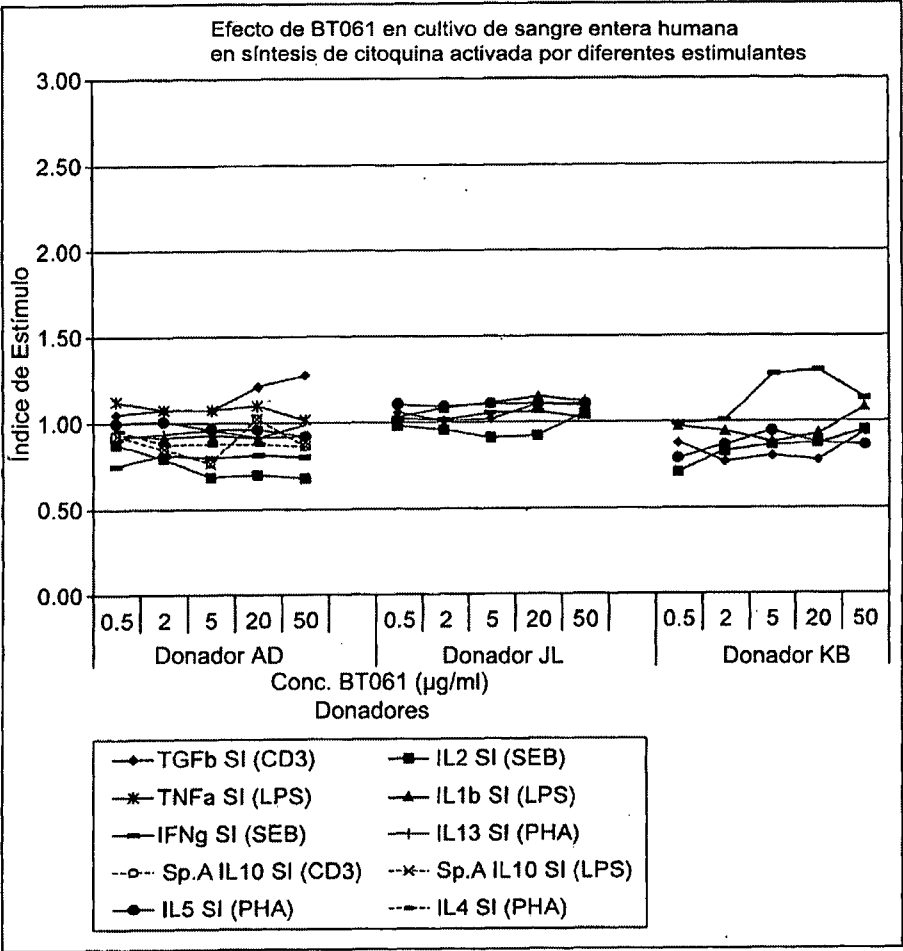


FIG. 1

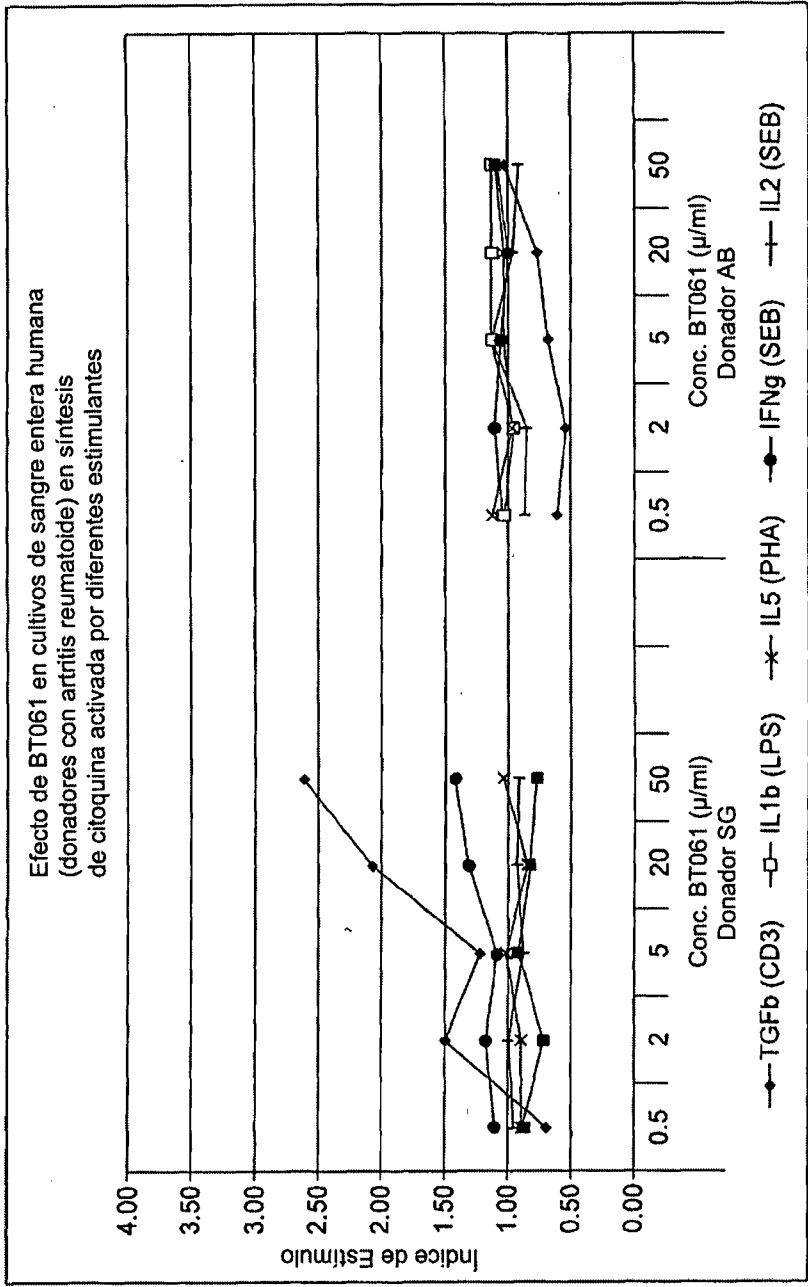


FIG. 2

229

mB-F5 V_H

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

FIGURE 3

225

mB-F5 V_k

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

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 5

227

GGA GGA TCC AAT TAT CTG CTG ACT TAT AAT ACT ACT AGA AAG CAA ATT TAA ATG ACA

TAT TTC AAT TAT ATC TGA GAC AGC GTG TAT AAG TTT ATG TAT AAT CAT TGT CCA TTC

CTG ACT ACA GGT GCC TAC GGG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT
D I V M T Q S P D S L A

GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA
V S L G E R A T I N C R A S K S V S T

TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG
S G Y S Y I Y W Y Q Q K P G Q P P K L

CTC ATT TAC CTT GCA TCC ATC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC
L I Y L A S I L E S G V P D R F S G S

GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA
G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A

GTT TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG
V Y Y C Q H S R E L P W T F G Q G T K

GTG GAA ATC AAA CGT GAG TAG AAT TTA AAT TTT AAG CTT CTT
V E I K

FIGURE 6

228

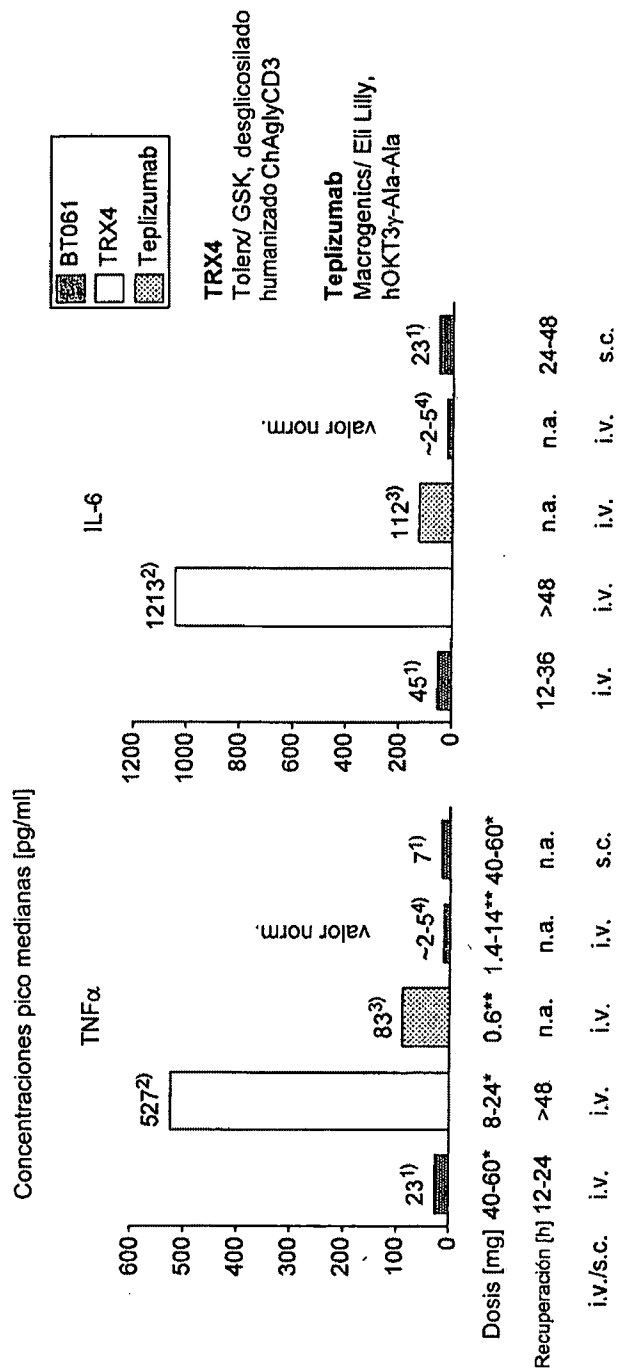


FIG. 7A

FIG. 7B

229

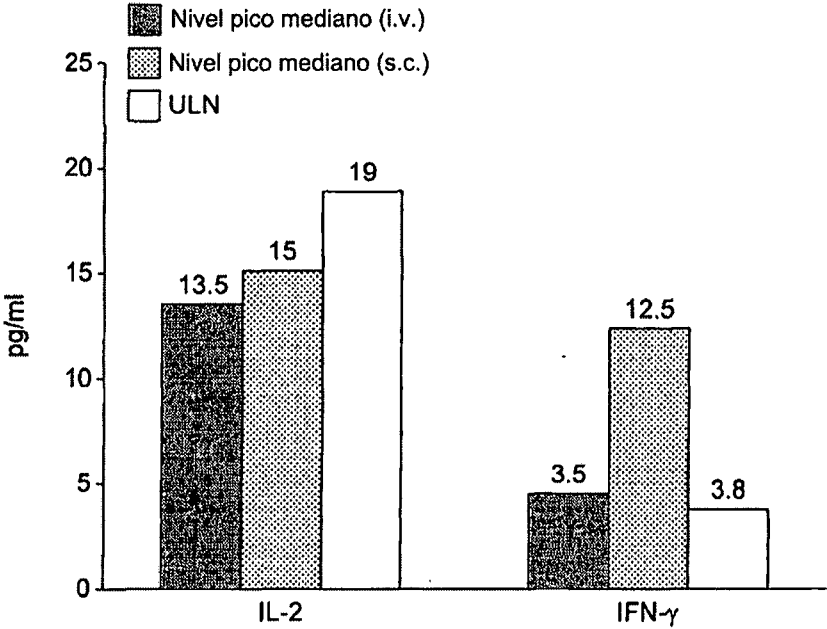


FIGURA 8

230

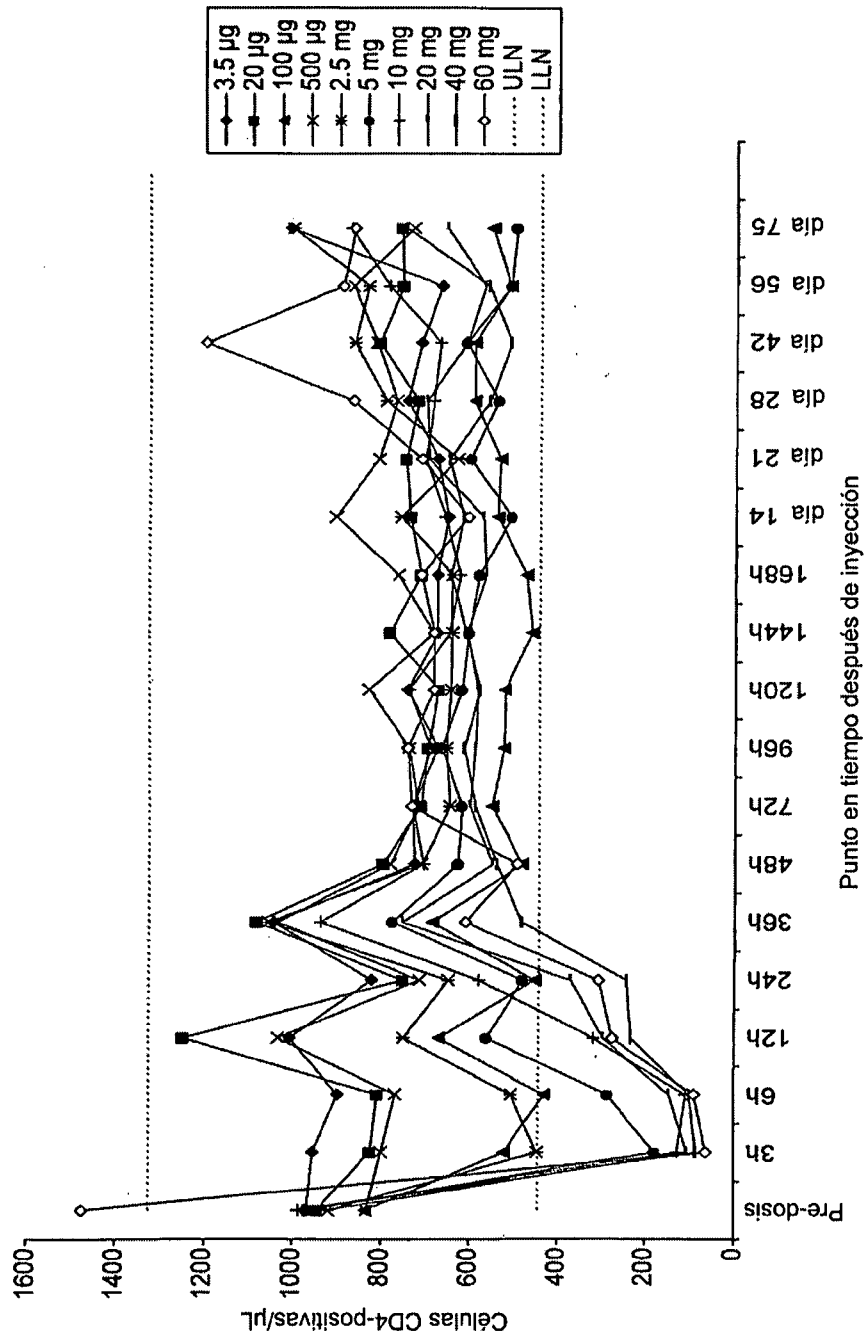


FIGURA 9

231

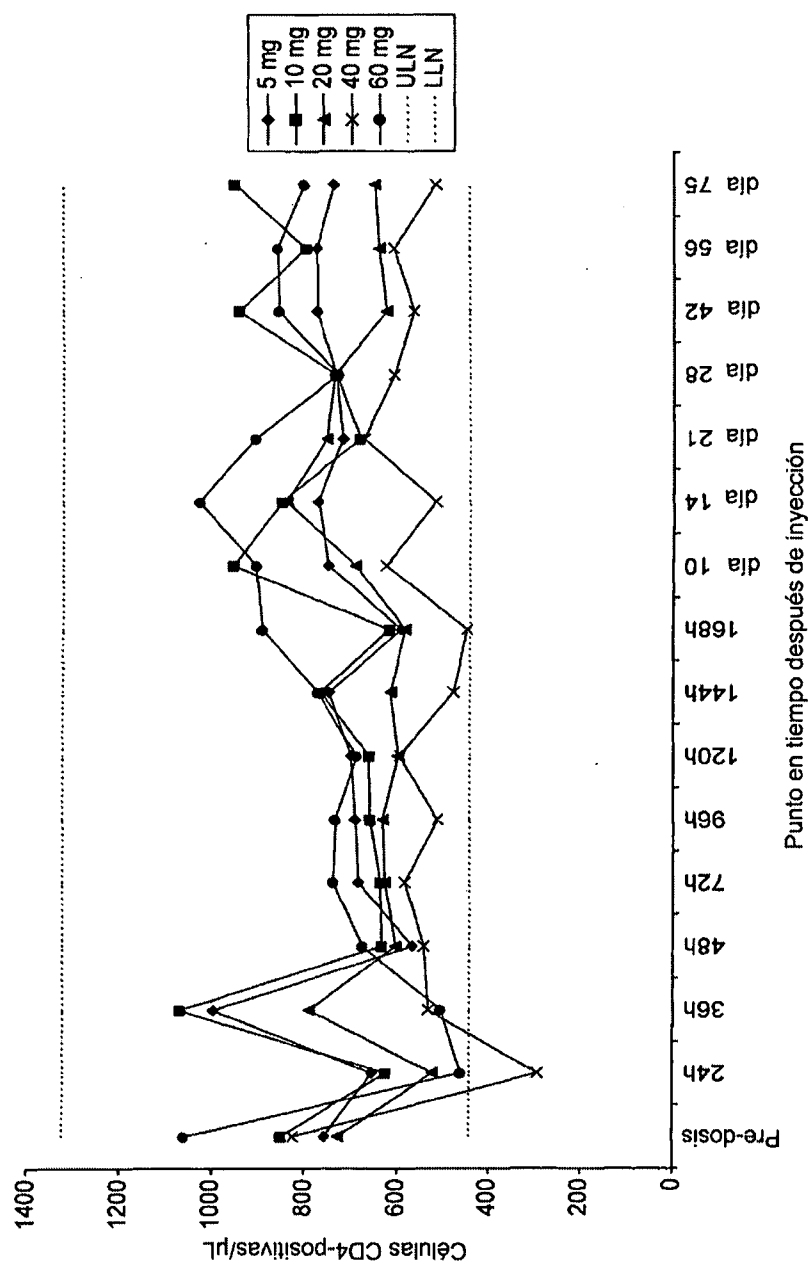


FIGURA 10

232

11/36

Paciente 1: 0.5mg o placebo

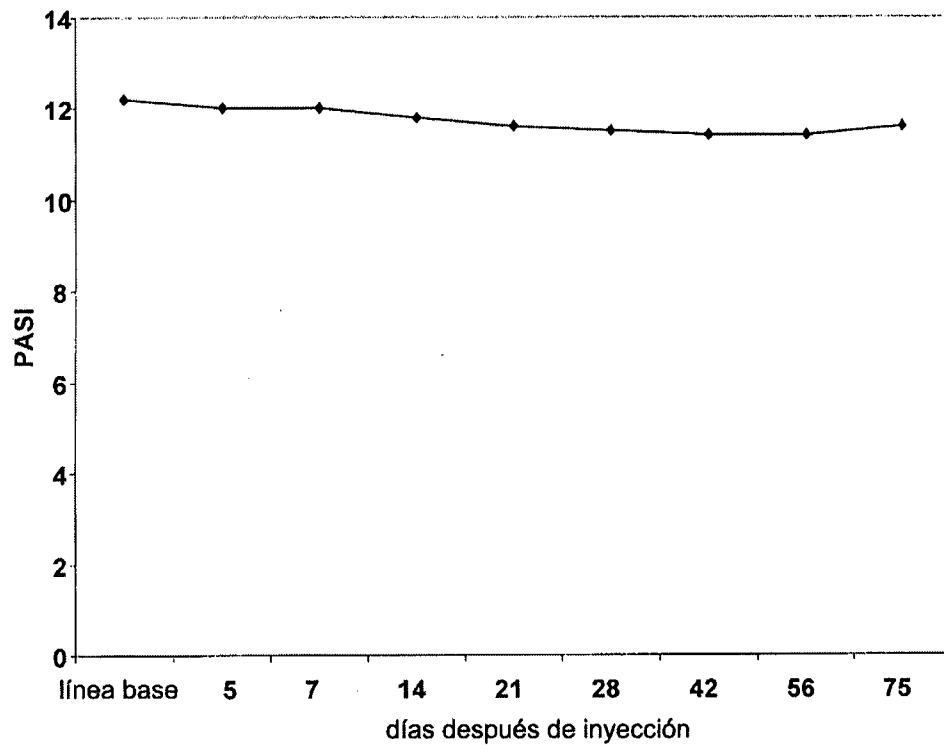


FIGURA 11A

233

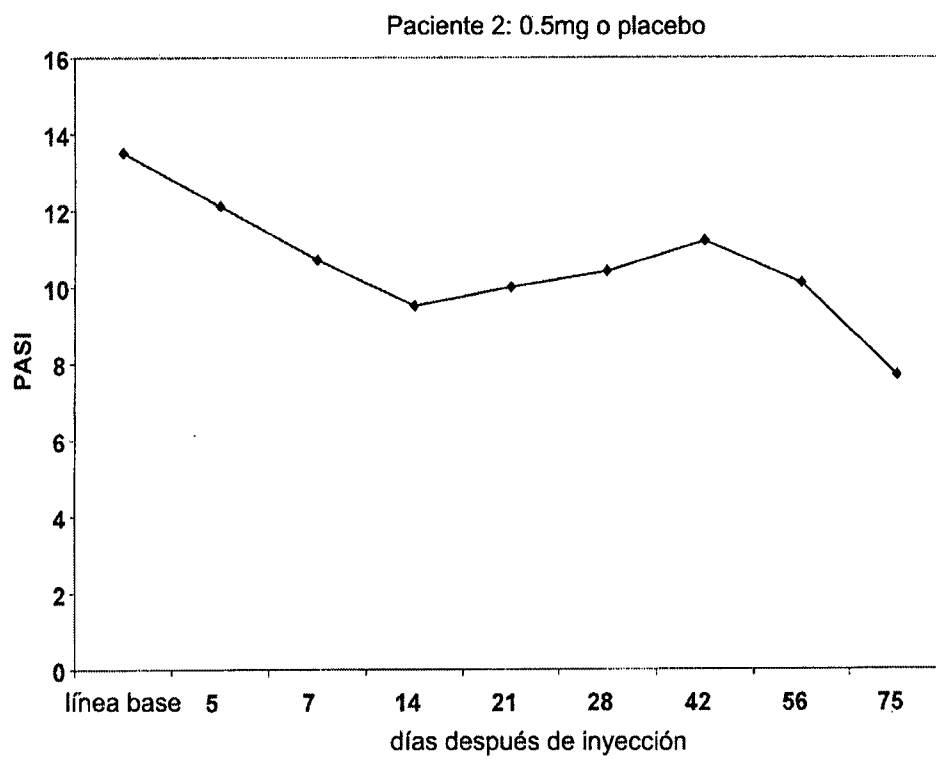


FIGURA 11B

2351

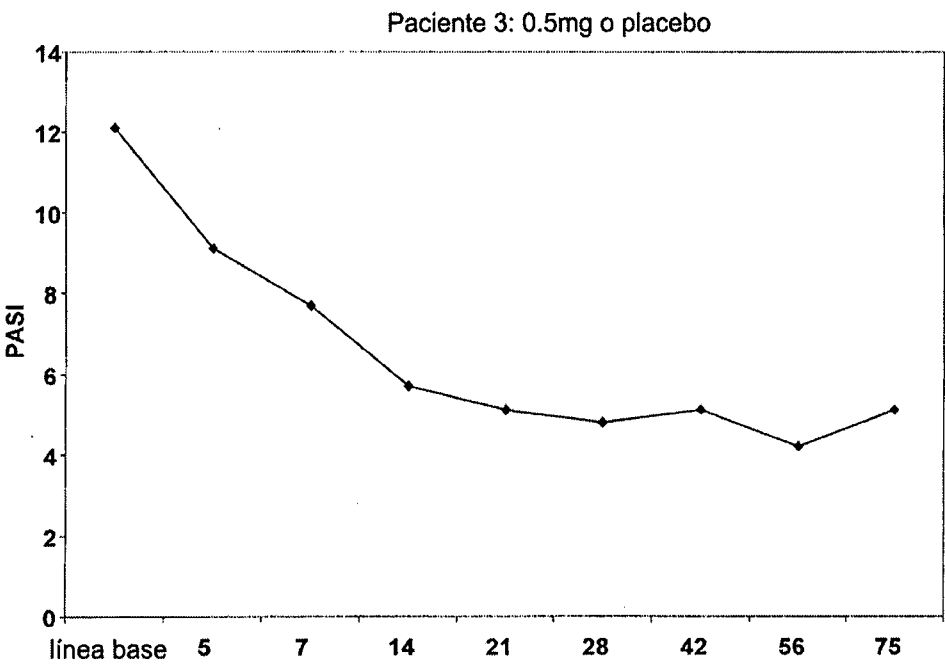


FIGURA 11C

2835

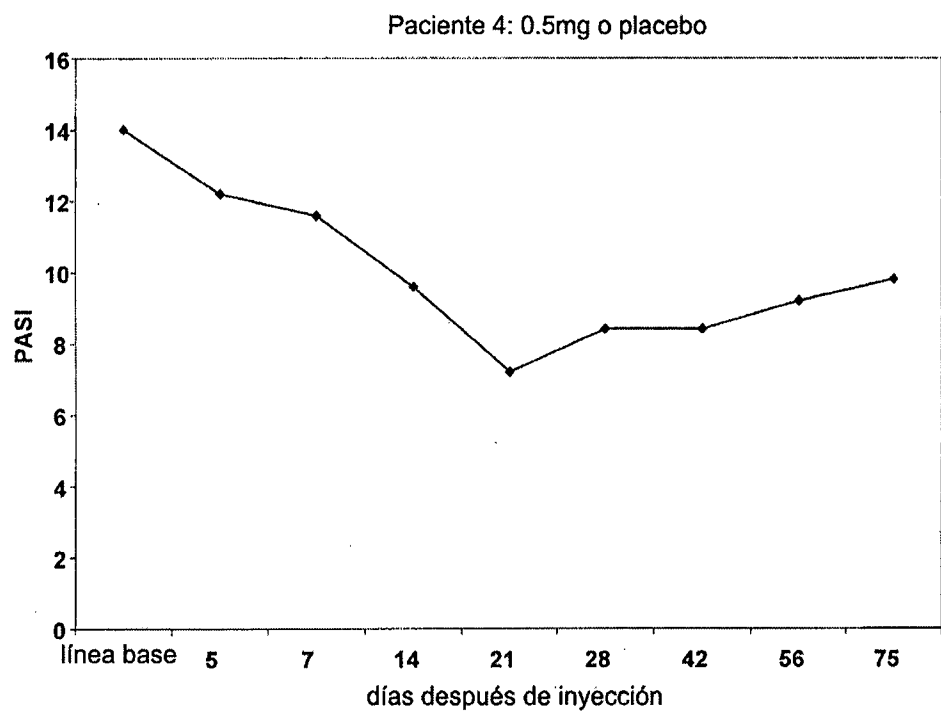


FIGURA 11D

23b

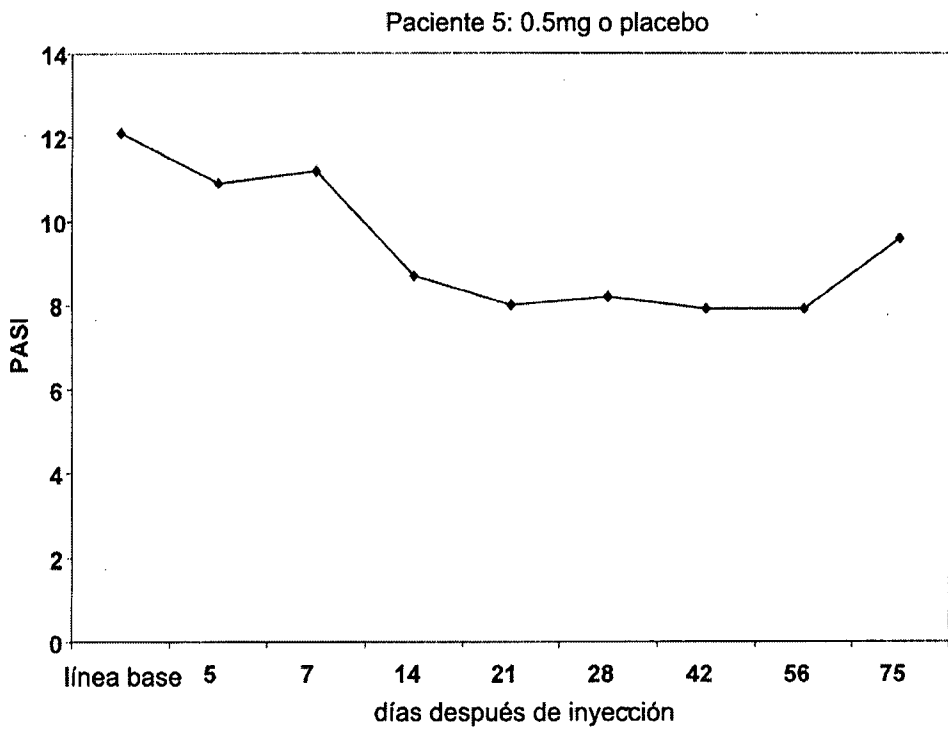


FIGURA 11E

2507

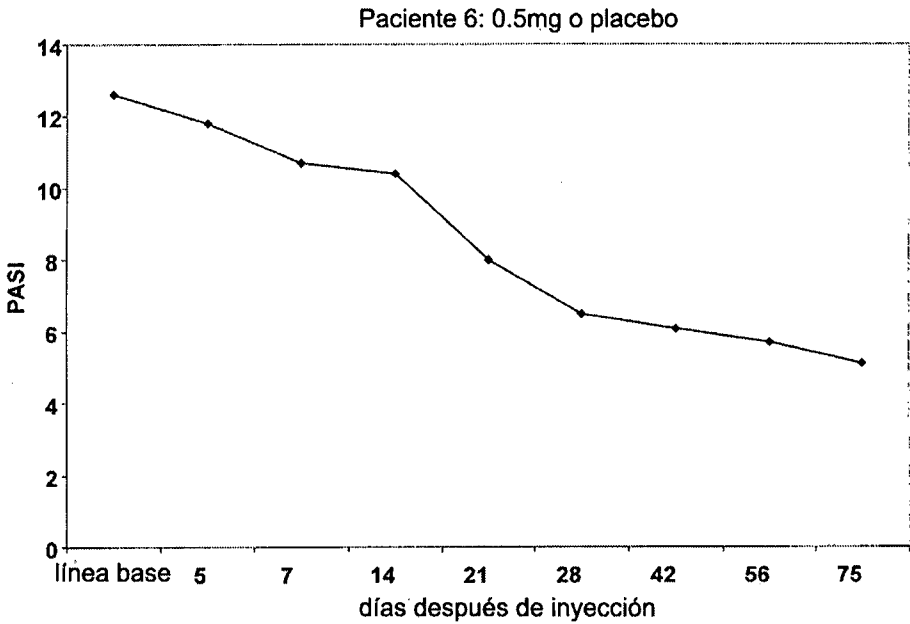


FIGURA 11F

238

17/36

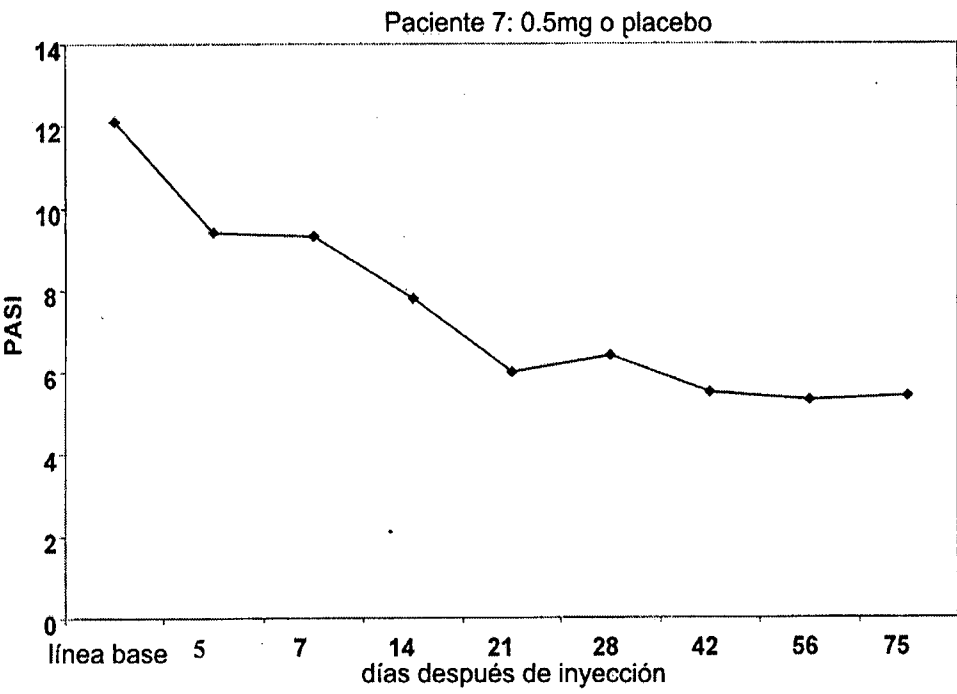


FIGURA 11G

239

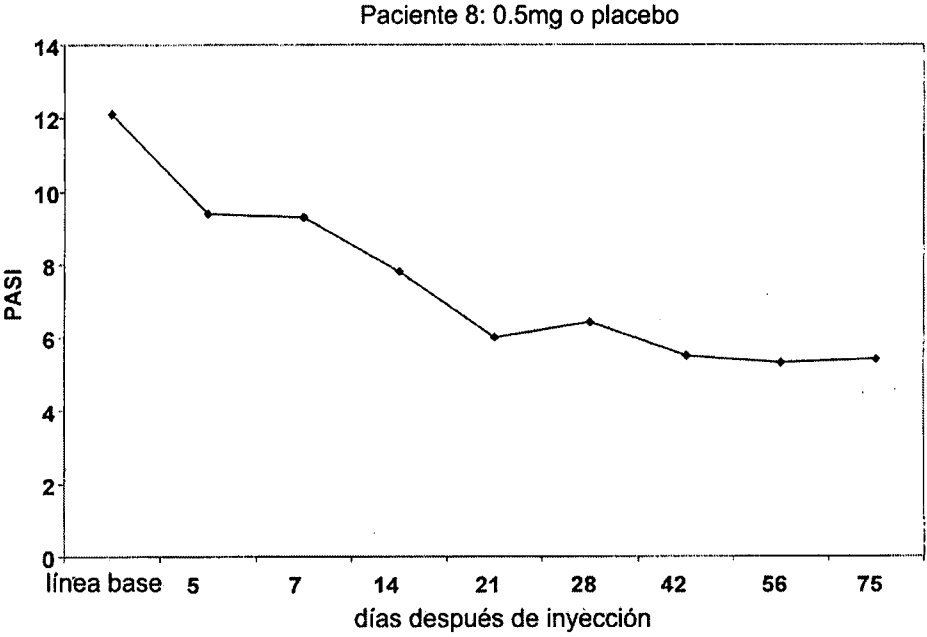


FIGURA 11H

240

Paciente 1: 2.5mg o placebo

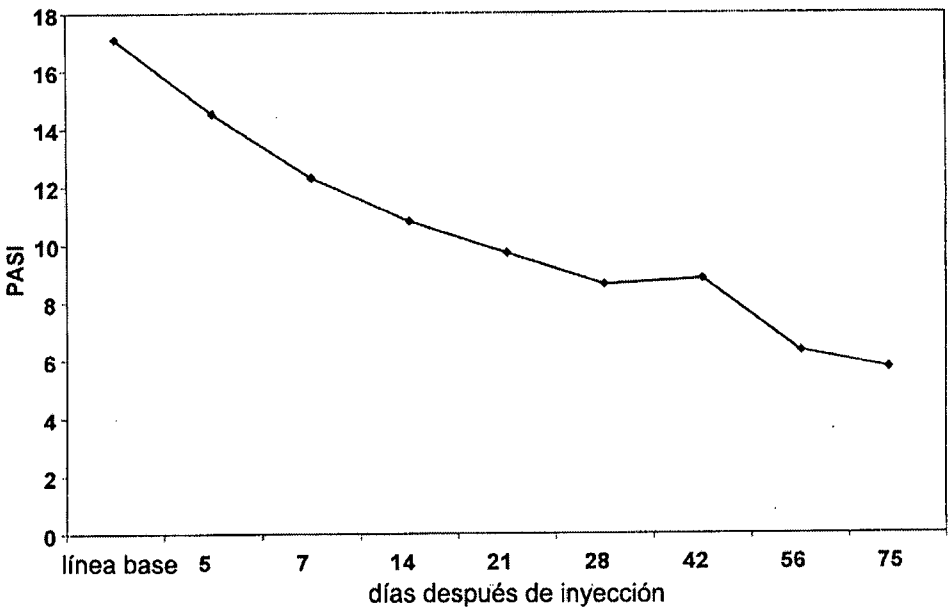


FIGURA 12A

241

Paciente 2: 2.5mg o placebo

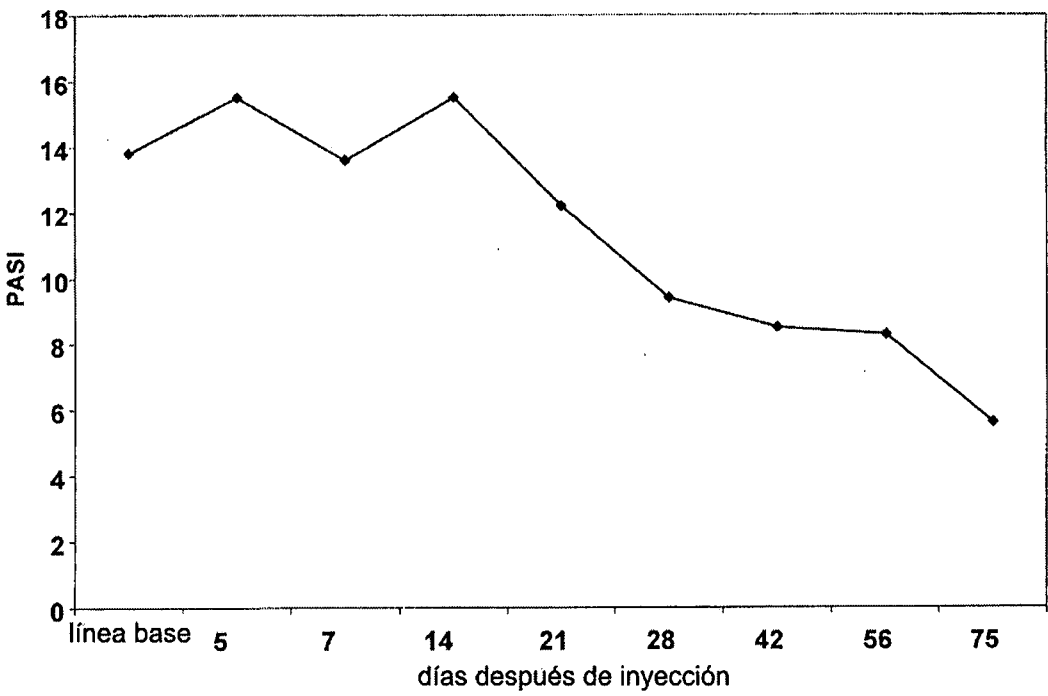


FIGURA 12 B

242

Paciente 3: 2.5mg o placebo

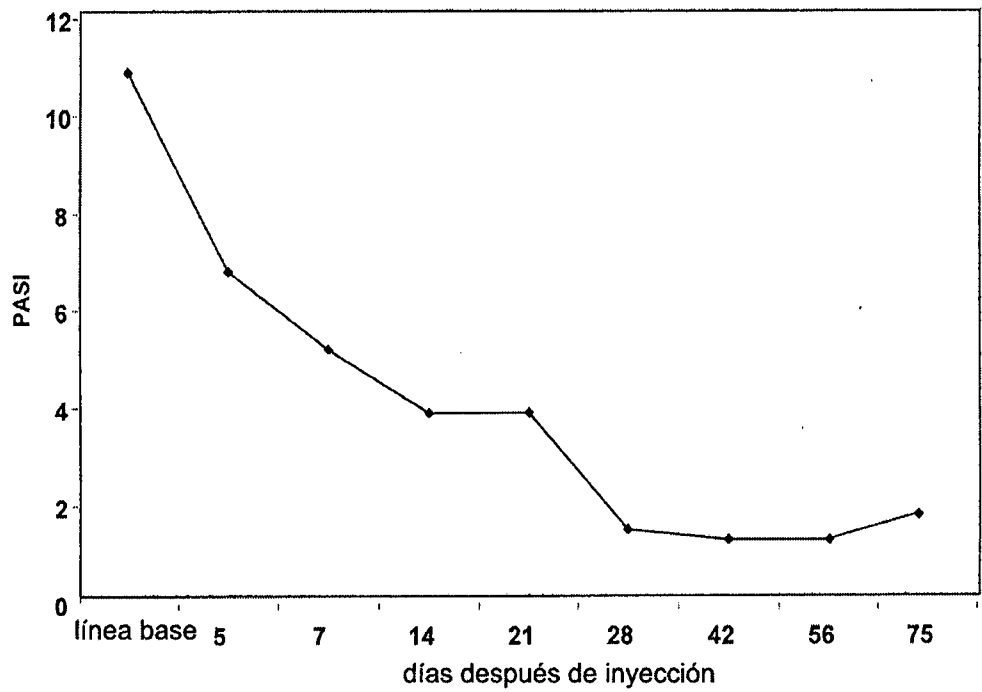


FIGURA 12 C

273

Paciente 4: 2.5mg o placebo

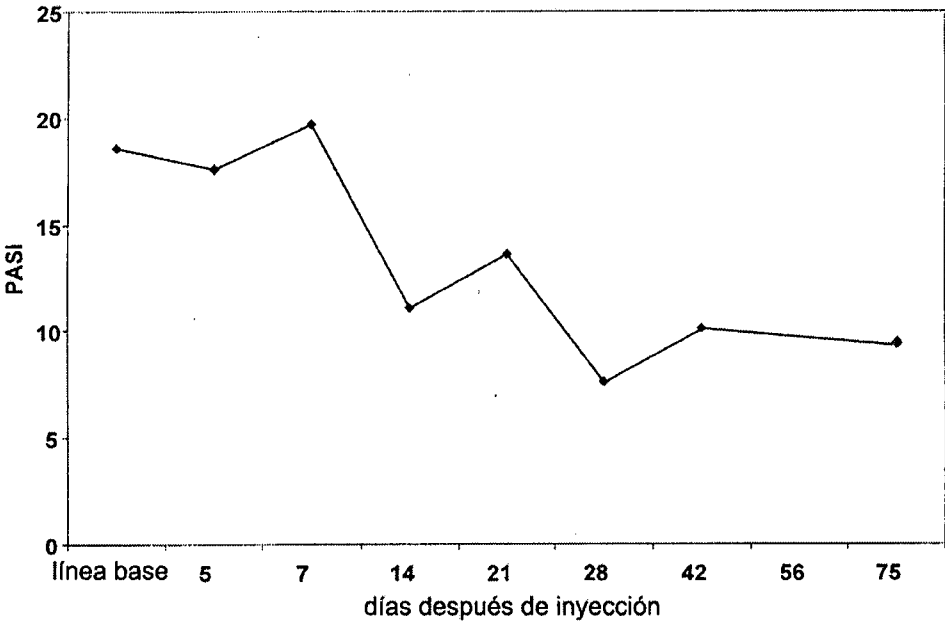


FIGURA 12 D

274

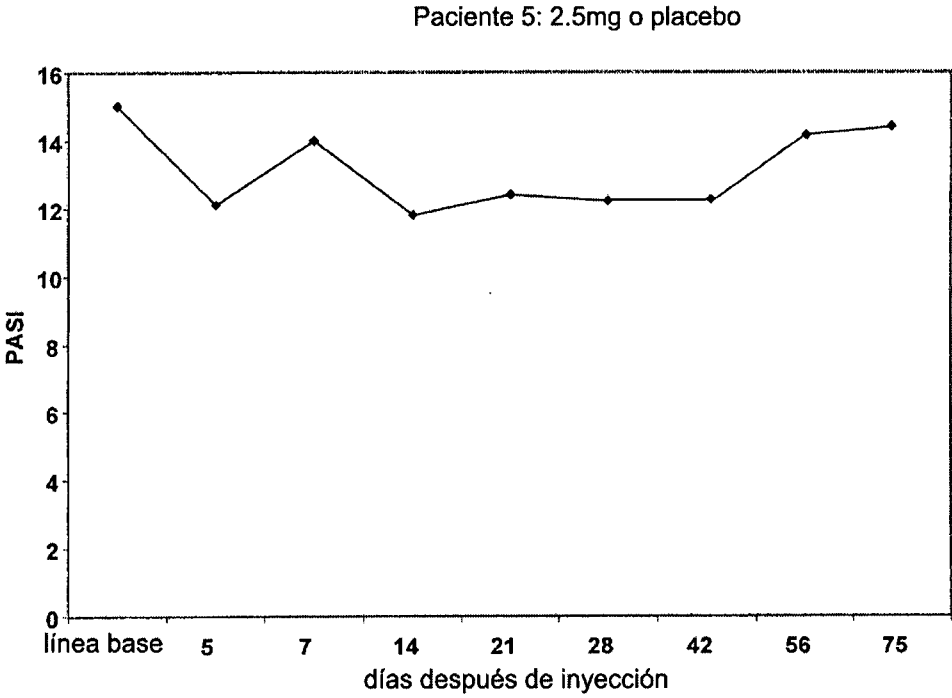


FIGURA 12 E

2495

Paciente 6: 2.5mg o placebo

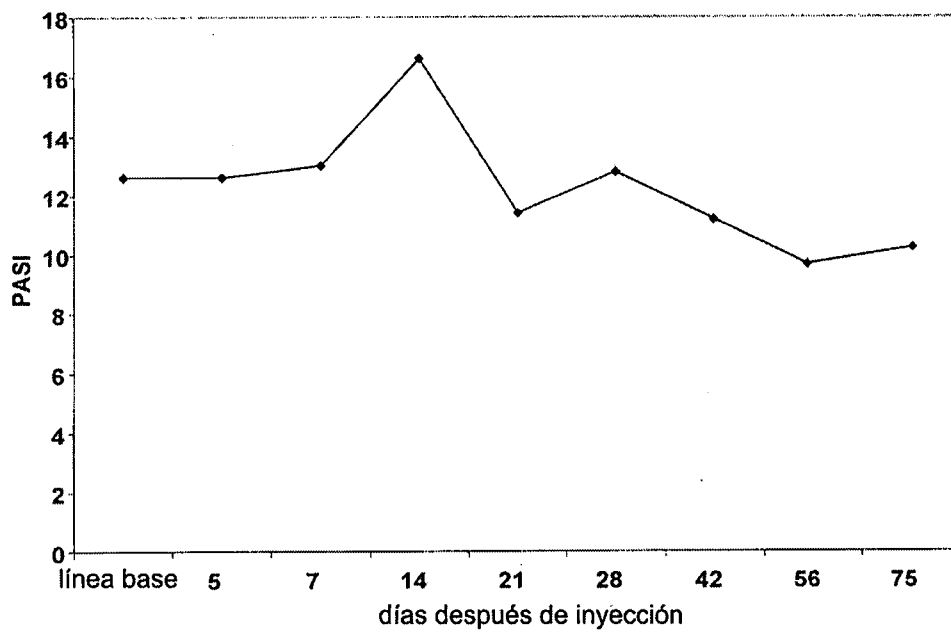


FIGURA 12 F

246

Paciente 7: 2.5mg o placebo

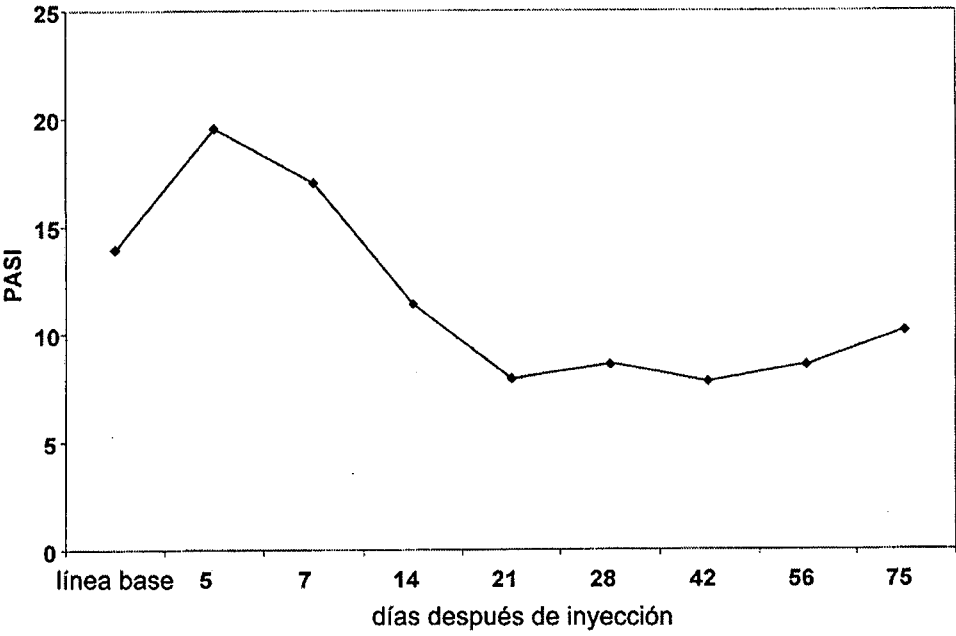


FIGURA 12 G

277

Paciente 8: 2.5mg o placebo

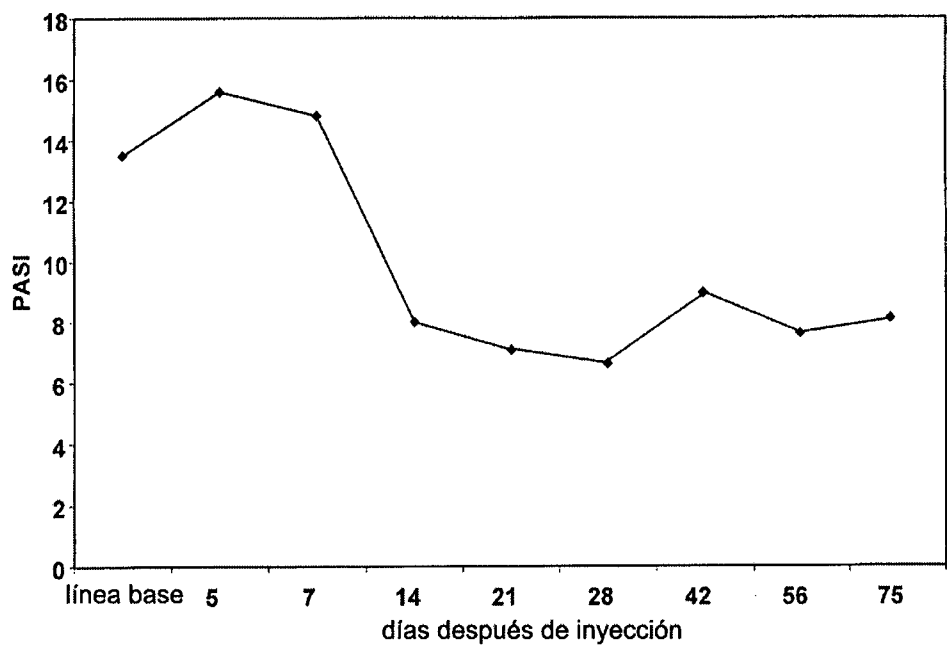
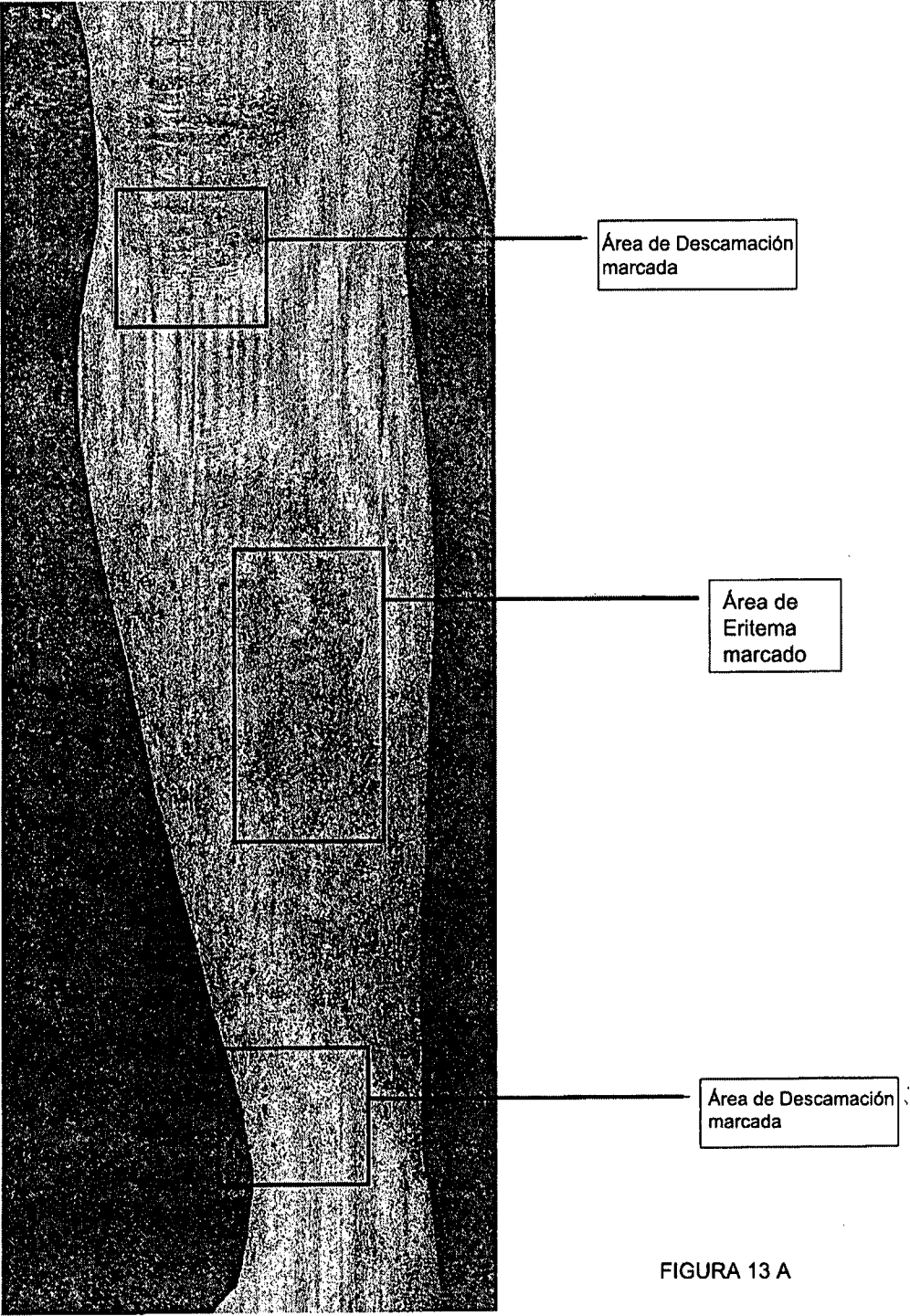


FIGURA 12 H

248



249

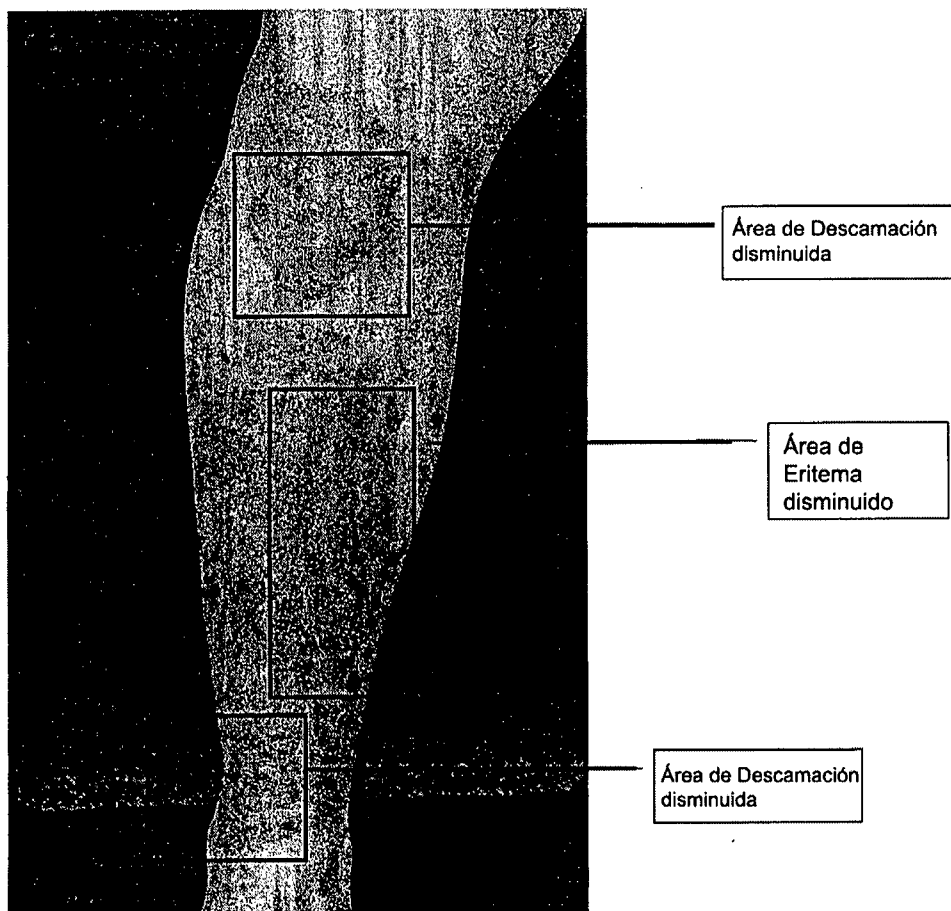


FIGURA 13 B

250

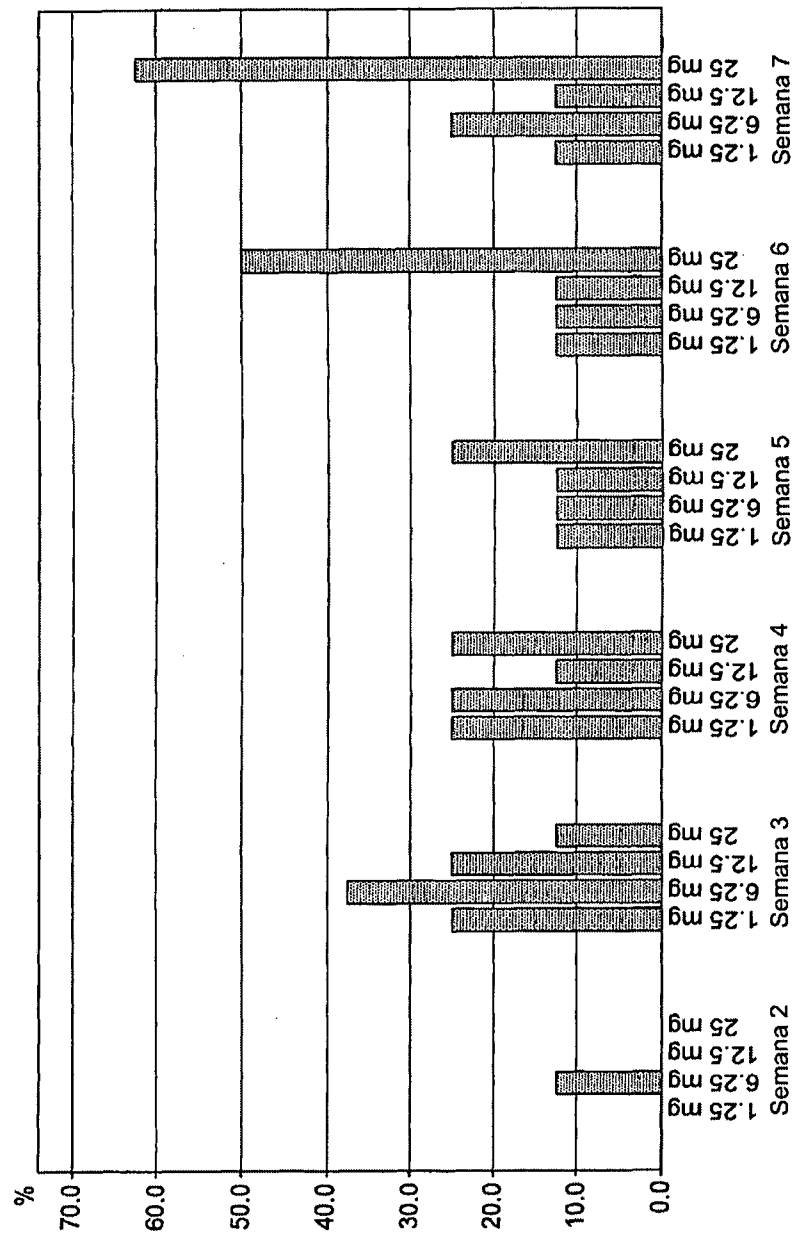


FIGURA 14

251

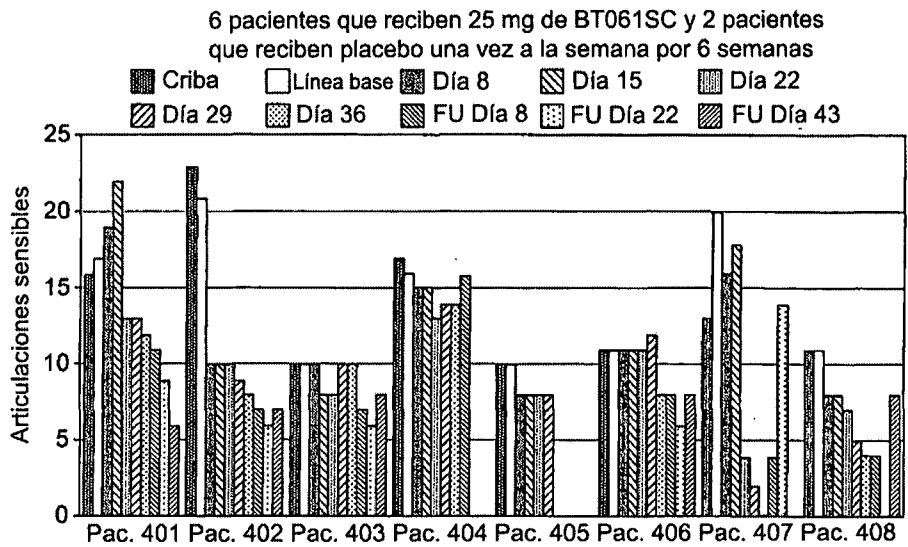


FIGURA 15 A

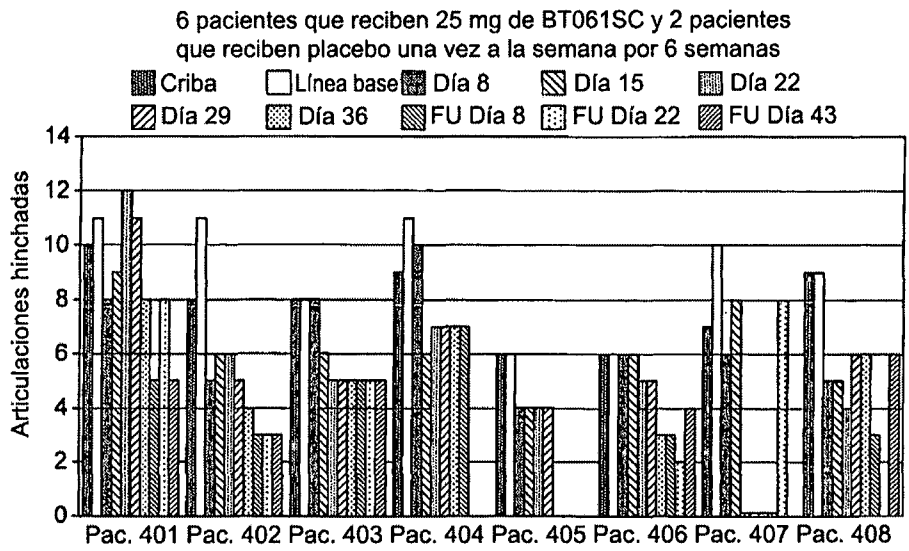


FIGURA 15 B

752

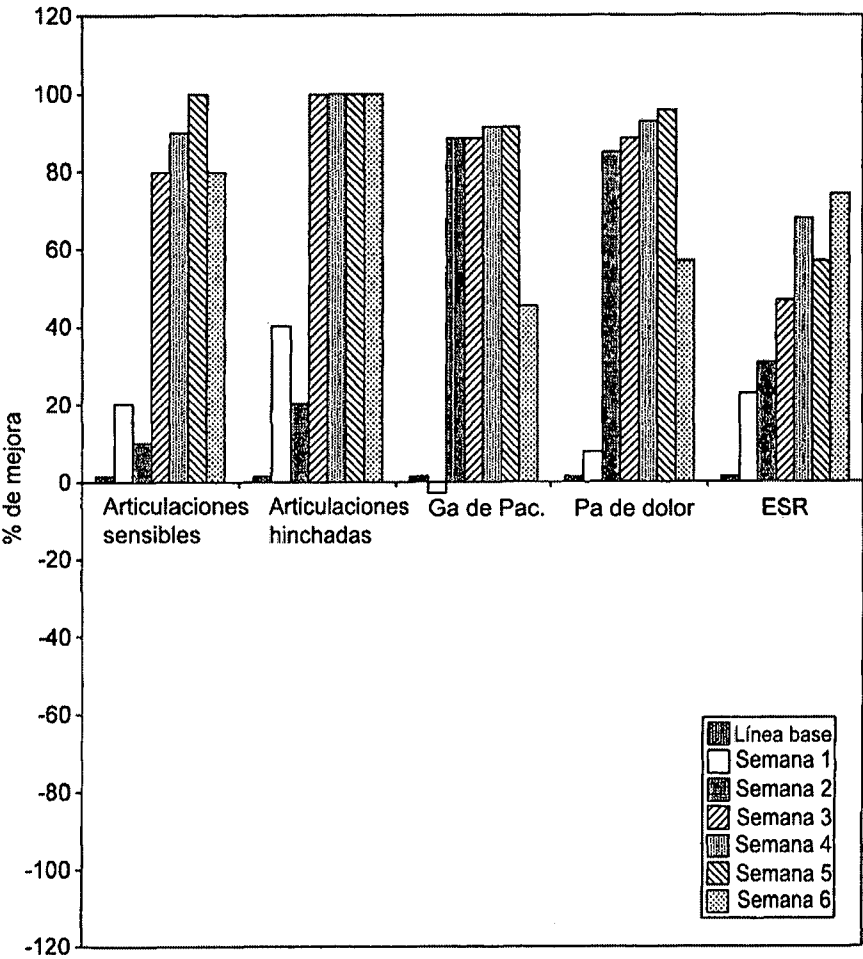


FIGURA 16 A

253

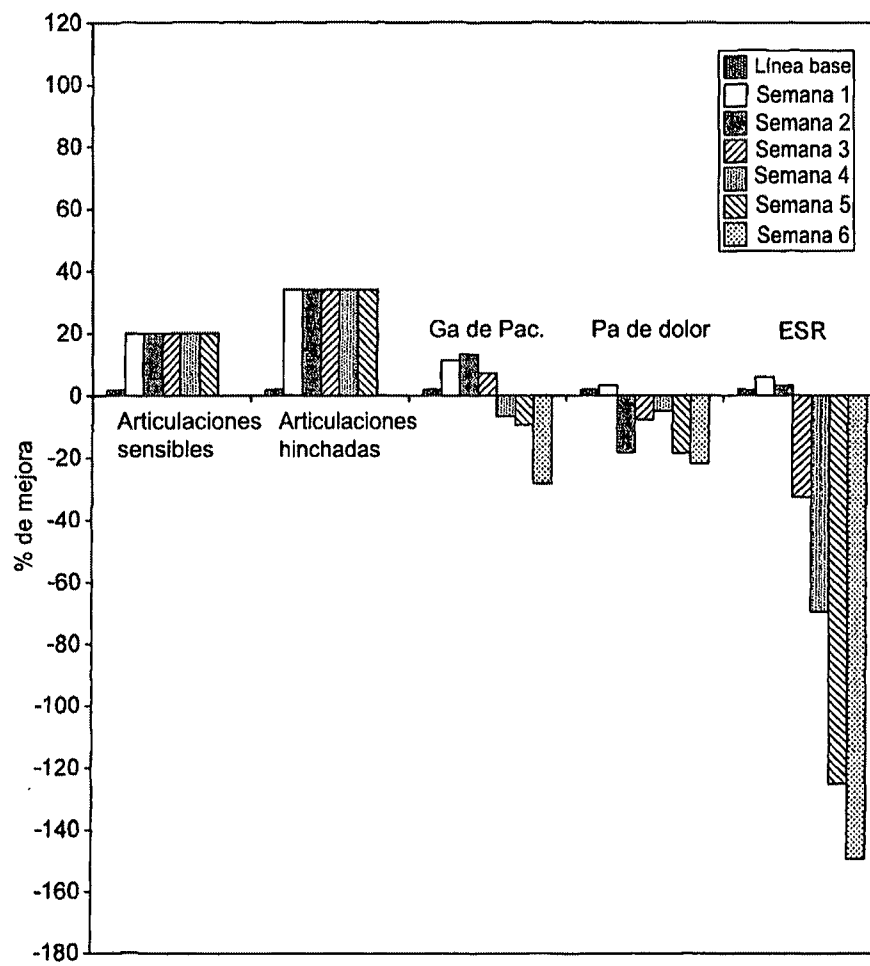


FIGURA 16 B

254

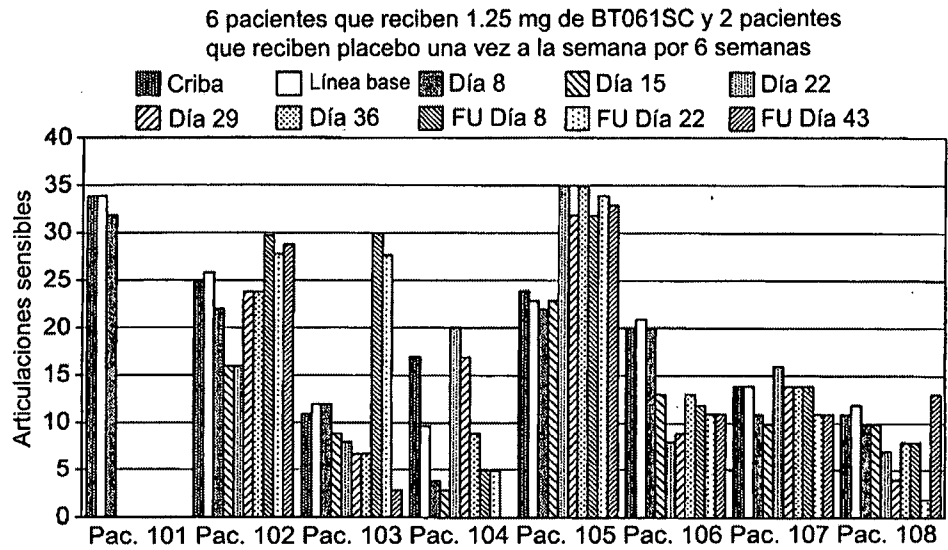


FIGURA 17 A

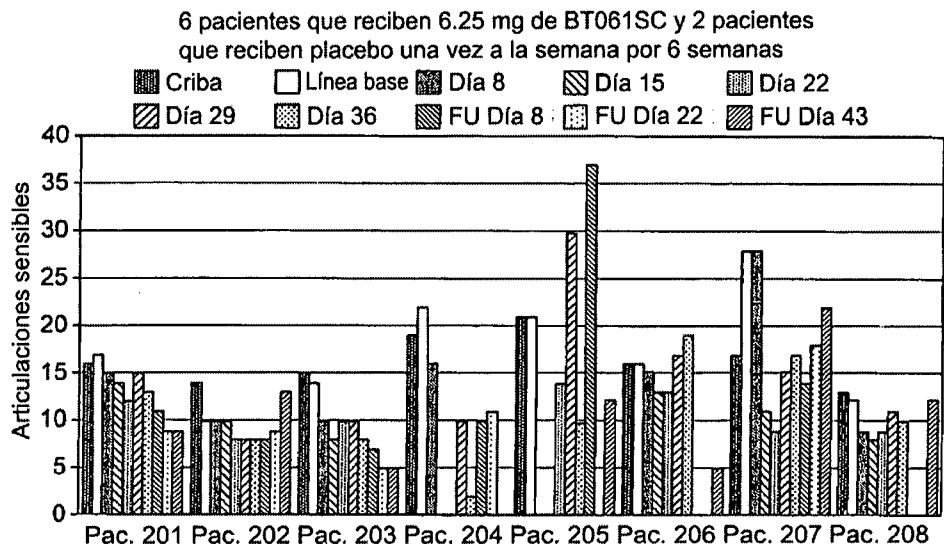


FIGURA 17 B

255

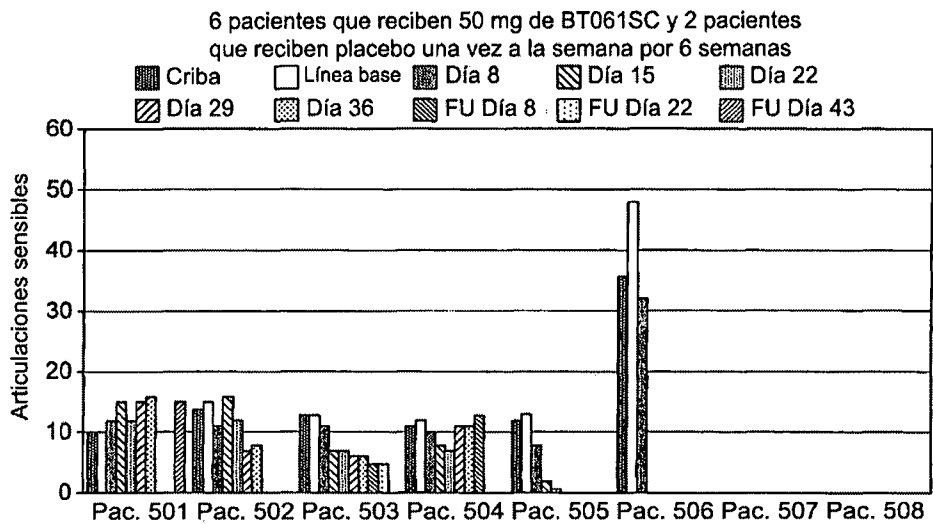


FIGURA 18 A

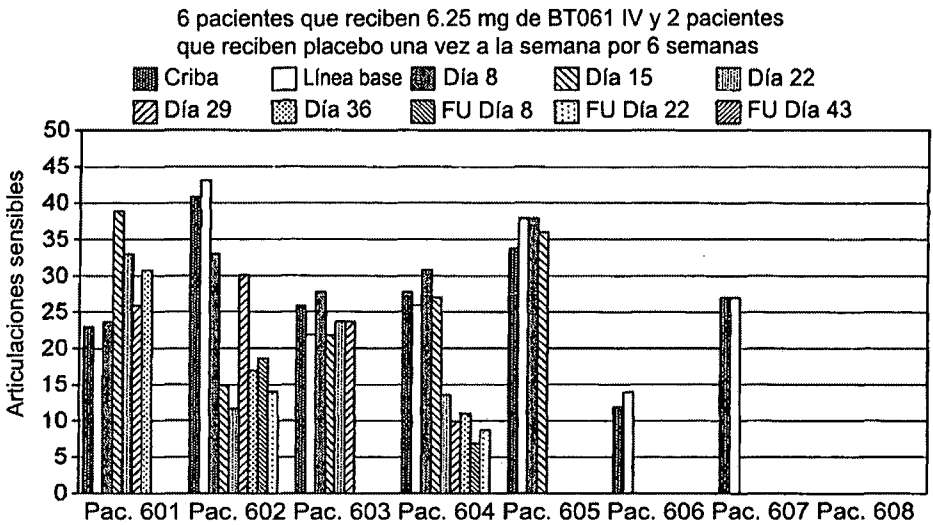


FIGURA 18 B

258

	FR1	CDR1	FR2
	1	2	3
	12345678901234567890123	456777778901234	567890123456789
		ABCD	
mB-F5	DIIVLTQSPSSLVVSLGQRATISC	RASKSVSTSGYSYIY	WYQQIPGQPPKLLIY
hB-F5L4M	DIIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RASKSVSTSGYSYIY	WYQQKPGQPPKLLIY
hB-F5L4L	-----L-----	-----	-----
FK-001	DIIVMTQSPDSLAVSLGERATINC		WYQQKPGQPPKLLIY
	CDR2	FR3	
	5	6	7
	0123456	78901234567890123456789012345678	8
mB-F5	LASILES	GVPCRFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC	
hB-F5L4M	LASILES	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	
hB-F5L4L	-----	-----	
FK-001		GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	
	CDR3	FR4	
	9	10	
	901234567	8901234567	
mB-F5	QHSRELPWT	FGGGTKLEIK	
hB-F5L4M	QHSRELPWT	FGQGTKVEIK	
hB-F5L4L	-----	-----	
FK-001		FGQGTKVEIK	

FIGURE 19

FIGURE 20

258

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biotest AG

<120> AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD

5 <130> 313680.WO/JND/CJS

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio V de cadena H de anticuerpo humanizado hB-F5H37L

<400> 1

15 Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys

20

25

30

20

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

35

40

45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu

25

50

55

60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65

70

75

80

30 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85

90

95

259

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

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

<210> 2

<211> 111

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio V de cadena H de anticuerpo humanizado hB-F5L4M

<400> 2

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

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

20

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 25 50 55 60

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

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

200

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

5 <210> 3

<211> 550

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 3

gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcatcttcc tgcccgtgct

gggcctccca 60

15 tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg

aggggtgttt 120

cactttgctg tttccttttg tctccagggtg tctgtgcaga ggaacagctt

gtggagtctg 180

ggggaggctt ggtgaaaccc ggagggttctc tgagggtctc ctgtgcagcc

20 tcgggtttca 240

gtttcagtga ctgccggatg tactgggttc gccaggctcc aggggaagggg

ctggagtgga 300

ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag

tctgtgaggg 360

25 gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggt ctatctgcag

atgaacagct 420

tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgctc ctattatagg

tacgacgtgg 480

gggcctgggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca

30 ggtaagaatg 540

gccaaagcttg

550

<210> 4

<211> 498

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

10 <400> 4

ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta

aatgacatat 60

ttcaattata tctgagacag cgtgtataag tttatgtata atcattgtcc

attcctgact 120

15 acaggtgcct acggggacat cgtgatgacc cagtctccag actccctggc

tgtgtctctg 180

ggcgagaggg ccaccatcaa ctgcagggcc agcaaaagtg tcagtacatc

tggtacagt 240

tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgctcat

20 ttaccttgca 300

tccatcctag aatctggggt ccctgaccga ttcagtggca gcgggtctgg

gacagatttc 360

actctcacca tcagcagcct gcaggctgaa gatgtggcag tttattactg

tcagcacagt 420

25 agggaaacttc cgtggacgtt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacg

tgagtagaat 480

ttaaatttta agcttctt

498

30 <210> 5

<211> 372

752

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 5

	caggaatacc	ttgtggagac	cgggggagggc	ttggtgagggc	ctggaaattc
5	tctgaaactc	60			
	tctgtgtca	cctcgggttt	cagtttcagt	gactgccgga	tgtactggct
	tcgccagcct	120			
	ccaggggaagg	ggctggagtg	gattggtgtg	atttcagtca	aatctgagaa
	ttatggagca	180			
10	aattatgcag	agtctgtgag	gggcagattc	actatttcaa	gagatgattc
	aaaaagcagt	240			
	gtctatctgc	agatgagcag	attgagagag	gaagacactg	ccacttatta
	ttgtagtgcc	300			
	tcctattata	ggtagcagct	gggggcctgg	tttgcttact	ggggccaagg
15	gactctgggc	360			
	actgtctctg				ca
	372				

<210> 6

20 <211> 383

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 6

	gacattgtgc	tgacacagtc	tccttcttcc	ttagttgtat	ctctggggca
25	gagggccacc	60			
	atctcatgca	gggccagcaa	aagtgtcagt	acatctggct	acagttatat
	atattggtac	120			
	caacagatcc	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatc	ttgcatccat
	cctagaatct	180			
30	ggggtccctg	gcaggttcag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct
	caacatccat	240			

5 atcttccac catccagtga gca

383 .

<400> 7

15

20

25

30

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala

264

100

105

110

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

115

120

5

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

15

20

25

30

Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

20

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Gly

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65

70

75

80

25

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85

90

95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

30

100

105

110

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

10 20

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 10

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

20 <210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

25 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

30

<210> 12

266

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

5 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 13

<211> 30

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 14

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

25 1 5 10

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 15

267

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

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr
 5 20 25 30

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

15 <210> 17

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> dominio V de cadena H de anticuerpo humanizado hB-F5H37V

<400> 17

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

30

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu

268

50

55

60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65

70

75

80

5

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

85

90

95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala

10

100

105

110

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

115

120

15

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

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

<400> 18

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

25

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20

25

30

Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

30

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

268

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

5

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85

90

95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

10

100

105

110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/052811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06 C07K16/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 460 088 A (BIOTEST AG [DE]) 22 September 2004 (2004-09-22) the whole document	1-56
X	RACADOT E ET AL: "IMMUNOLOGICAL FOLLOW-UP OF 17 PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS TREATED IN VIVO WITH AN ANTI-T CD4+ MONOCLONAL ANTIBODY (B-F5)" CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, PACINI, PISA, IT, vol. 10, no. 4, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 365-374, XP008022443 ISSN: 0392-856X the whole document	1-10, 14-24, 27-50, 52-56

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2009

Date of mailing of the international search report

06/07/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/052811

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WENDLING D ET AL: "TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS WITH ANTI CD4 MONOCLONAL ANTIBODY: OPEN STUDY OF 25 PATIENTS WITH THE B-F5 CLONE" CLINICAL RHEUMATOLOGY, ACTA MEDICA BELGICA, BRUXELLES, BE, vol. 11, no. 4, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 542-547, XP008022444 ISSN: 0770-3198 the whole document	1-10, 14-24, 27-50, 52-56
X	RACADOT E ET AL: "Treatment of multiple sclerosis with anti-CD4 monoclonal antibody. A preliminary report on B-F5 in 21 patients" JOURNAL OF AUTOIMMUNITY, LONDON, GB, vol. 6, no. 6, 1 December 1993 (1993-12-01), pages 771-786, XP002339149 ISSN: 0896-8411 cited in the application the whole document	1-10, 15-24, 29-50, 53-56
X	ROBINET ET AL: "CD4 monoclonal antibody administration in atopic dermatitis" JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY, C.V. MOSBY, ST. LOUIS, MO, US, vol. 36, no. 4, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 582-588, XP005154037 ISSN: 0190-9622 cited in the application the whole document	1-13, 15-26, 29-51, 53-56
X	CHOY E H ET AL: "Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical effects of a humanized IgG1 anti-CD4 monoclonal antibody in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients." RHEUMATOLOGY (OXFORD, ENGLAND) OCT 2000, vol. 39, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1139-1146, XP002532991 ISSN: 1462-0324 cited in the application the whole document	1-10, 14-24, 27-50, 52-56

272

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/052811

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1460088	A	22-09-2004	AU 2004222089 A1	30-09-2004
			CA 2519620 A1	30-09-2004
			EP 2070948 A1	17-06-2009
			WO 2004083247 A1	30-09-2004
			JP 2007525156 T	06-09-2007
			KR 20050111748 A	28-11-2005
			MX PA05009953 A	09-03-2006
			NZ 541523 A	27-07-2007
			US 2006051346 A1	09-03-2006
			US 2009104190 A1	23-04-2009

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 016/028	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) BIOTEST AG	
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0804684.9	13/03/2008	GB
	0817810.5	29/09/2008	GB
		(72) Inventor(es) MATTHIAS GERMEN Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 13/10/2010		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 15/10/2009	
Fecha de presentación de la solicitud: 10/03/2009		N° publicación: WO 2009/124815 A1	
No. de solicitud PCT/EP2009/052811			
(54) Titulo: AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD			

Reivindicación(es):

- Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 10 mg a 200 mg.
- Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el agente se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 15 mg a 80 mg.
- Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el agente se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 20 mg a 60 mg.
- Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 5 a 60 mg/m² de área superficial del cuerpo del sujeto.
- Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 6 a 50 mg/m².
- Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 8 a 40 mg/m².
- Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.1 a 2 mg/kg.
- Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la composición se va

- a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.15 a 1.5 mg/kg.
- Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.2 a 1 mg/kg.
 - Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque la enfermedad autoinmune se elige de psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo-1, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, tireoiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, lupus sistémico eritematoso y enfermedades relacionadas a transplante tales como de injerto-contrá-hospedero o aspectos de tolerancia general de órganos.
 - Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la enfermedad es psoriasis.
 - Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque la composición es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al menos una mejora del 40% en la calificación de Área de psoriasis e Índice de Severidad (PASI) del paciente.
 - Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque la composición es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al menos un 50% de mejora en la calificación de Área de Psoriasis e Índice de Severidad (PASI) del paciente.
 - Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la enfermedad es artritis reumatoide.
 - Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque la composición es para administración parenteral.

274

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127112- -00000-0000

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 75,717
FECHA : SEPTIEMBRE 13 DE 2010

Fecha: 2010-10-13 12:04:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156794820	13/09/2010	45,370,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACI
		TOTAL :	\$ 280,000.00

SON: DOSCIENTOS OCHENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 05099- 841-002-6.

275

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 80,838
FECHA : SEPTIEMBRE 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-127112-00000-0000
Fecha: 2010-10-13 12:04:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664700	27/06/2010	57,040,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLO: 05099-841-002-6

276

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 80,839
FECHA : SEPTIEMBRE 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127112- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:04:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664700	27/06/2010	57,040,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010 05099-841-002-6

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

277

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,196
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127112- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:04:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132666995	04/10/2010	49,088,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 05099-841-002-6

278

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,212
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127112- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:04:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 278

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132666995	04/10/2010	49,088,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL AÑOS 17 a 20 PARA MANT	907,000.00

TOTAL : \$ 907,000.00

SON: NOVECIENTOS SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 05099- 841-002-6,

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☒	Indicación que se solicita una patente.
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☒	Descripción de la invención
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
BIOTEST AG

REFERENCIA	Radicación No.	10 127112
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/052811
	Fecha inicio fase nacional	13/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14733

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

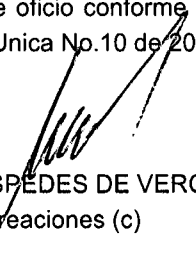
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 127112



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

12 NOV. 2010