



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

87  
**PCT**

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

RECEIVED  
10/10/2010

**SOLICITUD**  
**PATENTE DE INVENCION**

**10-127114**

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)

T.H.C.  
13-10-2010

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PETITORIO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127114- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:09:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 272

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ 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,  
AlemaniaDomicilio: 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](mailto:clientes@cavelier.com)

Domicilio: Bogotá, Colombia.

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)  
(72)**1. **Frank OSTERROTH**Konrad-Adenauer-Allee 22,  
63128 Dietzenbach,  
Alemania3. **Matthias GERMER**Theodor-Heuss-Strasse 1,  
63225 Langen,  
Alemania5. **Elmar KRAUS**Bahnhofstrasse 51 A,  
61118 Bad Vilbel,  
Alemania7. **Daniele WOLF**Zum Roehrbrunnen 17a,  
63303 Dreieich,  
Alemania9. **Juergen LINDNER**Sandplackenstrasse 5,  
60488 Frankfurt,  
Alemania11. **Benjamin DAELKEN**Eleonore-Sterling-Strasse 40,  
60433 Frankfurt am Main,  
Alemania2. **Silke AIGNER**An der kurzen Gewanne 24,  
67227 Frankenthal,  
Alemania4. **Christoph UHEREK**Lachenwoerthsweg 6,  
63500 Seligenstadt,  
Alemania6. **Andrea WARTENBERG-DEMAND**Waldstrasse 68,  
35440 Linden,  
Alemania8. **Sibylle KAISER**Stuchkerstrasse 3,  
64673 Zwingenberg,  
Alemania10. **Christoph BRUECHER**Unter den Tannen 3a,  
65760 Eschborn,  
Alemania

5

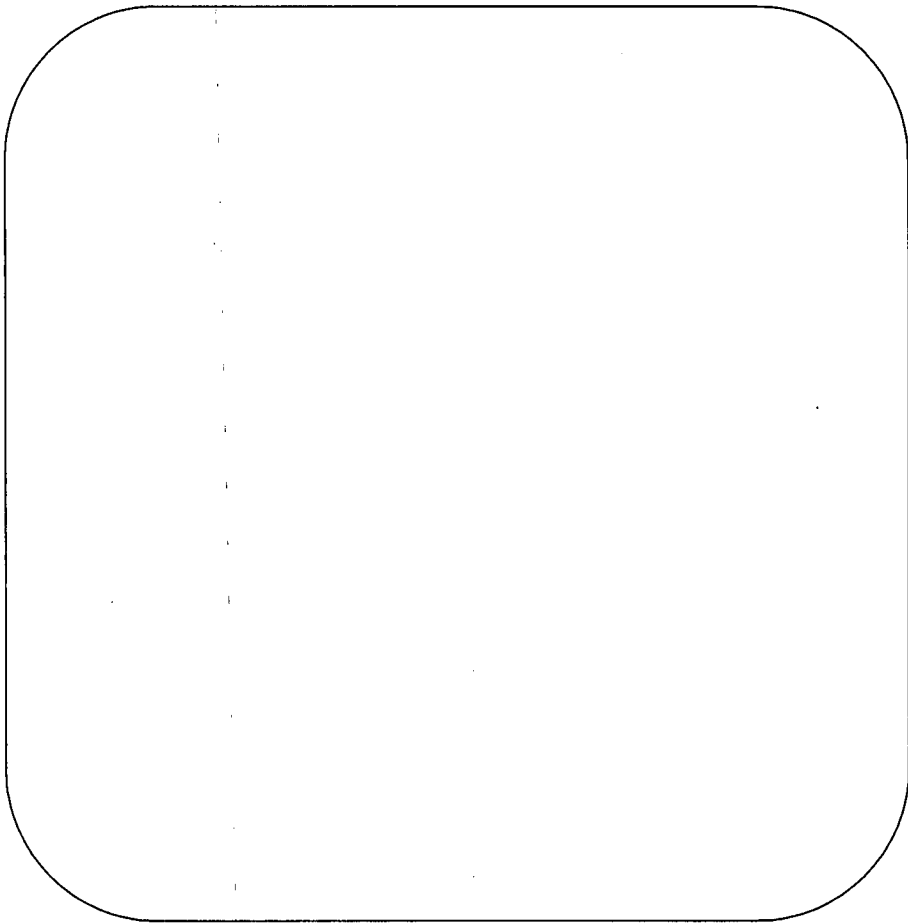
**PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/052809Fecha: 10 de marzo de 2009Publicación Internacional No. WO 2009/121690 A1Fecha: 8 de octubre de 2009

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                     |                                                                                   |                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <div><div>6</div><div>Título (54)</div></div> <div>AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD (G-296)</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                     |                                                                                   |                                                                        |
| <div><div>7</div><div>Clasificación Internacional (51)</div></div> <div>C07K 016/028</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                     |                                                                                   |                                                                        |
| <div><div>8</div><div>Prioridad</div></div> <div>SI<input checked="" type="checkbox"/> NO<input type="checkbox"/></div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <div>(33) País de Origen</div> <div>GB<br/>GB</div> | <div>(32) Fecha</div> <div>13 de marzo de 2008<br/>29 de Septiembre de 2008</div> | <div>(31) Número de Solicitud</div> <div>0804686.4<br/>0817811.3</div> |
| <div><div>9</div><div><div>Comprobante de pago No.: 10-78,453<br/>Comprobante de pago No.: 10-78,455<br/>Comprobante de pago No.: 10-80,848<br/>Comprobante de pago No.: 10-83,129<br/>Comprobante de pago No.: 10-83,194<br/>Comprobante de pago No.: 10-83,211</div><div>Fecha: 20 de Septiembre de 2010<br/>Fecha: 20 de Septiembre de 2010<br/>Fecha: 27 de Septiembre de 2010<br/>Fecha: 5 de Octubre de 2010<br/>Fecha: 5 de Octubre de 2010<br/>Fecha: 5 de Octubre de 2010</div></div></div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                     |                                                                                   |                                                                        |
| <div><div><div>10</div><div>Anexos:</div></div><div><div><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.</div><div><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por 47 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.222.000.oo.</div><div><input checked="" type="checkbox"/> Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.</div><div><input checked="" type="checkbox"/> Poderes, si fuere el caso.</div><div><input type="checkbox"/> Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.</div><div><input type="checkbox"/> Declaraciones.</div><div><input checked="" type="checkbox"/> Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)</div><div><input checked="" type="checkbox"/> Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)</div><div><input type="checkbox"/> Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.</div><div><input type="checkbox"/> Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.</div><div><input type="checkbox"/> De ser el caso, copia del contrato de acceso.</div><div><input type="checkbox"/> De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.</div><div><input type="checkbox"/> De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.</div><div><input type="checkbox"/> Arte final 12x12</div><div><input type="checkbox"/> 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.</div><div><input checked="" type="checkbox"/> Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS</div></div></div> |                                                     |                                                                                   |                                                                        |

3

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 2009/121690 A1

Descripción:

Páginas 59 en el idioma original

Páginas 89 en español

Reivindicaciones: Número (s) 57

Figuras: Número (s) 21

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,

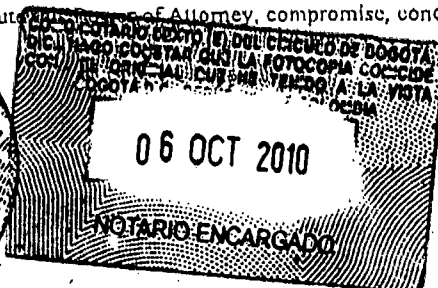
63303 Dreieich, Germany

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.

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 cause, and the more fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

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 (unos) 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 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 rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute me (us) as attorney, compromise, conciliate, admit



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



CERTIFICACIÓN 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

Sociedad 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,  
63303 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

W. Knipp

El Notario Público  
(Firma-sello)

W. Knipp

The Notary Public  
(Signature-seal)

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



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

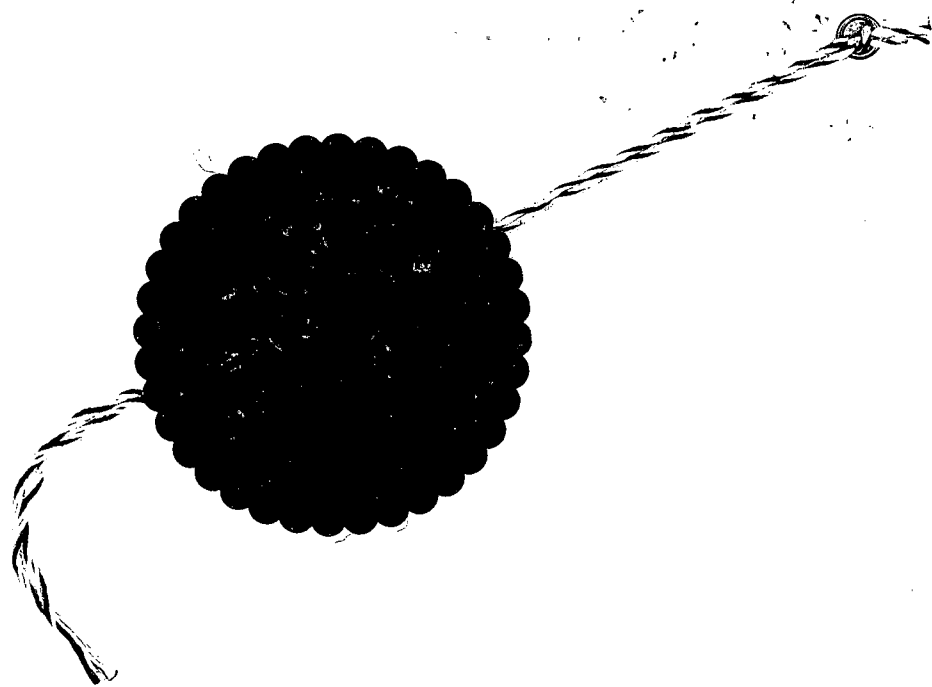
- Country: .....  
This public document
- has been signed by .....
- acting in the capacity of .....
- bears the seal/stamp of .....

Certified

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

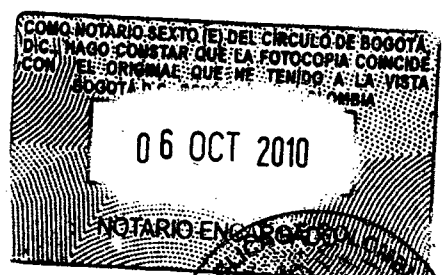
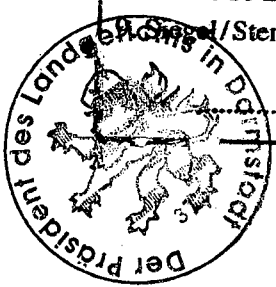
8. unter 910 E 213 - 912107

9. Siegel/Stempel

10. Unterschrift

Im Auftrag

Wellenreuther  
Vorsitzender Richter



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 2007.

W... Knipp      Firma Ilegible



Sello de Apostille expedido por al [illegible] en Darmstadt el 6 de junio de 2007. Nr.: 910 E 2/B 912/07.



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 1997

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD  
DEL TEXTO

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

627384

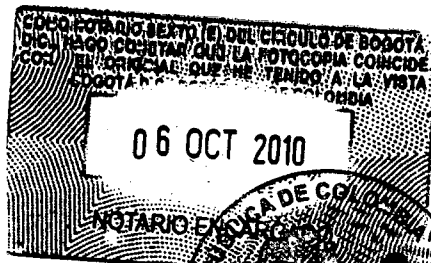
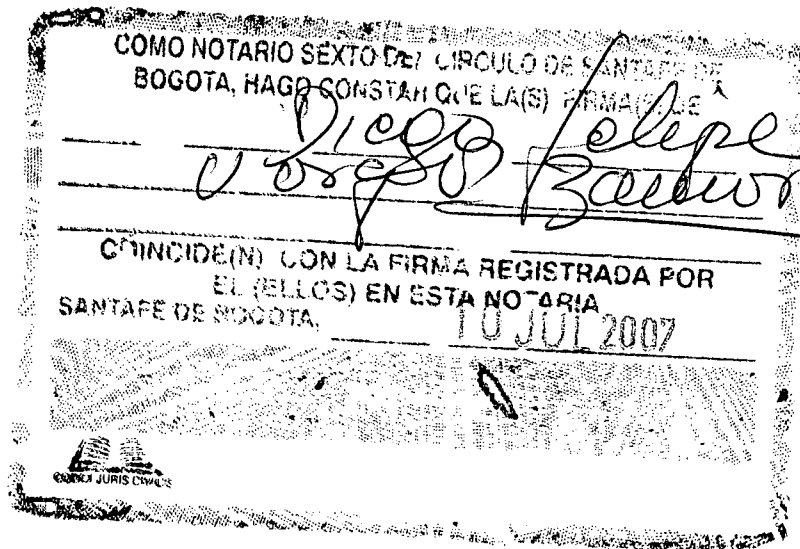
2007 JUL 10 P 12:

*Duque Vargas*

*UCS*

CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DE EMPENA  
AS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACION  
BOGOTA D.C.



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

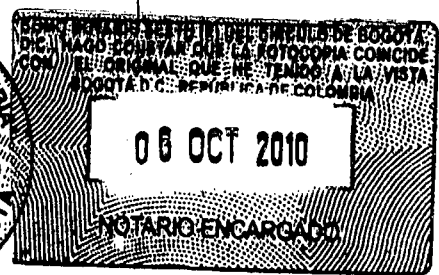
Certificado

- |                                                                                                    |                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 5. en Darmstadt                                                                                    | 6. el 6 de junio de 2007                                                   |
| 7. por el Presidente del Tribunal Regional                                                         |                                                                            |
| 8. bajo el No. 910 E 2/3 912/07                                                                    |                                                                            |
| 9. Sello<br>(sello redondo No. 3 – en tinta -)<br>El Presidente del Tribunal Regional de Darmstadt | 10. Firma<br>p.e. Fdo.: firma ilegible<br>Wellenreuther<br>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

LUZ ARRIAGA DE HERBER  
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
*[Firma]*  
Resolución No. 599 del Ministerio de Justicia



NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD  
DEL TEXTO

27371

Luz Porro

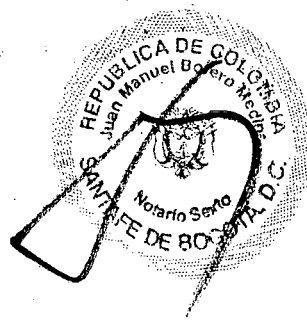
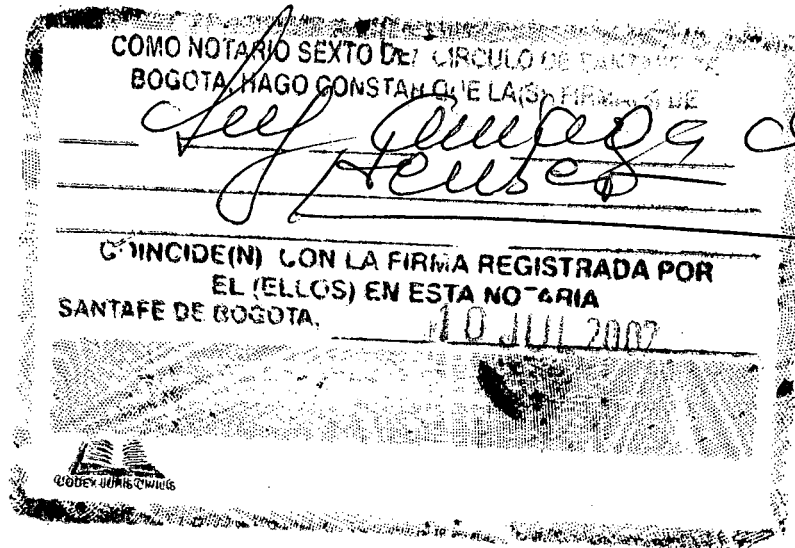
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPERA  
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

2007 JUL 10 P 12:01

1003

JEFE DE LEGALIZACION  
BOGOTA D.C.



# CAVELIER

ABOGADOS

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

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

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

Señores

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

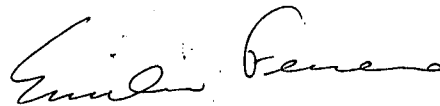
E. S. D.

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.

Comparado(aron)

*Emilio Tenorio*  
*Williamson Luz Clemencia*  
*Gómez de Paz*

Quien(as) exhibió(aron) la(s) C.C.

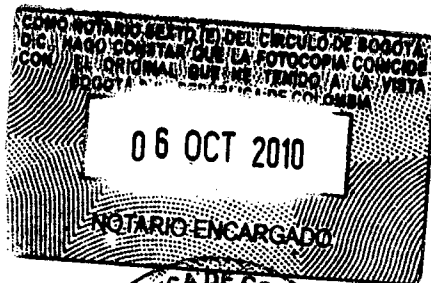
CC 438019 TP 31929

CC 35456349 TP 23555

Y declaró(aron) que la(s) firma(e) 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 Gómez de Paz*



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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
8 October 2009 (08.10.2009)

(10) International Publication Number  
**WO 2009/121690 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/EP2009/052809

(22) International Filing Date:

10 March 2009 (10.03.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

0804686.4 13 March 2008 (13.03.2008) GB  
0817811.3 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): OSTERROTH, Frank [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Allee 22, 63128 Dietzenbach (DE). AIGNER, Silke [DE/DE]; An der kurzen Gewanne 24, 67227 Frankenthal (DE). GERMER, Matthias [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 1, 63225 Langen (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: 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 0.2 mg to 30 mg.

WO 2009/121690 A1

## AGENT FOR TREATING DISEASE

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

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 the 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 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs and peripherally induced, Tr1 and Th3 Tregs. Furthermore NKTregs and CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg) are the main regulatory cells involved, utilizing an array of TCRs targeted towards autoantigen recognition in order to maintain immune homeostasis in the periphery, and regulate autoimmunity and pathogenic immune responses.

The essential features of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs are:

- i) they are CD4<sup>+</sup> T cells and constitute 5-10% of peripheral CD4<sup>+</sup> 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.

The role of Tregs is exemplified best by experiments involving reconstitution of immunodeficient nude mice with CD4<sup>+</sup> cells that were depleted of CD25<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> subset in the nude mice prevents the onset of these diseases (Sakaguchi et al., J Immunol. 155: 1151-1164 (1995)). The protective value of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells against organ-specific autoimmunity has also been shown in several other models of autoimmunity (e.g. autoimmune gastritis, prostatitis, oophoritis, glomerulonephritis, epididymitis and thyroiditis) caused by neonatal thymectomy performed 3 days after birth (d3Tx) or inflammatory bowel disease caused by reconstitution of SCID mice with CD45RB<sup>high</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs inhibit polyclonal and antigen-specific T cell activation. The suppression is mediated by a cell contact-dependent mechanism that requires activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells as well as inhibit B-cell activation and clonal expansion.

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

Within the CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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 and moderate amounts of TGF- $\beta$  (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- $\beta$  and variable amounts of IL-4 and IL-10, and IL-4 was shown to be a key factor for the differentiation of Th3 cells, in contrast to Tr1 cells (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.

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 lead to complete depletion of 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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 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 diseases.

Treatment with a total dose of 5-10 mg of TGN 1412 (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<sup>+</sup> T cells play a major part in initiating and maintaining autoimmunity. Accordingly, it has been proposed to use mAbs against CD4<sup>+</sup> 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) 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.

Several anti-CD4 antibodies targeting T cells have been in clinical development (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)) mainly aiming at CD4 cell depletion with only a few CD4 antibodies having been attributed to the other mechanisms like TRX-1, TNX-355, IDEC-151, OKTcdr4A.

Clinical response in autoimmune diseases correlates with CD4 blockade of conventional CD4<sup>+</sup> T cells directly at the site of inflammation rather than action with CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood. Therefore dosages with high antibody concentrations up to 1000 mg in single or multiple cycles, preferably in the range of 10-450 mg in single or multiple cycles have to be used to achieve clinical benefit (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); Choy et al., *Rheumatology* 41:1142-1148 (2002); Kon et al., *Eur Respir J.* 18(1): 45-52 (2001); Skov et al., *Arch Dermatol.* 139(11): 1433-9 (2003); Kuritzkes et al., *J Infect Dis* 2004, 189:286-91 (2004); Hepburn et al., *Rheumatology* 42(1):54-61 (2003)).

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

18

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).

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 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. (Mult. 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 or (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).

Another drawback of therapy with monoclonal antibodies in humans is that these antibodies are generally obtained from mouse cells, and provoke antimouse responses in the human recipients. This not only results in a lesser 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 rheumatoid arthritis. This patent application discloses compositions for parenteral administration, 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.

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

concomitant treatment with 150 mg Diclophenac (Wijdenes et al., Abstract and poster, EULAR conference, June 2005).

The antibody described in this study is not disclosed to be suitable for use in lower doses, and it is still desirable to find treatments at lower 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 lower doses to patients, in order to improve treatment response for patients who are not able to tolerate current doses.

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 0.2 mg to 30 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 0.10 to 20 mg/m<sup>2</sup>.

Still further the 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 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 µg/ml to 150 mg/ml.

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

In particular, the invention provides use of the agent defined above 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 above. The invention also provides an agent as defined above for use in the treatment of autoimmune disease wherein the agent is to be administered to a subject in a dose as defined above.

It will be appreciated from the above dosages that the inventors have surprisingly found that low dosages of the antibody BT061 provided effective and specific activation of naturally occurring regulatory T cells ( $CD4^+CD25^+$  Tregs) providing an *in vivo* clinical effect at far lower doses than those previously used, such as those disclosed in WO 2004/083247. Further the inventors have surprisingly found that the humanized antibody BT061 did not substantially modulate levels 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 a substantial long term depletion of  $CD4^+$  lymphocytes.

The concentration of the agent is not especially limited, provided that it is present in a concentration that is low compared to known concentrations. However, preferably, the concentration of the agent is from 0.1  $\mu\text{g/ml}$  to 30  $\text{mg/ml}$  or, 0.1 to 1000  $\mu\text{g/ml}$ , and more preferably from 1-500  $\mu\text{g/ml}$  and 2-250  $\mu\text{g/ml}$ . Most preferably, the concentration of the agent is (approximately) any one of 15  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\text{mg/ml}$ , 12.5  $\text{mg/ml}$  or 25  $\text{mg/ml}$ .

The dosage volume applied to a subject using the composition is not especially limited, provided that it delivers a low overall dosage compared to dosages already known, and is therefore suitable for all patients because of a lower level of side effects and especially in the treatment of individuals who do not tolerate doses as disclosed in WO 2004/083247. In particular, the concentration of the agent within the dosage volumes can be varied in order to provide the required dosages which are described in this application.

22

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 which does not require dilution so that they can be easily administered by non-medical personnel.

As has already been mentioned, previously it was not known that agents capable of treating autoimmune disease could be administered in the low 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 effective already in much lower 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 dose dependence of BT061 binding to human peripheral lymphocytes. Binding of BT061 in a dilution series is detected with a fluorochrome labelled anti-human IgG antibody. The mean fluorescence intensity is determined by flow cytometric analysis.

Figure 2 shows the purification scheme of CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector cells by combined positive and negative selection steps;

Figure 3 shows the nucleotide sequence encoding the mouse B-F5 V<sub>H</sub> region (SEQ ID No: 5);

Figure 4 shows the nucleotide sequence encoding the mouse B-F5 V<sub>k</sub> region (SEQ ID No: 6);

Figure 5 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 3) of a fragment of the plasmid encoding the V<sub>H</sub> 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<sub>k</sub> 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;

Figure 7 shows data from freshly isolated CD25<sup>+</sup>Tregs (donor-A) and CD8<sup>+</sup>T cells (donor-B) cultured in the presence of irradiated PBMC (donor-A) in the presence/absence of different anti-CD4 mAb. Proliferation of alloreactive CD8<sup>+</sup>T cells was determined after 4 days of culture by adding 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Tdr. Mean values of cpm (triplicates) are shown.

Figure 8 parts A to H provide graphs showing data from the clinical trials with psoriasis patients of dose group I as described in Example 3, 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 9 parts A to H provide graphs showing data from the clinical trials with psoriasis patients of dose group II as described in Example 3, 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.

Figures 10A and 10B respectively show the  $\text{TFN}\alpha$  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 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 11 shows IL-2 and IFN- $\gamma$  plasma levels after administration of a single intravenous or subcutaneous dose of BT061 in healthy volunteers. ULN = upper limit of normal (calculated based on cytokine levels measured in 39 healthy subjects; ULN = mean value + 2 x standard deviation).

Figure 12 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 13 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) both calculated based on the CD4 cell counts measured in 15 healthy subjects as the mean predose value plus (or minus) 2 x standard deviation.

Figure 14 parts A and B provide photographs from the clinical trial with psoriasis patients as described in Example 3. 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.

25

Figure 15 provides results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 5. 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 received a placebo.

Figure 16A and 16B provide results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 5. Figure 16A shows a bar chart of the number of tender joints for patients from the dose group receiving 25 mg subcutaneous BT061. Figure 16B 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 17A and 17 B provide results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 5. The Figures show the changes of individual parameters (in %) for one responder (Figure 17A) and one non-responder (Figure 17B) 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 18A and 18B provide further results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 5. The Figures show the number of tender joints in patients from the 1.25 mg subcutaneous dose group (Figure 18A) and from the 6.25 mg subcutaneous dose group (Figure 18B).

Figure 19A and 19B provide further results from the clinical trial with rheumatoid arthritis patients as described in Example 5. The Figures show the number of tender joints in patients from the 50 mg subcutaneous dose group (Figure 19A) and from the 6.25 mg intravenous dose group (Figure 19B).

Figure 20 shows the alignment of the polypeptide sequences of murine B-F5 V<sub>K</sub> (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 21 shows the alignment of the polypeptide sequences of murine B-F5 V<sub>H</sub> (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 the levels seen after administration of anti-CD3 antibodies. In particular, the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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.

| 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/ $\mu$ l (or at least 250 cells/ $\mu$ 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 indicate that the agent of the present invention does not cause substantial and long lasting CD4+ cell depletion or induce substantial cytokine release in comparison to 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 comprises one or more variable domains which are capable binding to CD4. The antibody may comprise 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)'<sub>2</sub>, 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, 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  
PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYVLQMNSLKTEDTAVY  
YCSAS YYRYDVGAWFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 1)

– L chain V domain:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ  
KPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWT  
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<sub>H</sub> and V<sub>K</sub> domains is shown in Figures 20 and 21. 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 the hB-F5 antibody or derivative thereof comprising the V regions thereof. This comprises in particular Fab, Fab', F(ab)'<sub>2</sub>, 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 4<sup>th</sup> residue was Leucine or Methionine were constructed and designated as L4L and L4M. Two types of  $V_H$  differing between them in that the 37<sup>th</sup> 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 20. The alignment of the polypeptide sequences of B-F5, M26, H37L, and H37V is shown in Figure 21. 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  $\gamma$ -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 Lipofectin<sup>ni</sup>. Transfectomas producing human IgG were selected by ELISA, using an anti-human IgG ( $\gamma$  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<br>(% 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 <sup>37</sup>Leu to <sup>37</sup>Val. On the contrary, the 4th residue of V<sub>K</sub> is found to be not so important for the CD4 binding activity. As the structural difference between <sup>37</sup>Leu and <sup>37</sup>Val of V<sub>H</sub> 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 <sup>3</sup>H-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.

### Compositions 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 lower doses. Such patients include all patients because of a lower level of side effects but especially individuals who do not tolerate doses as disclosed in WO 2004/08324.

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 humanised antibody capable of activating CD4+CD25+ regulatory T cells, and wherein the medicament comprises the antibody in a concentration of from 10 µg/ml to 150 mg/ml, preferably from 0.5 mg/ml to 75 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 humanised 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 0.2 to 30 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 0.2 mg to 30 mg, 0.2 to 20 mg per dose, 0.3 mg to 7.5 mg, 0.3 to 5 mg per dose or preferably 0.3 to 1 mg per dose. Most preferably the range of milligrams per dose extends between 0.3 mg to 0.9 mg, or 0.3 to 0.99 mg.

In one aspect of the invention the subject is to receive a plurality of doses. In these situations it is suitable that dosage over a period of 10 days is between 0.2 to less than 25 mg, more preferably between 0.2 and 20 mg and most preferably between 0.2 to less than 10 mg. Further, the dosage over a period of 5 days should be between 0.2 to less than 15 mg, preferably between 0.2 and 12 mg, and more preferably between 0.2 to less than 5 mg.

In this aspect of the invention it is preferred that, when the dose is to be administered intravenously, the dosages over a period of 10 days are between 0.2 to less than 10 mg, most preferably between 0.2 and 7.5 mg. Alternatively, where the doses are to be administered subcutaneously or intramuscularly, it is preferred that the dosages over a period of 10 days are between 1 mg to 30 mg, more preferably between 5 mg and 30 mg.

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

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

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

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

(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 0.10 to 20 mg/m<sup>2</sup> body surface area of the patient, preferably from 0.12 to 15 mg/m<sup>2</sup>, more preferably 0.20 to 10 mg/m<sup>2</sup> and most preferably 0.30 to 0.50 mg/m<sup>2</sup>.

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 1 to 500 µg/kg, preferably 2 to 400 µg/kg, more preferably 2 to 250 µg/kg and most preferably 2.5 to 20 µg/kg.

In these aspect of the invention where the dose is based on the body surface area or the body weight of the subject it is preferred that, when the dose is to be administered intravenously, the dosages over a period of 10 days are between 0.20 to 10 mg/m<sup>2</sup>, more preferably between 0.20 to 4 mg/m<sup>2</sup>, or between 2 to 250 µg/kg, more preferably between 2 to 100 µg/kg. Alternatively, where the doses are to be administered subcutaneously or intramuscularly, it is preferred that the dosages over a period of 10 days are between 0.30 to 20 mg/m<sup>2</sup>, more

preferably between 0.5 to 20 mg/m<sup>2</sup>, or between 2.5 to 500 µg/kg more preferably between 20 to 500 µg/kg.

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 the following bases: daily, every other day, weekly, every 4 weeks, every 6 weeks, every 12 weeks, every 24 weeks, every calendar month, every 6 calendar months or yearly. Thus, the doses may be separated by at least one day, or alternatively by at least one week, or by at least one month or by at least 3 months or by at least 6 months or by at least one year (meaning that the doses are taken every day or every week, or every month or 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 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

Generally the pharmaceutical composition and medicaments used according to the present invention are for treating an autoimmune disease. Preferably 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, ulcerative colitis, atopic dermatitis, myocarditis and transplantation-related diseases such as graft-versus-host or host-versus-graft reactions, or general organ tolerance issues.

In a preferred aspect of the invention the autoimmune disease is psoriasis.

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<br>(per body region) | Value given | Surface involved<br>(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.

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 can be seen in at least 80% of patients treated.

In a further embodiment of this aspect of the invention the pharmaceutical composition is to be administered intravenously, subcutaneously or intramuscularly in the dosages specified herein. In particular, where the dose is to be administered intravenously it is preferred that the dose is between 0.2 mg to 7.5 mg, more preferably between 0.3 to 5 mg. Where the patient is to receive a plurality of doses the dosage over a period of 10 days is preferably between 0.2 to less than 10 mg. Alternatively, where the dose is to be administered subcutaneously or intramuscularly it is preferred that the dose is between 0.2 mg to 30 mg, more preferably between 5 mg to 30 mg. Where the patient is to receive a plurality of doses the dosage over a period of 10 days is preferably between 0.2 to less than 25 mg.

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 intravenously, subcutaneously or intramuscularly 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).

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.

20

## EXAMPLES

EXAMPLE 1 – *Binding of BT061 to primary human peripheral lymphocytes (results shown in Figure 1)*

### *Method*

Human PBMCs were isolated by density gradient centrifugation and stained with FITC-labelled anti-CD3 antibody (345763; Becton/Dickinson) and serial dilutions of BT061. BT061 binding was detected with an phycoerythrin labelled human IgG antibody (109-116-098; Jackson, Immunoresearch). By flow cytometric analysis the mean fluorescence intensity of CD3+ BT061 binding lymphocytes was determined.

The results are set out in Figure 1.

### *Results*

BT061 binds to human lymphocytes at low concentrations. Below 10 ng/ml the half maximal saturation of binding is observed. Saturation is found at 100 ng/ml. The concentrations are as expected for patients which receive doses of 30 and 300 µg.

EXAMPLE 2 – *Inhibition of proliferation of CD8+ T-cells by BT061-stimulated T reg cells (results shown in figure 7)*

### *Method*

#### *Isolation of human T cell populations*

CD25<sup>high</sup> Tregs were separated from buffy coats and/or leukapheresis of healthy volunteers by magnetic bead cell separation according to the following protocol.

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells were isolated from buffy coats of healthy volunteers by 2 steps. In the first step CD4<sup>+</sup> T cells using 2-4µl CD4-MACS-Multisort-Beads (Miltenyi Biotec) per 10<sup>7</sup> PBMCs were positively selected. After 15 minutes of incubation, magnetic selection was performed. In the next step positively isolated cells were depleted of CD25-expressing non-CD4 cells with CD8-, CD19- and CD14-Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway).

41

The resulting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were 95-98% pure. Untouched CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated by negative selection from PBMC by depleting CD8, CD19, CD56, CD14, CD235a, CD25 and CD45RO expressing cells with Dynabeads. The purification scheme is shown in Figure 2.

#### *Co-culture assay*

To evaluate the influence of anti-CD4 mAb on the function of human CD25<sup>+</sup> Tregs, freshly isolated human CD25<sup>+</sup> Tregs were co-cultured with syngeneic T cell (CD3)-depleted PBMC (CD3 Dynabeads, Dynal) and allogeneic CD8<sup>+</sup> T cells in presence of different anti-CD4 mAb. Briefly, 1x10<sup>5</sup> freshly isolated CD25<sup>+</sup> Tregs were incubated with 3x10<sup>5</sup> irradiated (50 Gy) syngeneic PBMC in the presence of varying amounts of anti-CD4 mAb. Either immediately or 24 h later, 1x10<sup>5</sup> allogeneic CD8<sup>+</sup> T cells were added to the cultures and proliferation was determined 72 h later. Different anti-CD4 mAbs at concentrations from 0.01 µg/ml to 50 µg/ml were tested in this assay. CD8<sup>+</sup> T cells were isolated using CD8-Microbeads

The results are set out in Figure 7.

#### *Results*

BT061 reproducibly induces suppressive activity in Tregs in a dose-dependent manner, resulting in inhibition of the proliferation of alloreactive CD8<sup>+</sup> T cells. BT061 stimulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs which directly inhibit CD8<sup>+</sup> T cells.

In particular, the results confirm that there is inhibition of the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells at concentrations as low as 10ng/ml corresponding to low dose application in patients of 30 µg.

*EXAMPLE 3 – Clinical trial of BT061 in patients with moderate to severe chronic psoriasis (results shown in Figures 8A to 8H, Figures 9A to 9H and Figures 14A and 14B)*

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.

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 C. 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 C 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 D1.

The PASI scores for the patients in dose group II are shown in Table D1 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 D2.

The PASI scores for the patients in dose group III are shown in Table D2 together with the percentage improvement in the PASI score from the baseline.

*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 D3.

The PASI scores for the patients in dose group IV are shown in Table D3 together with the percentage improvement in the PASI score from the baseline.

44

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

| Patient                                                | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          |
|--------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Rel. Dose<br>[µg/kg]/<br>[mg/m <sup>2</sup> ]          | 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%)  |

45

TABLE D1 - PASI scores for the patients in dose group II (2.5 mg intravenous dose) over course of 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 <sup>2</sup> ] |             |             |             |             |             |             |             |             |

| 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%)   |

46

TABLE D2 - 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/m²]   |             |             |        |        |        |        |        |        |

| 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%)  |  |

47

TABLE D3 - 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 <sup>2</sup> ] |         |         |         |         |         |         |        |         |

| 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 8A to 8H and in Figures 9A to 9H. The graphs shown in Figures 8A to 8H represent PASI scores for patients from dose group I, while the graphs shown in Figures 9A to 9H represent PASI scores for patients from dose group II.

As can be seen from the results shown in Tables C and D, 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 D). 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 D3) show a clear improvement in their PASI scores, although this is limited in comparison to 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 E.

99

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

|                      | Dose group I*<br>0.5 mg BT061 | Dose group II*<br>2.5 mg BT061 | Dose group III*<br>5.0 mg BT061 |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Improvement ≥<br>40% | 6/8 patients                  | 6/8 patients                   | 1/8 patients                    |
| Improvement ≥<br>50% | 4/8 patients                  | 5/8 patients                   | 0/8 patients                    |
| Improvement ≥<br>60% | 1/8 patients                  | 2/8 patients                   | 0/8 patients                    |
| Improvement ≥<br>75% | 0/8 patients                  | 1/8 patients                   | 0/8 patients                    |

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

Figures 14 A and 14 B provide photographic evidence of the improvement in the level of psoriasis before and after treatment. Figure 14 A shows an area of psoriasis on the skin of a patient in dose group II prior to administration. Figure 14 B shows the same area of psoriasis 28 days after administration. The areas of improvement are marked on Figure 14 B with black boxes.

From these results it can clearly be seen that BT061 provides effective treatment of moderate and severe chronic psoriasis even with a dose as low as 0.5mg. Further, the single dose provides a therapeutic effect which can still be seen six to eight weeks afterwards.

EXAMPLE 4 – *Safety and tolerability of escalating doses of BT061 (results shown in Figures 10 to 13)*

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  $\geq 18$  to  $\leq 75$  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 F below:

TABLE F – 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 G below:

TABLE G – 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.

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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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.

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 comparably 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.

The median peak concentrations for the cytokines observed at any time point within 96 h after administration using the highest doses (40 mg to 60 mg of BT061) are shown in Figures 10 and 11.

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 10 A and B show the TNF $\alpha$  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 11 shows the IL-2 and IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  and IL-6 levels were slightly increased. Figure 10 A and B shows that the median peak values of IL-6 and TNF $\alpha$  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- $\gamma$  and IL-2 (Figure 11) as was reported for the application of TRX4 (Keymeulen et al., 2005 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes patients).

#### 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 H, J and K. Table L shows the results of the trial with subcutaneous administration. The results are shown graphically in Figures 12 and 13.

54

TABLE H 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   |

**TABLE J 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 (%) | 46.4   | 40.1 | 51.8 | 59.1 | 57.5  | 37.1  | 31.6  | 40.0  |

In particular, Figure 12 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 were calculated based on cell counts measured in 11 healthy volunteers using identical methodology to that used to measure the cell counts in those volunteers receiving BT061. The ULN and the LLN represent the mean of all the 11 healthy volunteer values + (or -) the standard deviation. Norm values for CD4 cell counts were calculated to be between 443 CD4 cells per  $\mu$ l (lower limit of normal; LLN) and 1324 CD4 cells per  $\mu$ l (upper limit of normal; ULN).

56

Figure 13 shows the CD4 cell counts (cells per ml plasma) in volunteers treated with the single subcutaneous dose of BT061. As with Figure 12, 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 K     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, 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 5 –*Clinical trial of BT061 in patients with rheumatoid arthritis*

The ability of hB-F5 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 subcutanetously 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 3 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 M to S provide the number of tender and swollen joints over the course of the trial.

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

| Patients – 1.25 mg<br>SC dose group | Joints (no.) | Visits       |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                            |                            |                             |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                     |              | Screen Visit | Day 1<br>Week 1 | Day 8<br>Week 2 | Day 15<br>Week 3 | Day 22<br>Week 4 | Day 29<br>Week 5 | Day 36<br>Week 6 | Follow-up<br>Day 43 Week 7 | Follow-up<br>Day 57 Week 9 | Follow-up<br>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 N - Tender and swollen joint counts from the 6.25 mg subcutaneous dose group.

| Patients – 6.25 mg<br>SC dose group | Joints (no.) | Visits       |                 |                 |                  |                  |                  |                  |                            |                            |                             |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                     |              | Screen Visit | Day 1<br>Week 1 | Day 8<br>Week 2 | Day 15<br>Week 3 | Day 22<br>Week 4 | Day 29<br>Week 5 | Day 36<br>Week 6 | Follow-up<br>Day 43 Week 7 | Follow-up<br>Day 57 Week 9 | Follow-up<br>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 P – 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 Q - 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                        |



Figure 15 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 16 A and 16 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 17A and 17B, 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 18A, 18B, 19A and 19B 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.

## 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 0.2 mg to 30 mg.
2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is to be administered to a subject in an amount from 0.2 to 20 mg.
3. A pharmaceutical composition according to claim 2 wherein the agent is to be administered to a subject in an amount from 0.3 to 5 mg.
4. A pharmaceutical composition according to claim 3 wherein the agent is to be administered to a subject in an amount from 0.3 to 1 mg.
5. 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 0.10 to 20 mg/m<sup>2</sup> body surface area of the subject.
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 0.12 to 15 mg/m<sup>2</sup>.
7. A pharmaceutical composition according to claim 6 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 0.20 to 10 mg/m<sup>2</sup>.
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 0.30 to 0.50 mg/m<sup>2</sup>.
9. 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 1 to 500  $\mu\text{g/kg}$ .

10. A pharmaceutical composition according to claim 9 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 2 to 400  $\mu\text{g/kg}$ .

11. A pharmaceutical composition according to claim 10 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 2 to 250  $\mu\text{g/kg}$ .

12. A pharmaceutical composition according to claim 11 wherein the composition is to be administered to a subject in a dose of the agent from 2.5 to 20  $\mu\text{g/kg}$ .

13. 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.

14. A pharmaceutical composition according to claim 13 wherein the disease is psoriasis.

15. A pharmaceutical composition according to claim 14 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.

16. A pharmaceutical composition according to claim 16 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.

17. A pharmaceutical composition according to claim 13 wherein the disease is rheumatoid arthritis.

66

18. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the composition is for parenteral administration.
19. A pharmaceutical composition according to claim 18, wherein the composition is for intramuscular administration, intravenous administration or subcutaneous administration.
20. 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.
21. A pharmaceutical composition according to claim 20 wherein the dosage volume is 15 to 25 ml.
22. A pharmaceutical composition according to claim 19 wherein the composition is for subcutaneous administration and is provided in a dosage volume of 0.1 to 3 ml.
23. A pharmaceutical composition according to claim 22 wherein the dosage volume is 0.5 to 1.5ml.
24. A pharmaceutical composition according to claim 19 wherein the composition is for intramuscular administration and is provided in a dosage volume of 0.1 to 3 ml.
25. A pharmaceutical composition according to claim 24 wherein the composition is provided in a dosage volume of 0.5 to 1.5 ml.
26. A pharmaceutical composition according to any preceding claim which is for use as a single dose or as part of a plurality of doses.
27. A pharmaceutical composition according to claim 26 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.

67

28. A pharmaceutical composition according to claim 27 wherein the autoimmune disease is psoriasis and the dose is to be administered once every two weeks.
29. A pharmaceutical composition according to claim 27 wherein the autoimmune disease is psoriasis and the dose is to be administered once every four weeks.
30. A pharmaceutical composition according to claim 27 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis and the dose is to be administered once every two weeks.
31. A pharmaceutical composition according to claim 27 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis and the dose is to be administered once every four weeks.
32. 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 µg/ml to 150 mg/ml.
33. A pharmaceutical composition according to claim 32 wherein the agent is present in a concentration of 0.5 mg/ml to 75 mg/ml.
34. A pharmaceutical composition according to claim 32 or 33 wherein the volume of the composition is from 0.5 to 500 ml.
35. A pharmaceutical composition according to claim 34 wherein the volume of the composition is from 15 to 25 ml.
36. A pharmaceutical composition according to claim 32 wherein the agent is present in a concentration of from 10 to 28 mg/ml.
37. A pharmaceutical composition according to claim 36 wherein the volume of the composition is 0.1 to 3 ml.

38. A pharmaceutical composition according to claim 37 wherein the volume of the composition is 0.5 to 1.5 ml.

39. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein within the period of 10 minutes after the beginning of administration to 96 hours after the completion of 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-2.

40. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 38 wherein within the period of 10 minutes after the beginning of administration to 96 hours after the completion of 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-2, and wherein the ULN value is 3.8, 2.8, 4.4, and 19.4 pg/ml respectively.

41. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein within the period of 72 to 96 hours after administration the cell count of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the subject's blood plasma is at least 250 cells/ $\mu$ l.

42. A pharmaceutical composition according to any preceding claim wherein the agent is a humanized monoclonal antibody or fragment or derivative thereof.

43. A pharmaceutical composition according to claim 42 wherein the agent is an anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof.

44. 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:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILE  
 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.

45. 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.

46. 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 12.

47. A method of treatment according to claim 46 wherein the autoimmune disease is as  
 defined in claims 13, claim 14 or claim 17.

48. A method of treatment according to claim 46 or claim 47 wherein the agent is a  
 humanized anti-CD4 antibody or fragment or derivative thereof derived from the mouse  
 monoclonal anti-CD4 antibody B-F5.

49. A method of treatment according to any one of claims 46 to 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:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMWLRQAPGKGLEWIGVISVKSEN  
YGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFA  
YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- L chain V domain:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (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.

50. A pharmaceutical composition according to claim 27 wherein the autoimmune disease  
is psoriasis and the dose is to be administered once every week.

51. A pharmaceutical composition according to claim 27 wherein the autoimmune disease  
is rheumatoid arthritis and the dose is to be administered once every week.

52. 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/ $\mu$ l.

53. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 52 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 to or higher than 50% of the cell count of the subject  
immediately prior to administration.

54. A pharmaceutical composition according to claim 15 or claim 16 wherein the  
improvement is seen at 56 days after administration of a single dose of the composition.

55. A pharmaceutical composition according to claim 15 or 16 wherein the improvement  
is seen at 75 days after administration of a single dose of the composition.

71

56. A pharmaceutical composition according to any one of claims 15, 16, 54 or 55 wherein the dose of the agent is 0.5 mg.

57. A pharmaceutical composition according to any one of claims 15, 16, 54 or 55 wherein the dose of the agent is 2.5 mg.

72

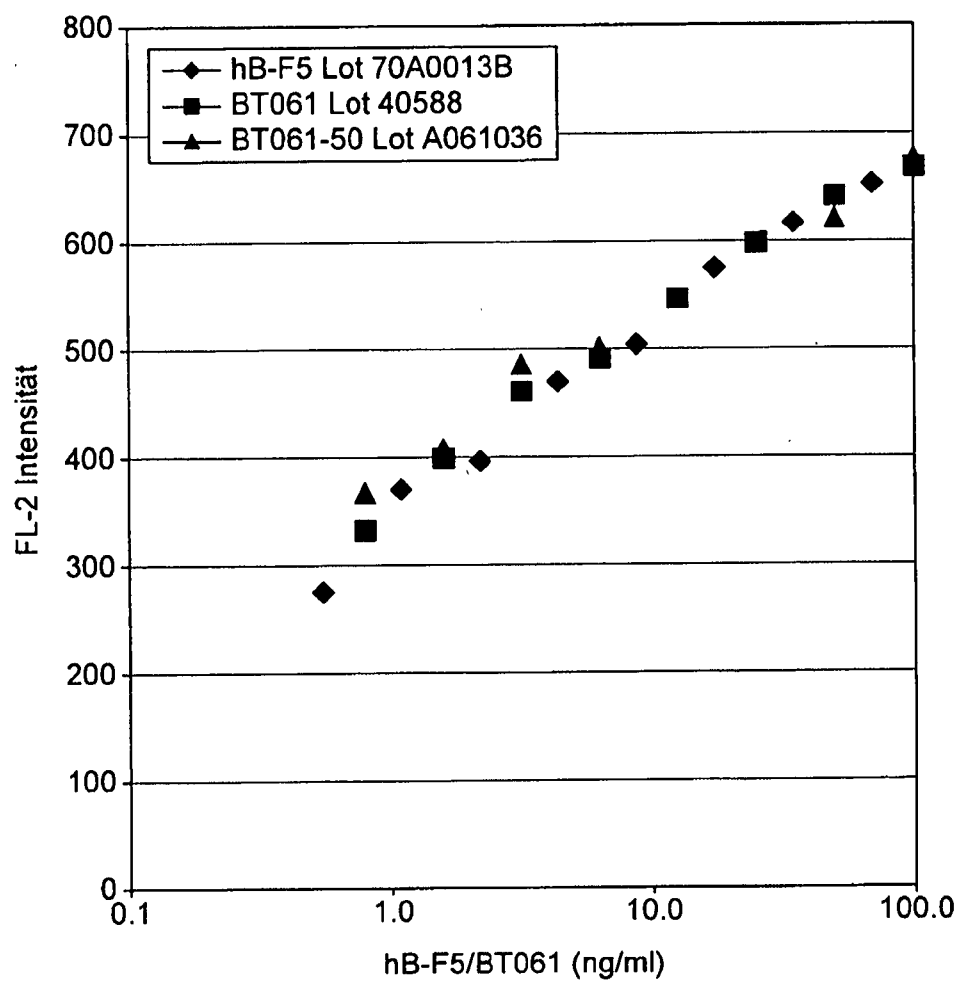


FIG. 1

73

2 / 37

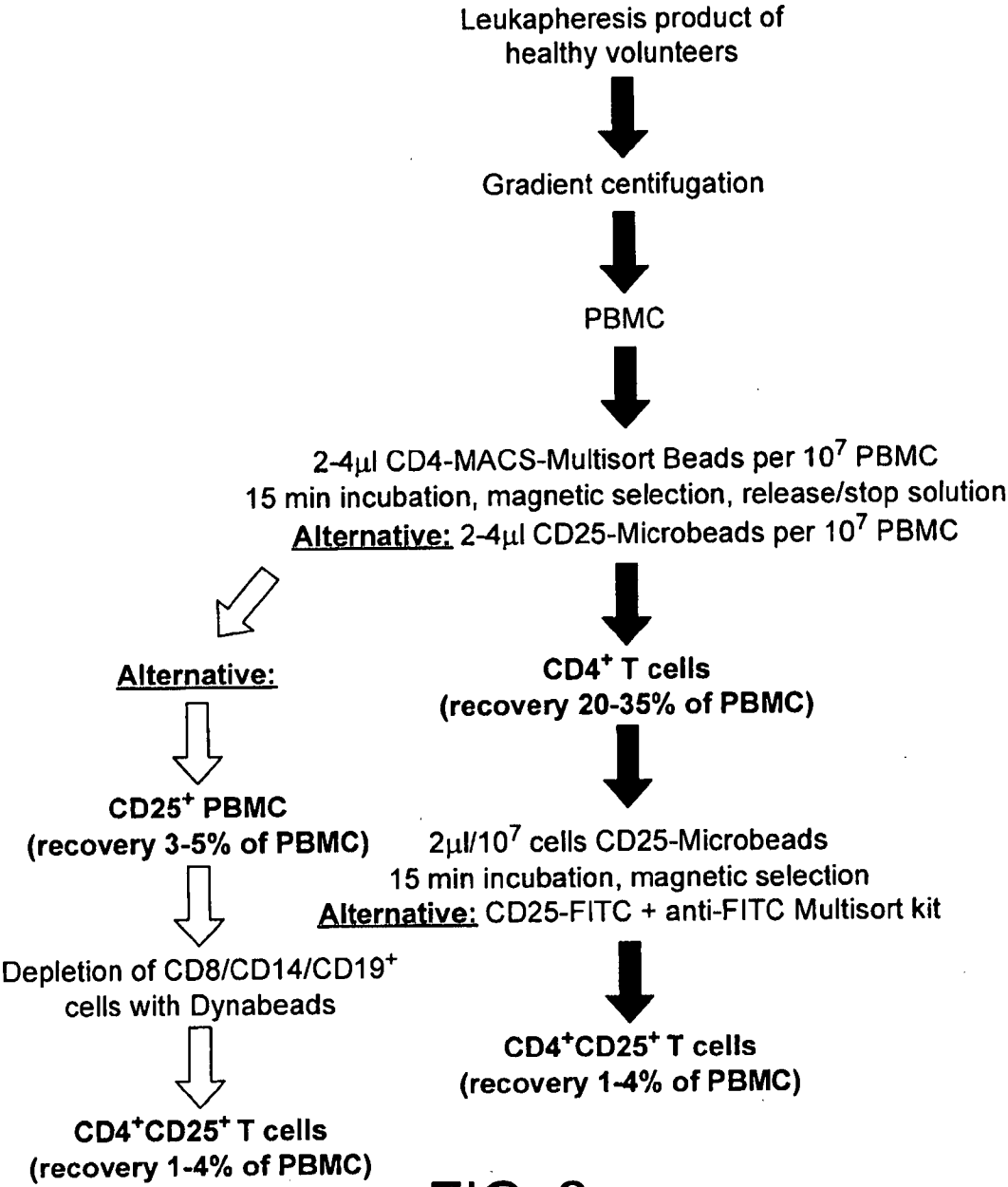


FIG. 2

mB-F5 V<sub>H</sub>

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

mB-F5 V<sub>k</sub>

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

76

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

77

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

78

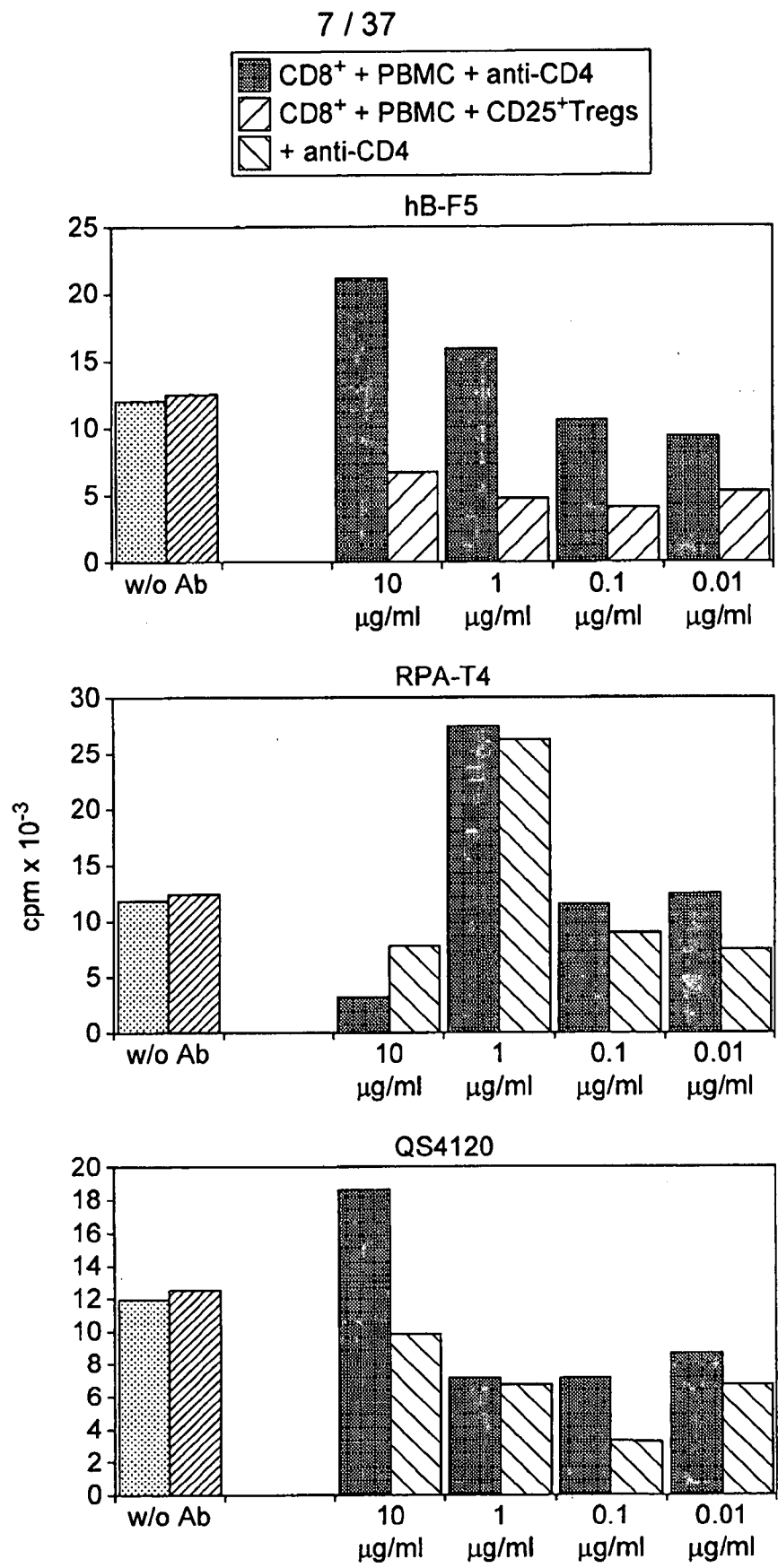


FIG. 7

79

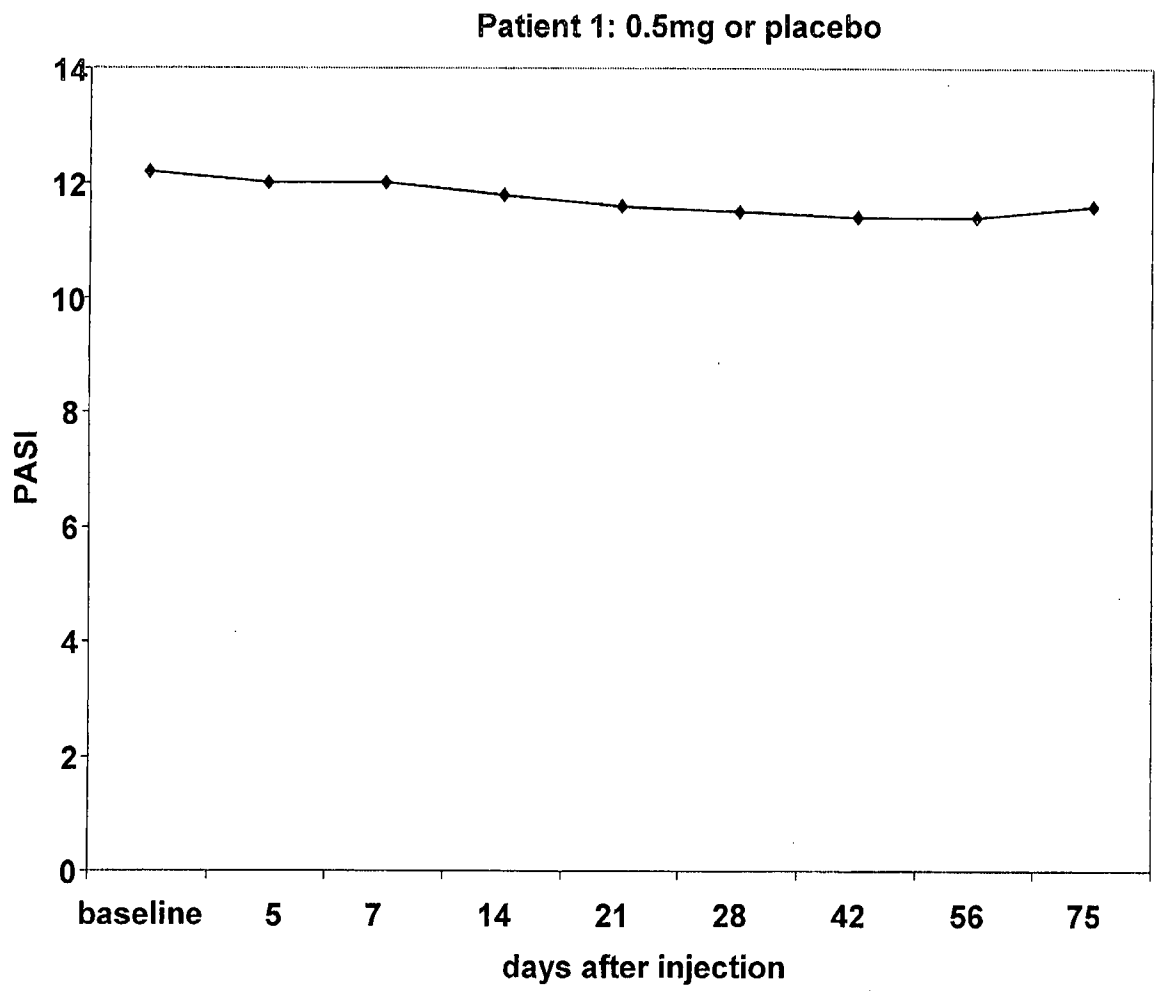


FIGURE 8A

80

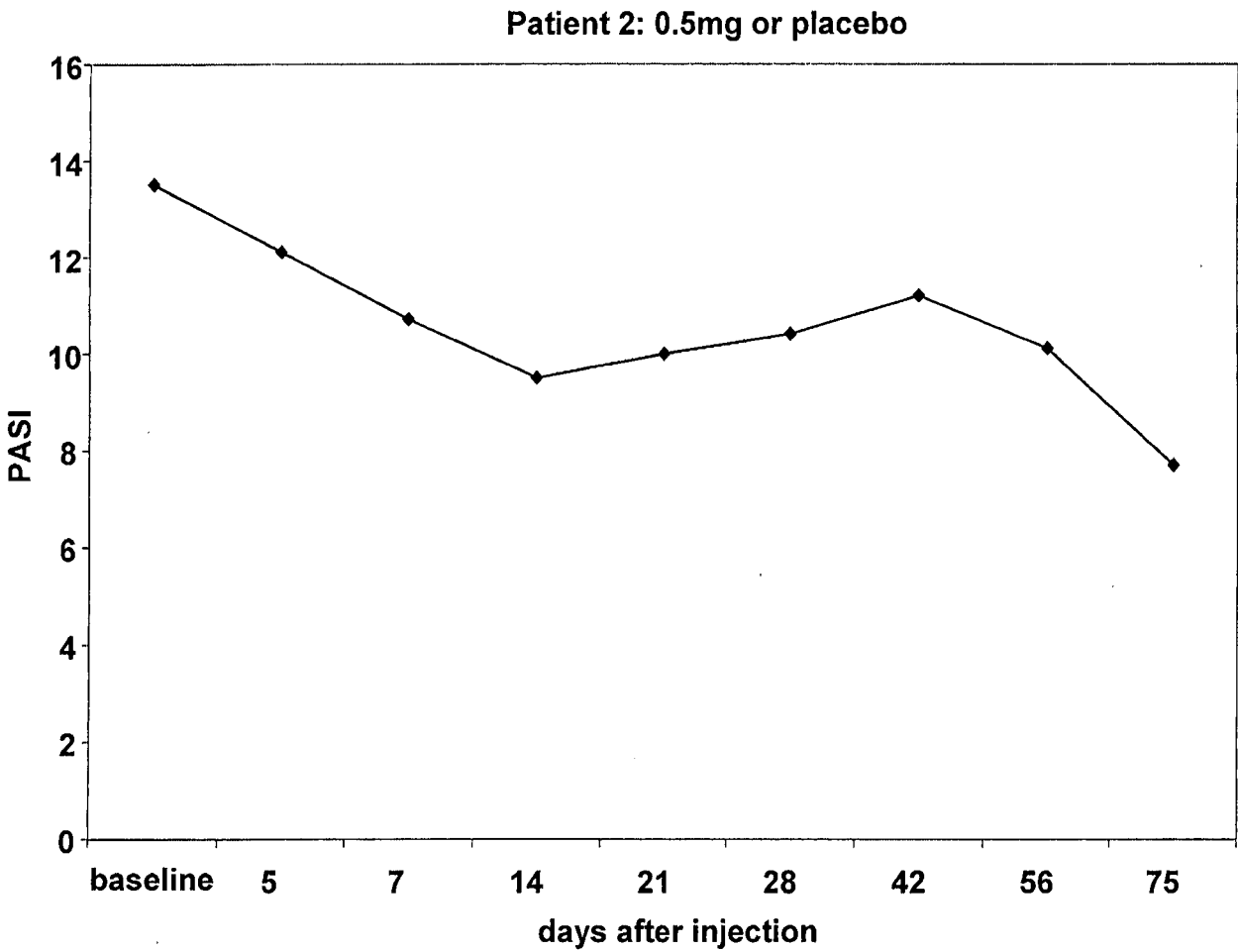


FIGURE 8B

81

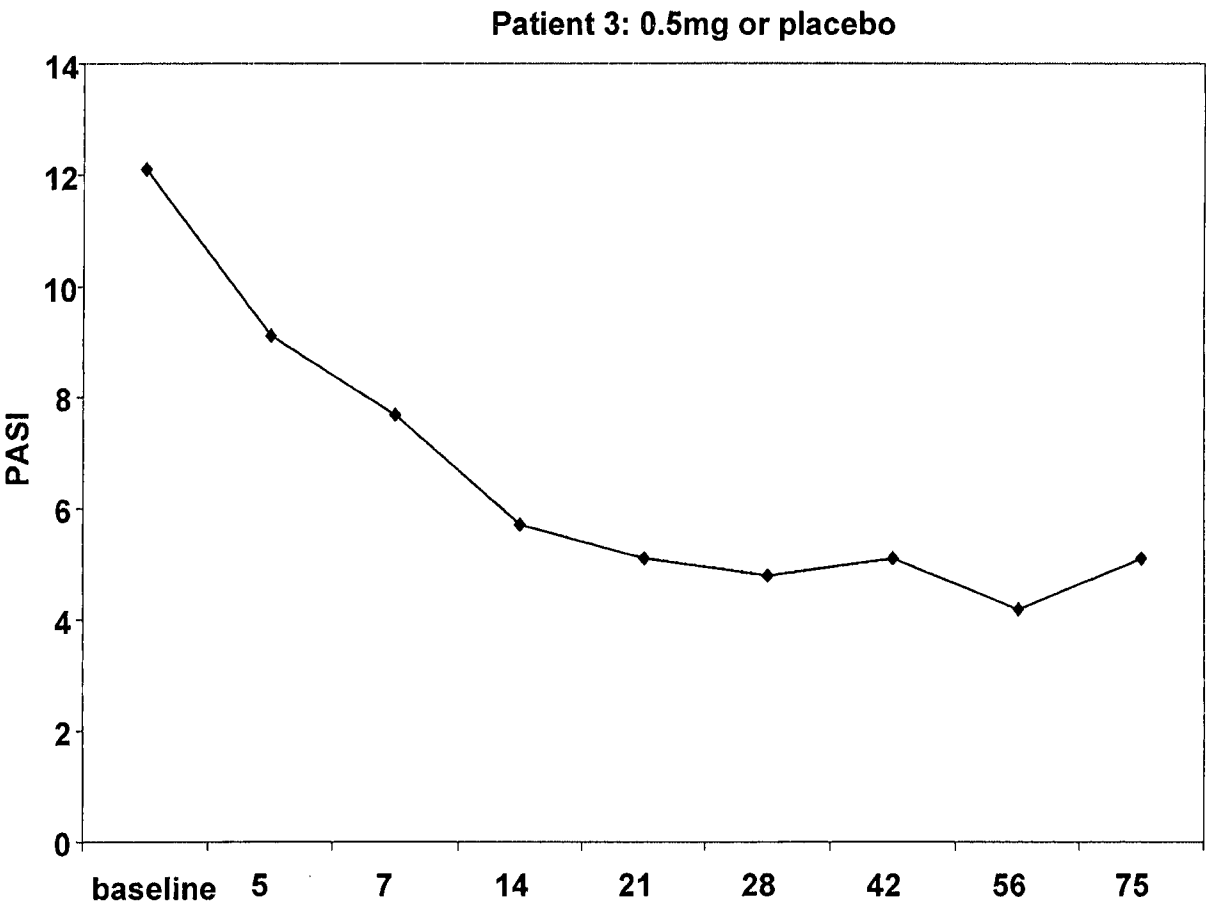


FIGURE 8C

82

11/37

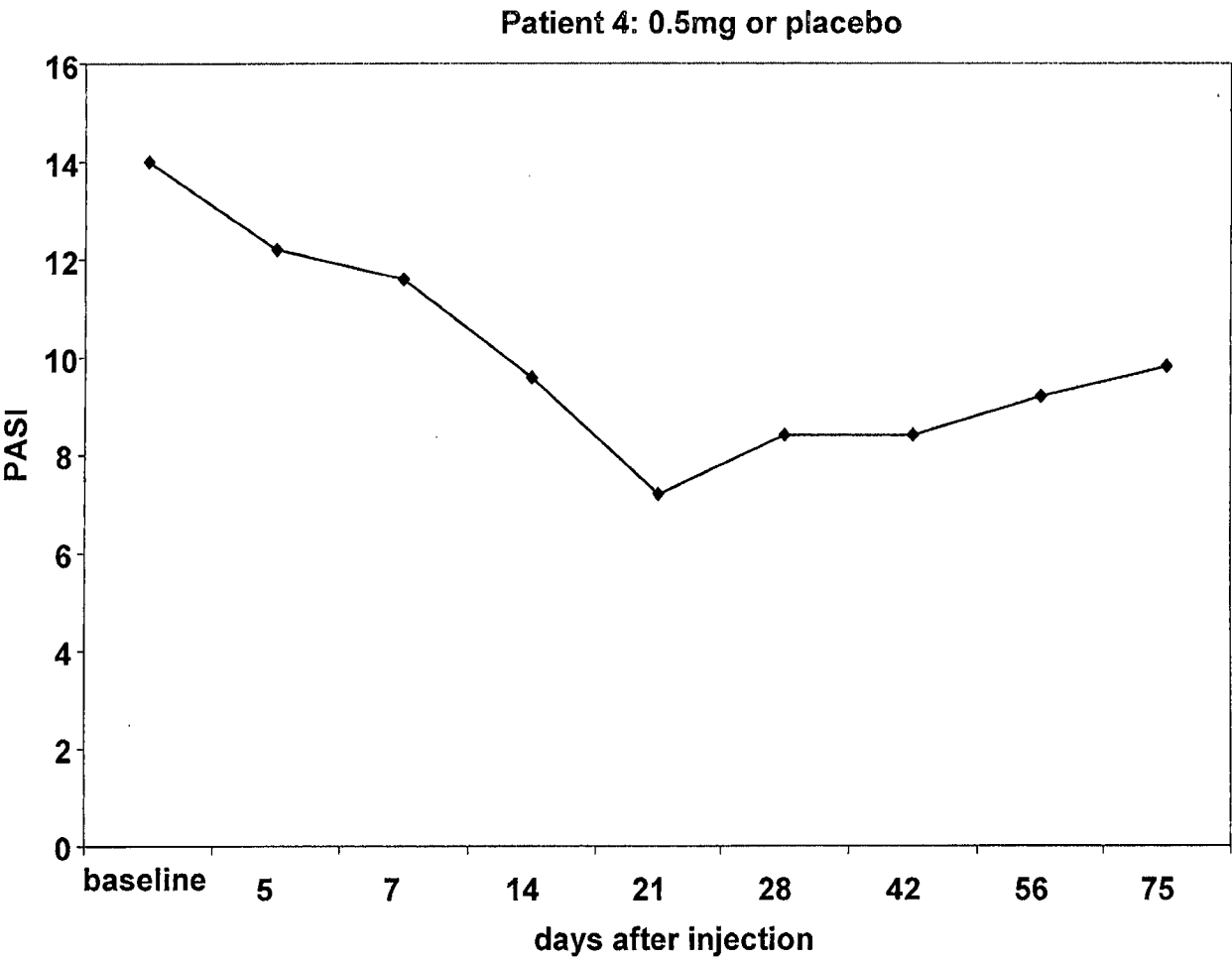


FIGURE 8D

83

12/37

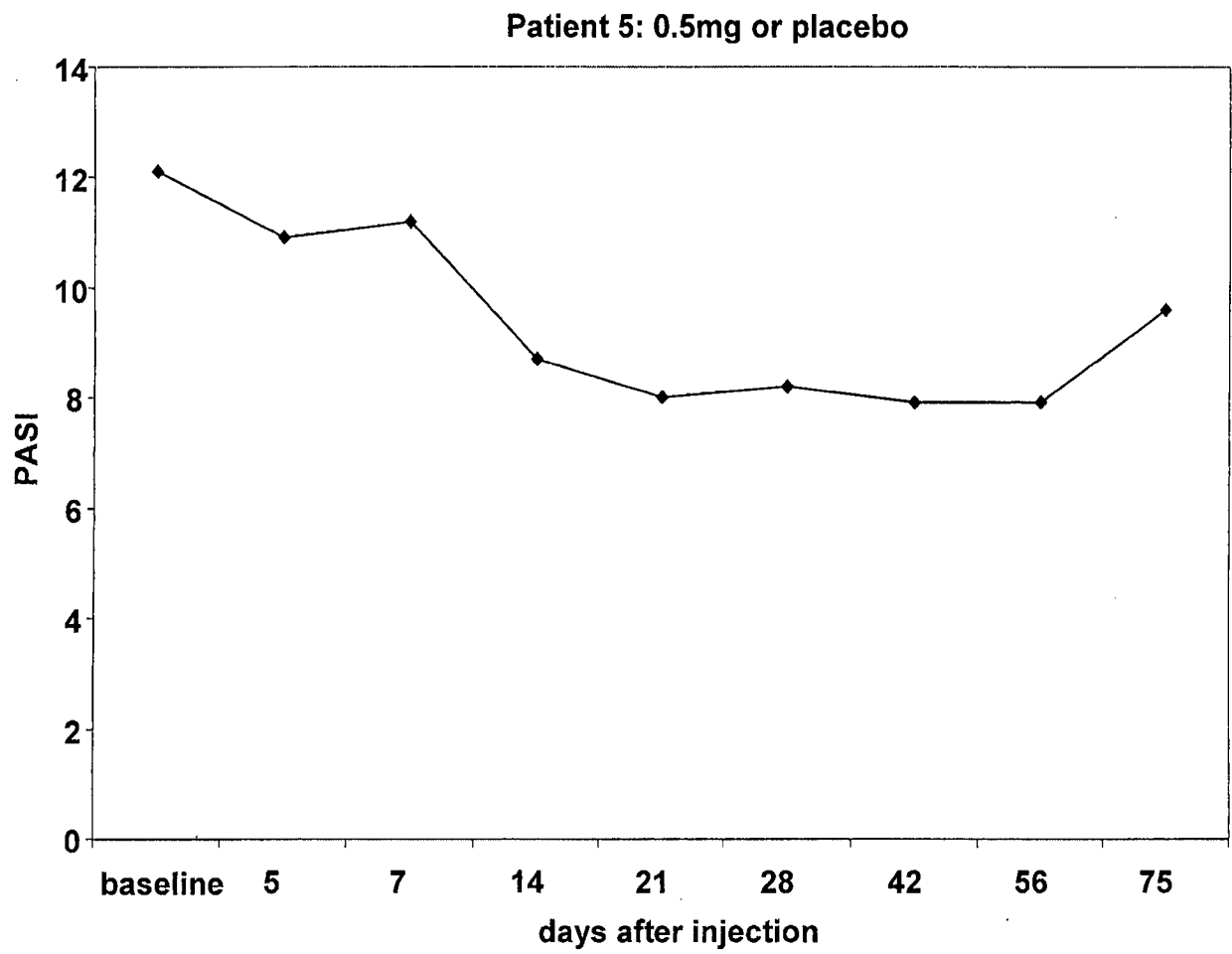


FIGURE 8E

84

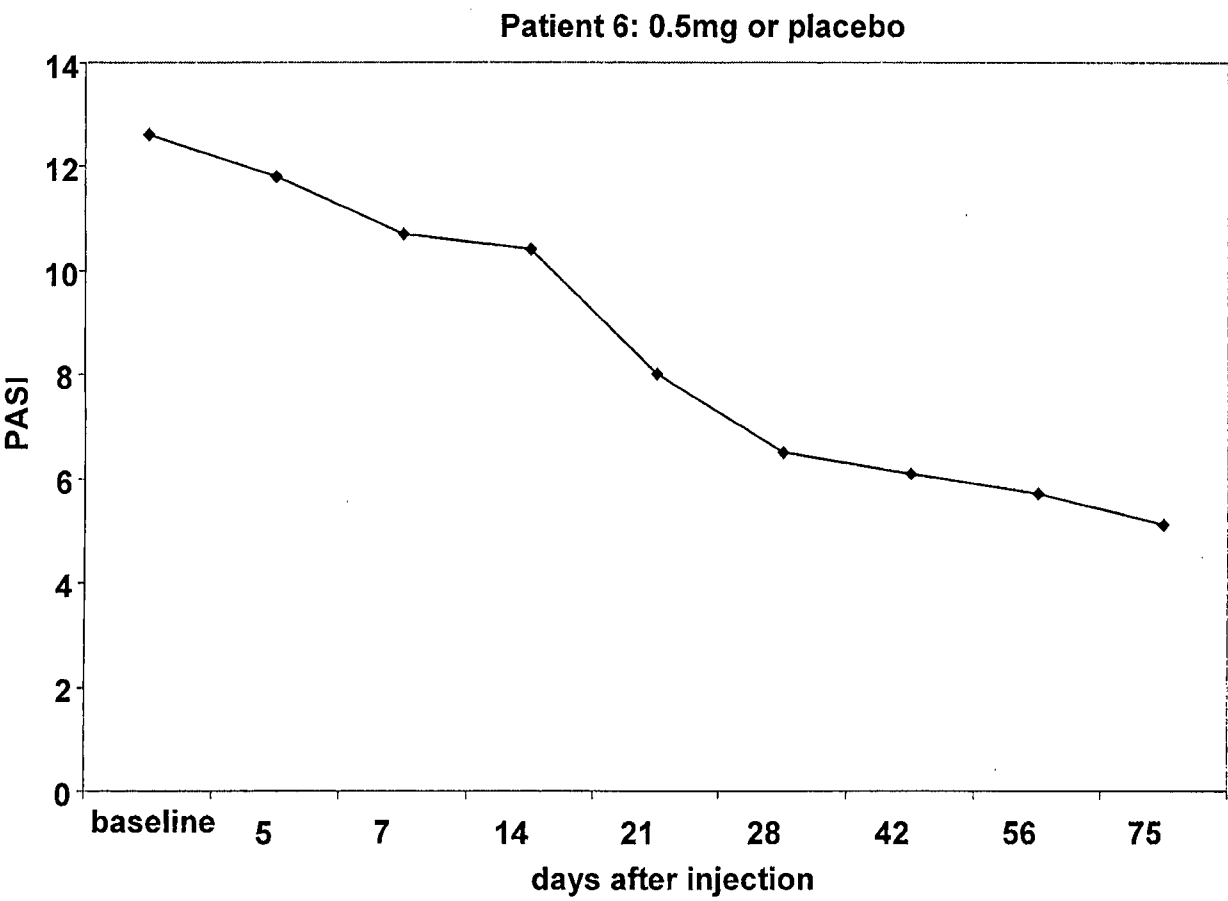


FIGURE 8F

85

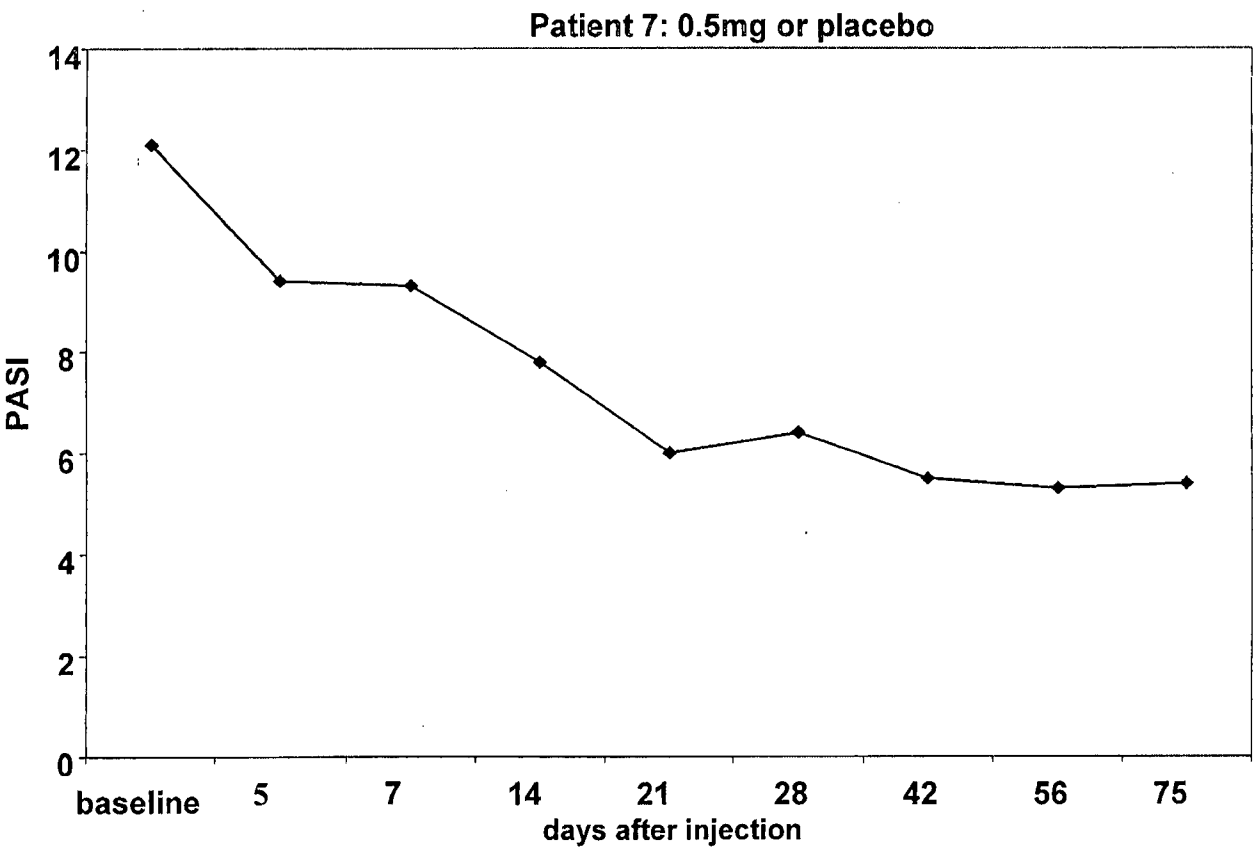


FIGURE 8G

86

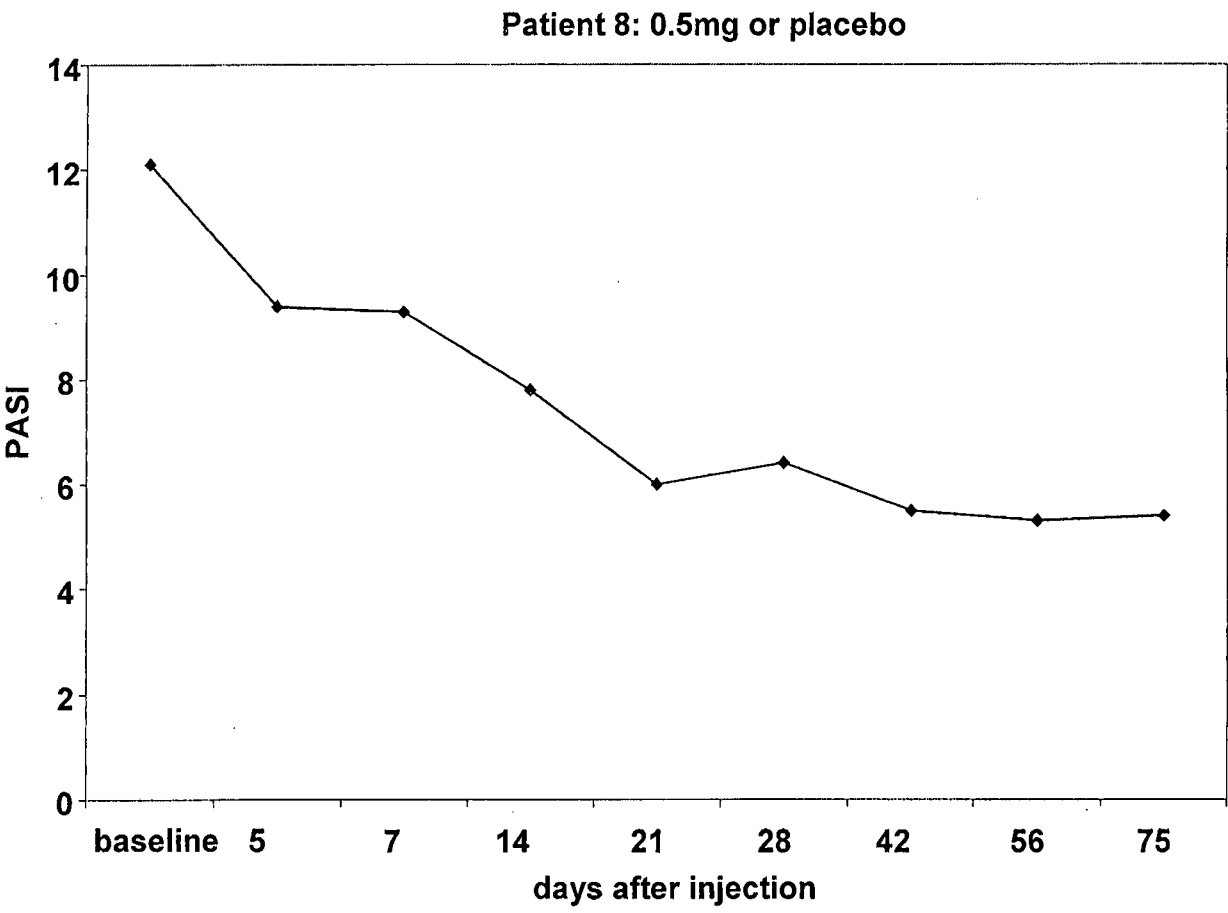


FIGURE 8H

87

Patient 1: 2.5mg or placebo

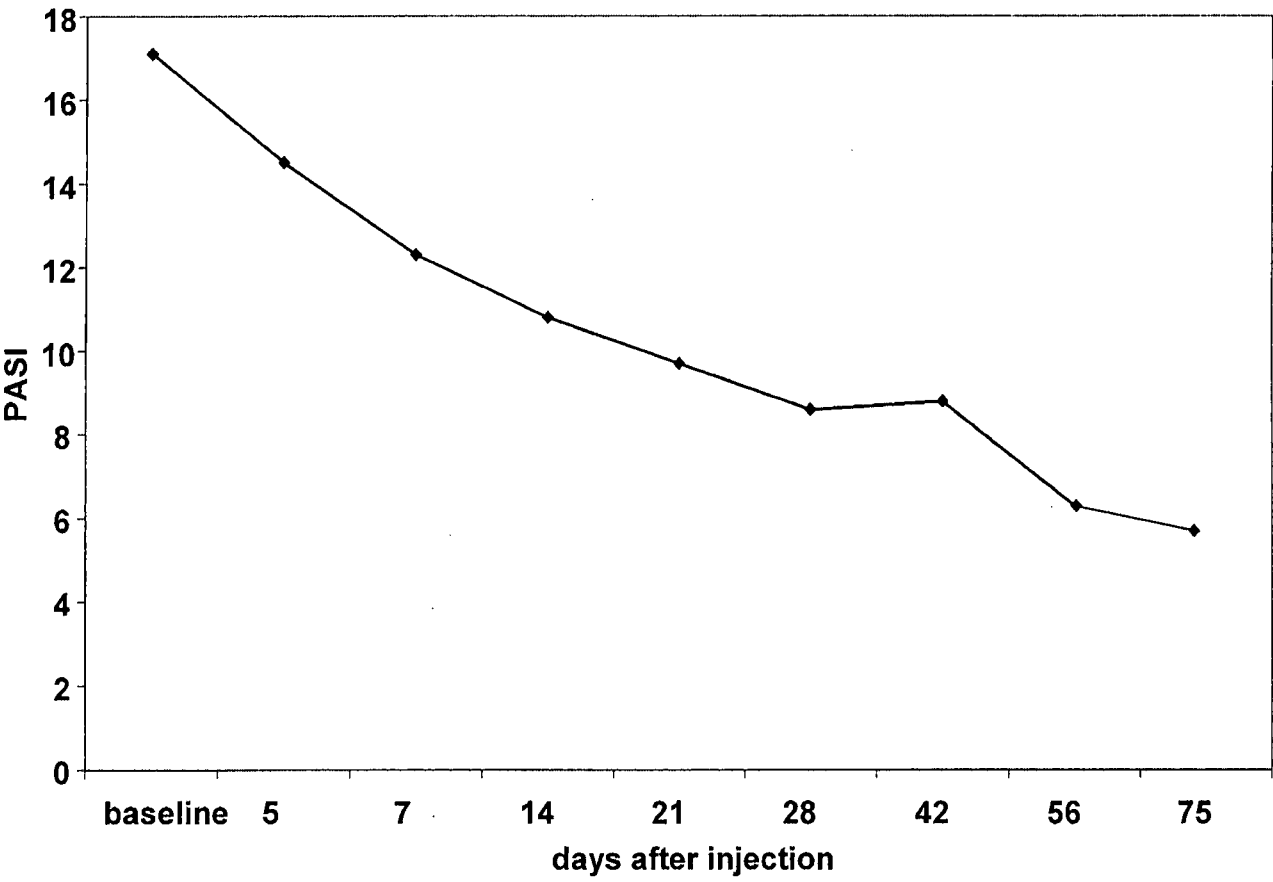


FIGURE 9A

88

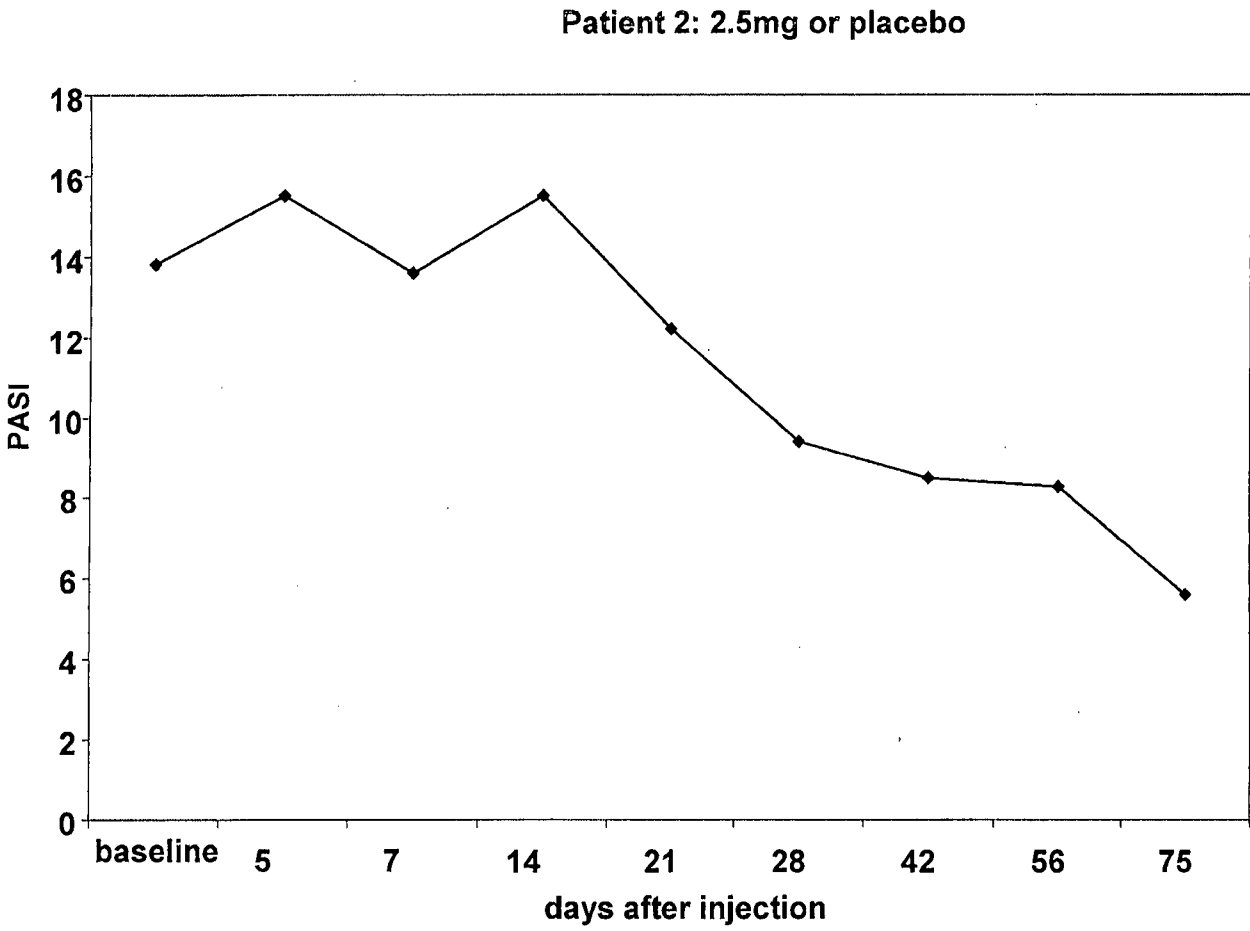


FIGURE 9B

89

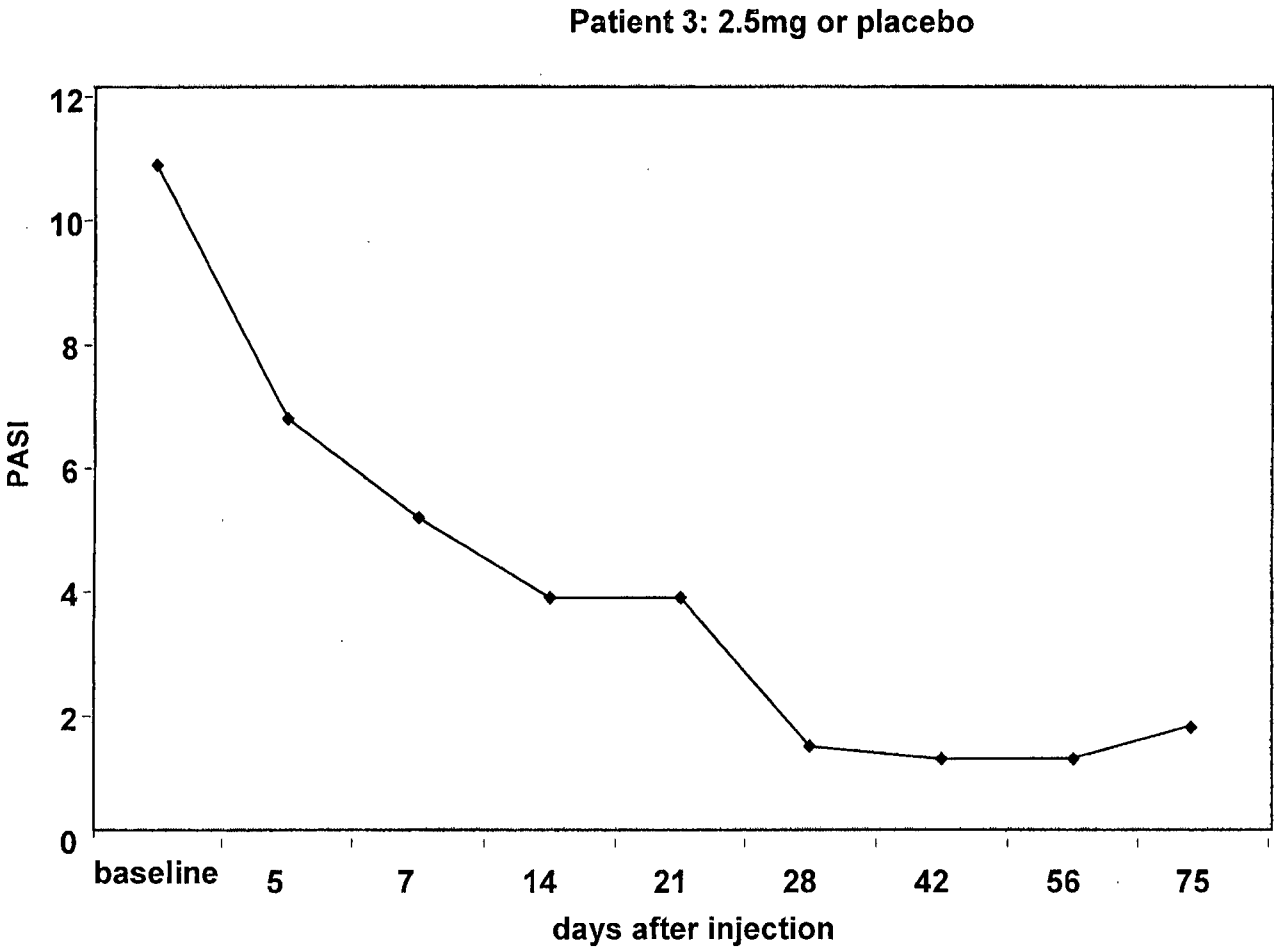


FIGURE 9C

90

Patient 4: 2.5mg or placebo

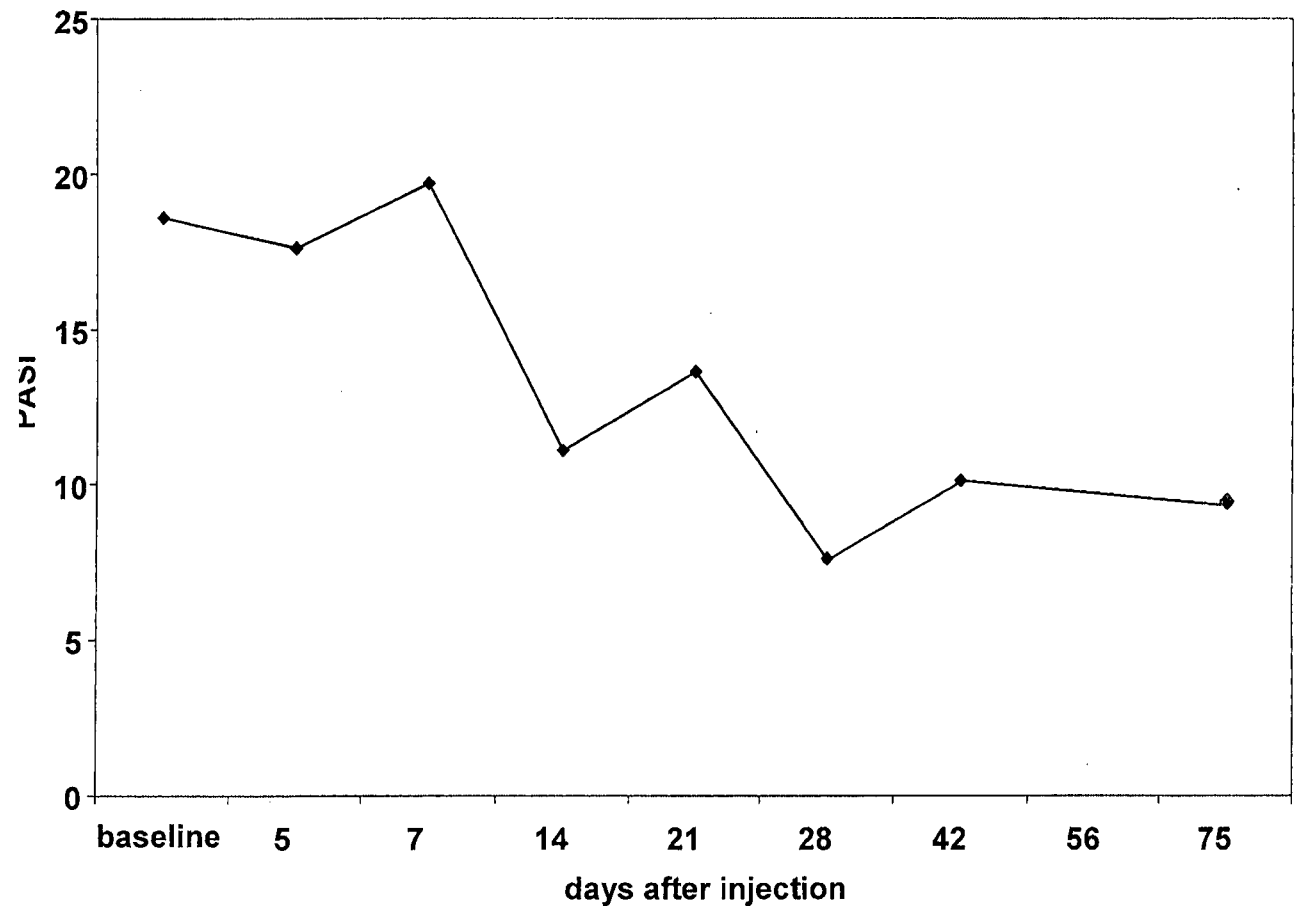


FIGURE 9D

91

Patient 5: 2.5mg or placebo

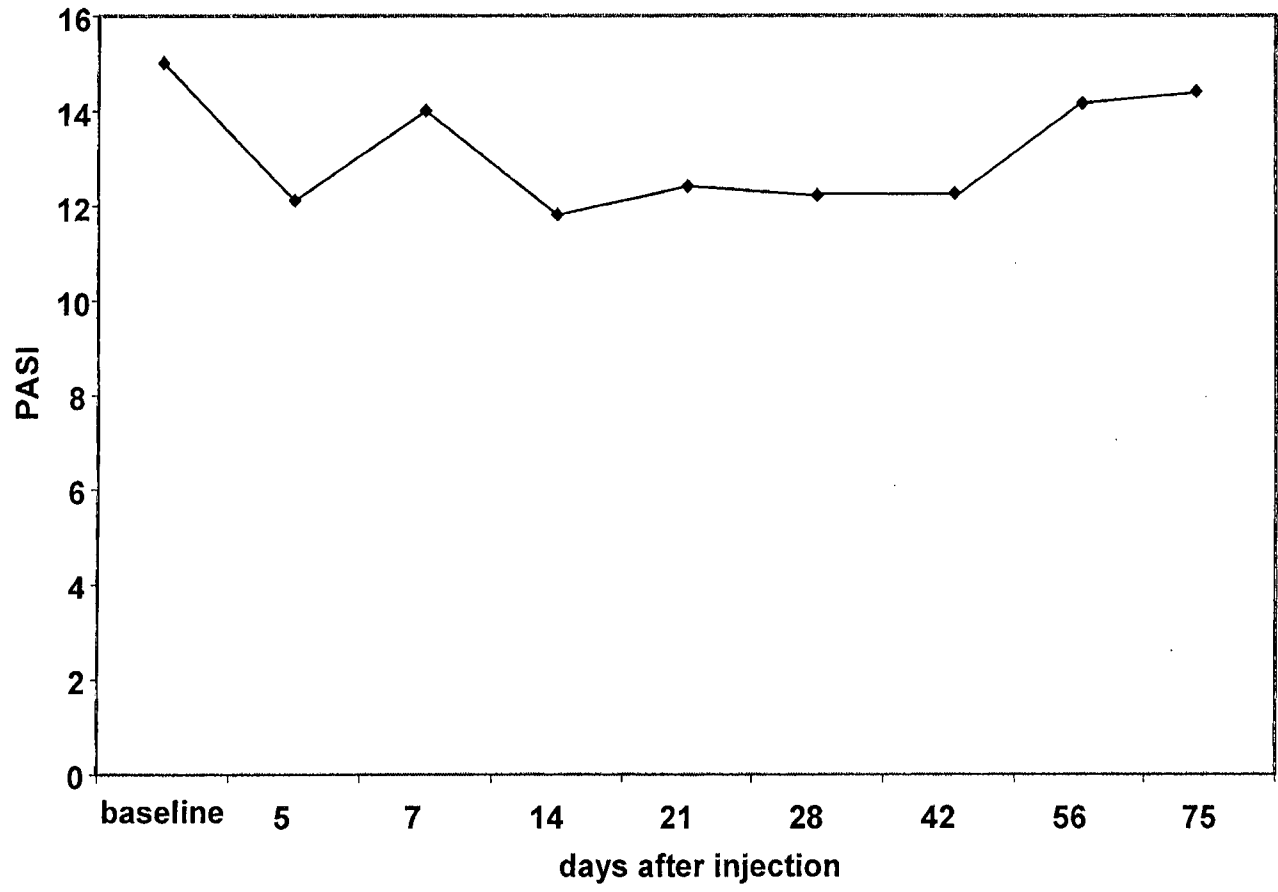


FIGURE 9E

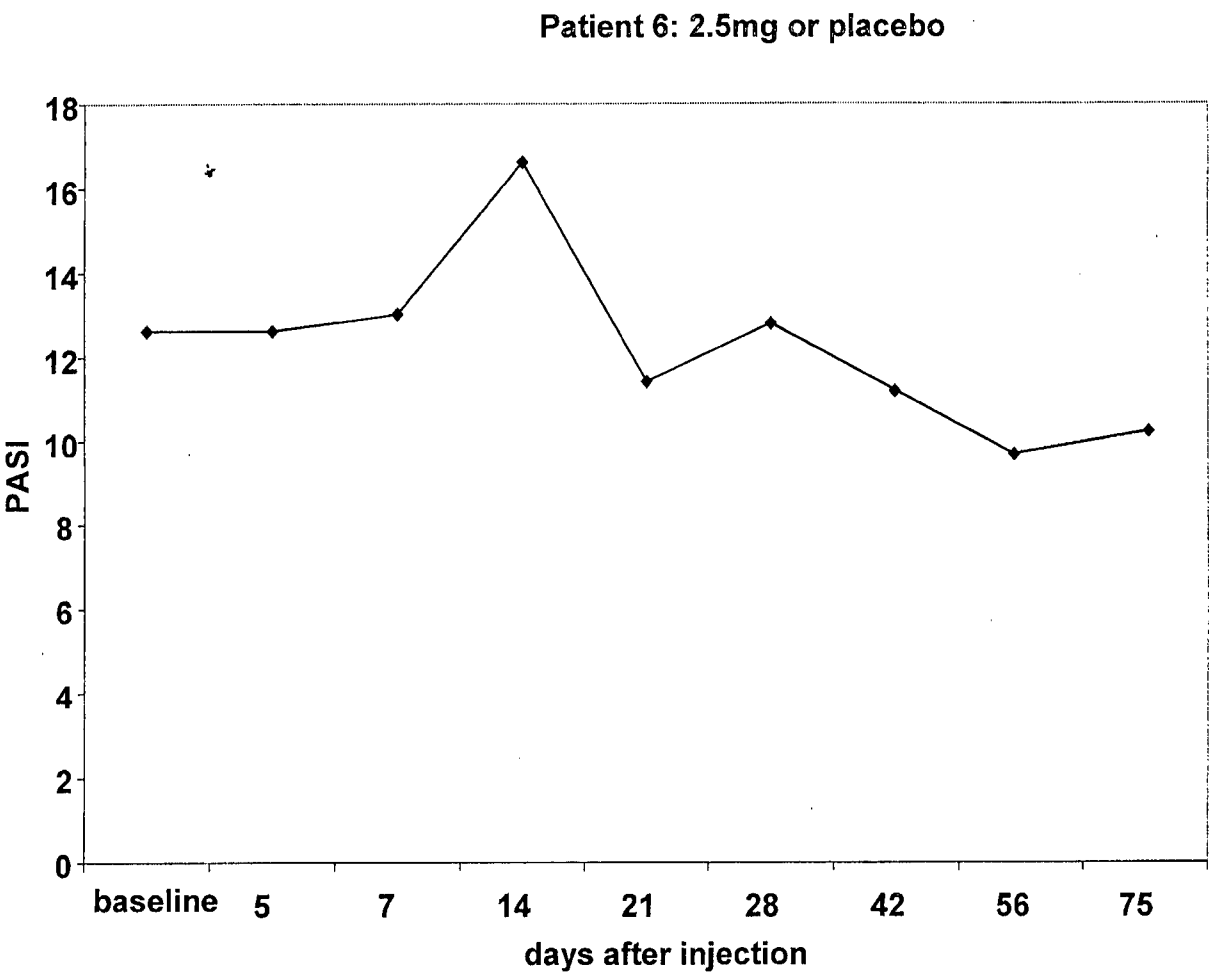


FIGURE 9F

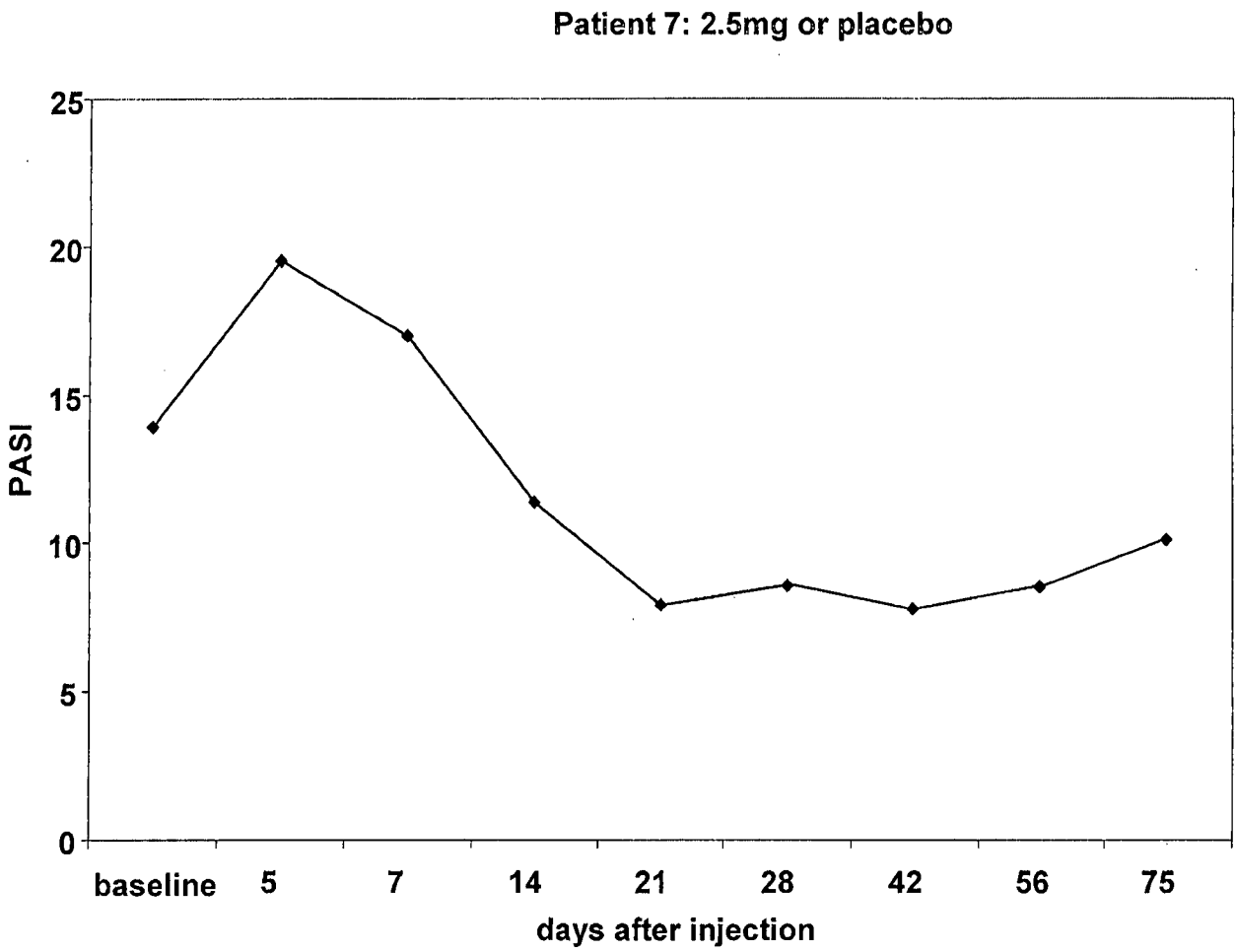


FIGURE 9G

94

Patient 8: 2.5mg or placebo

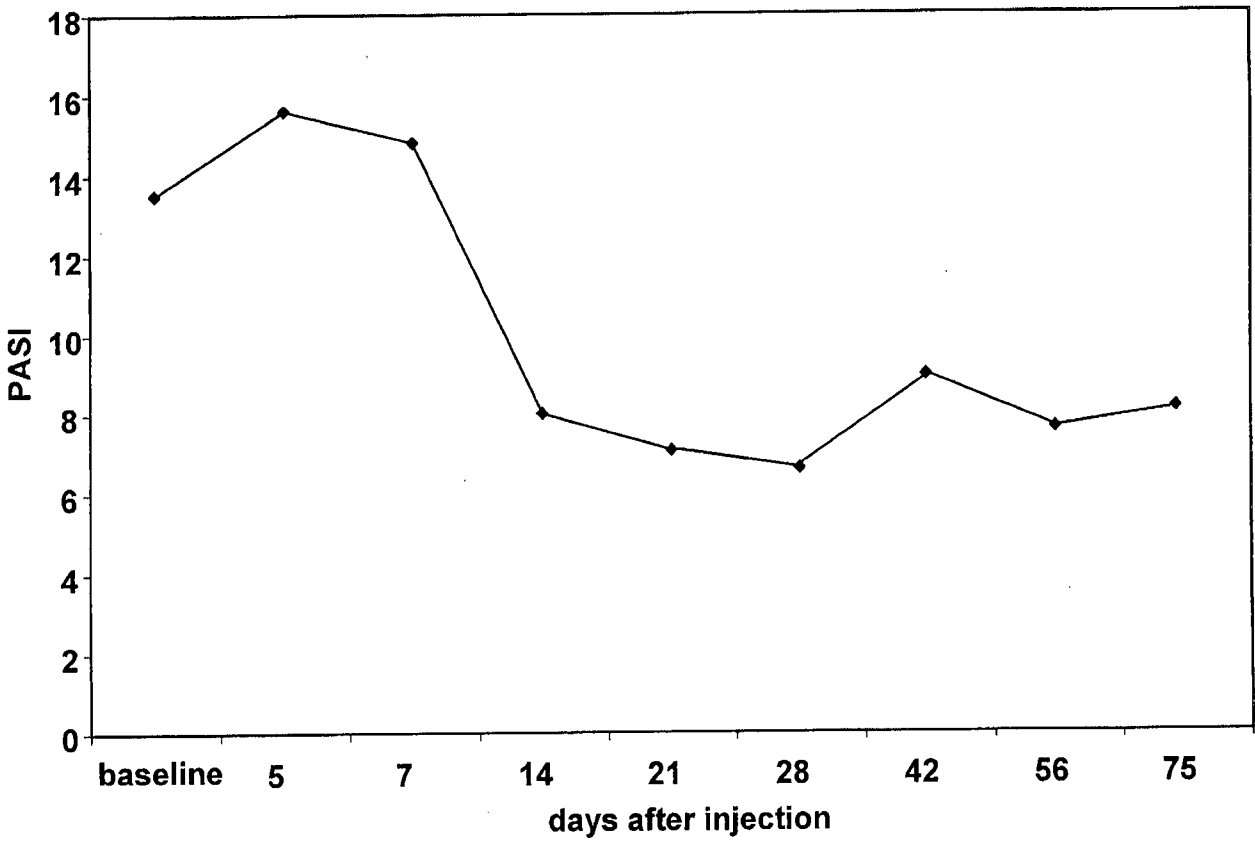


FIGURE 9H

Handwritten signature

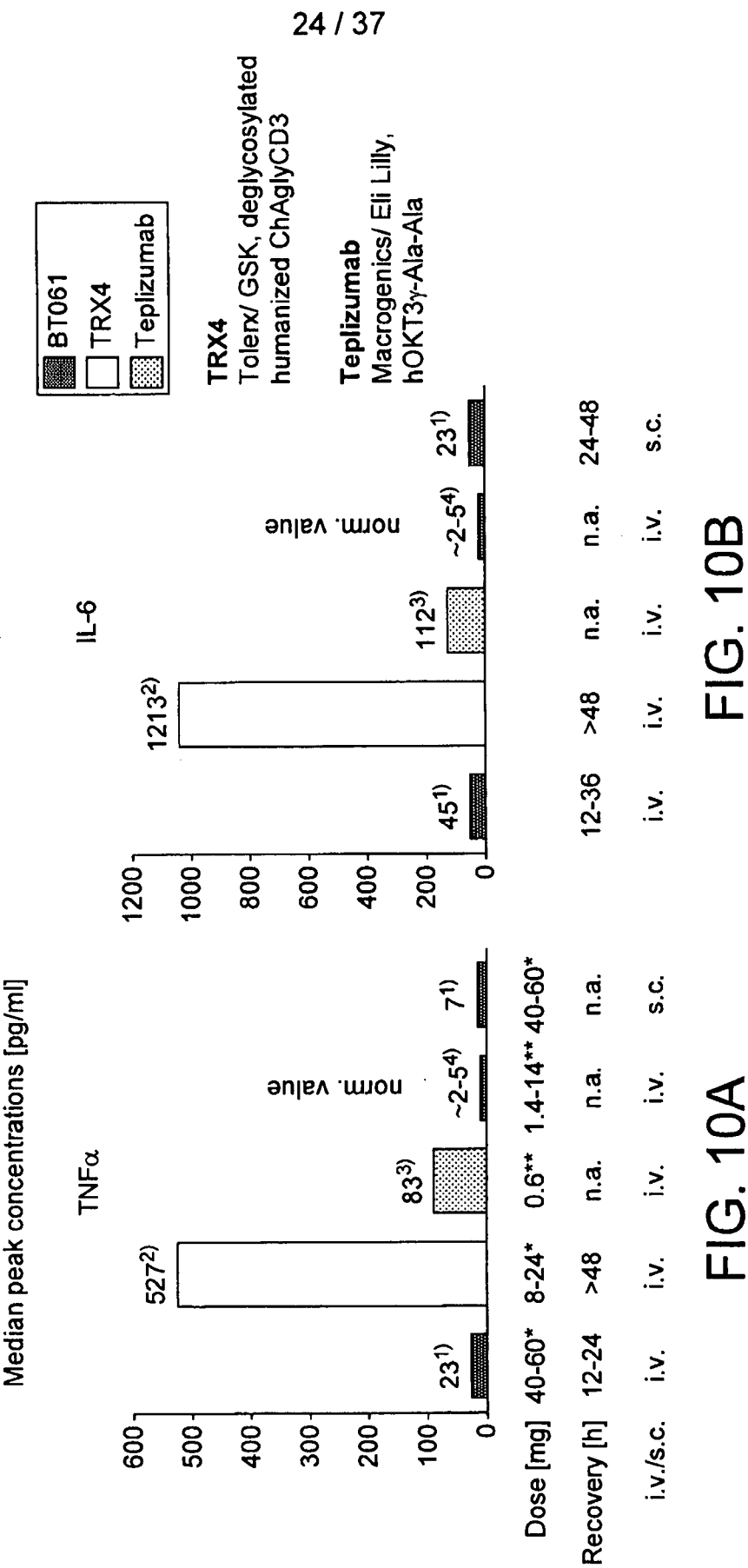


FIG. 10A

FIG. 10B

96

25 / 37

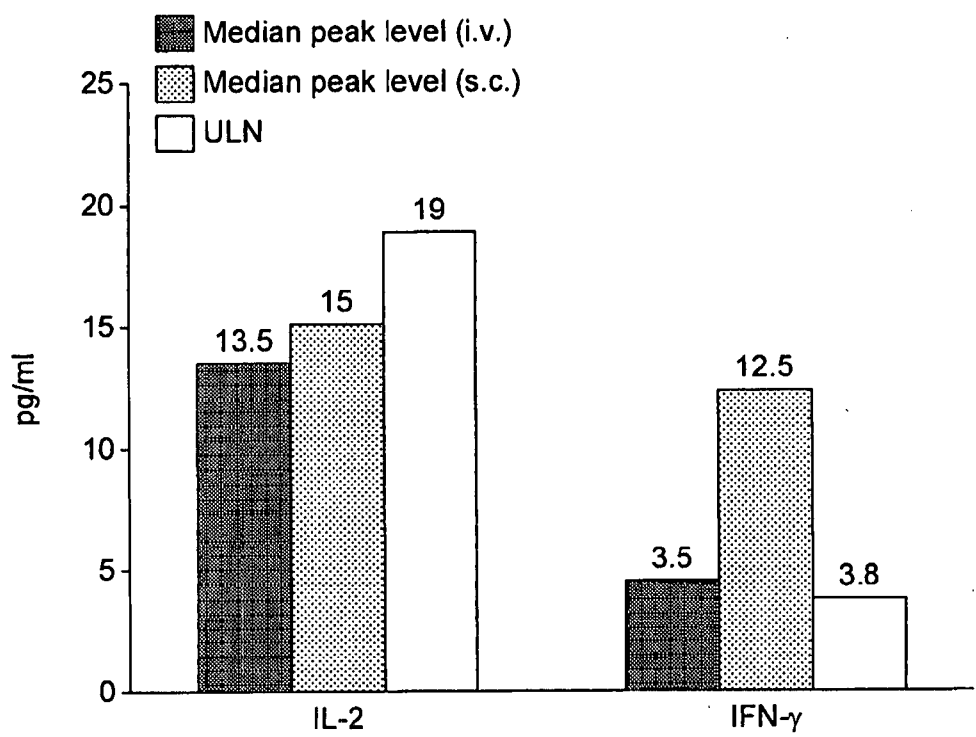


FIG. 11

97

26 / 37

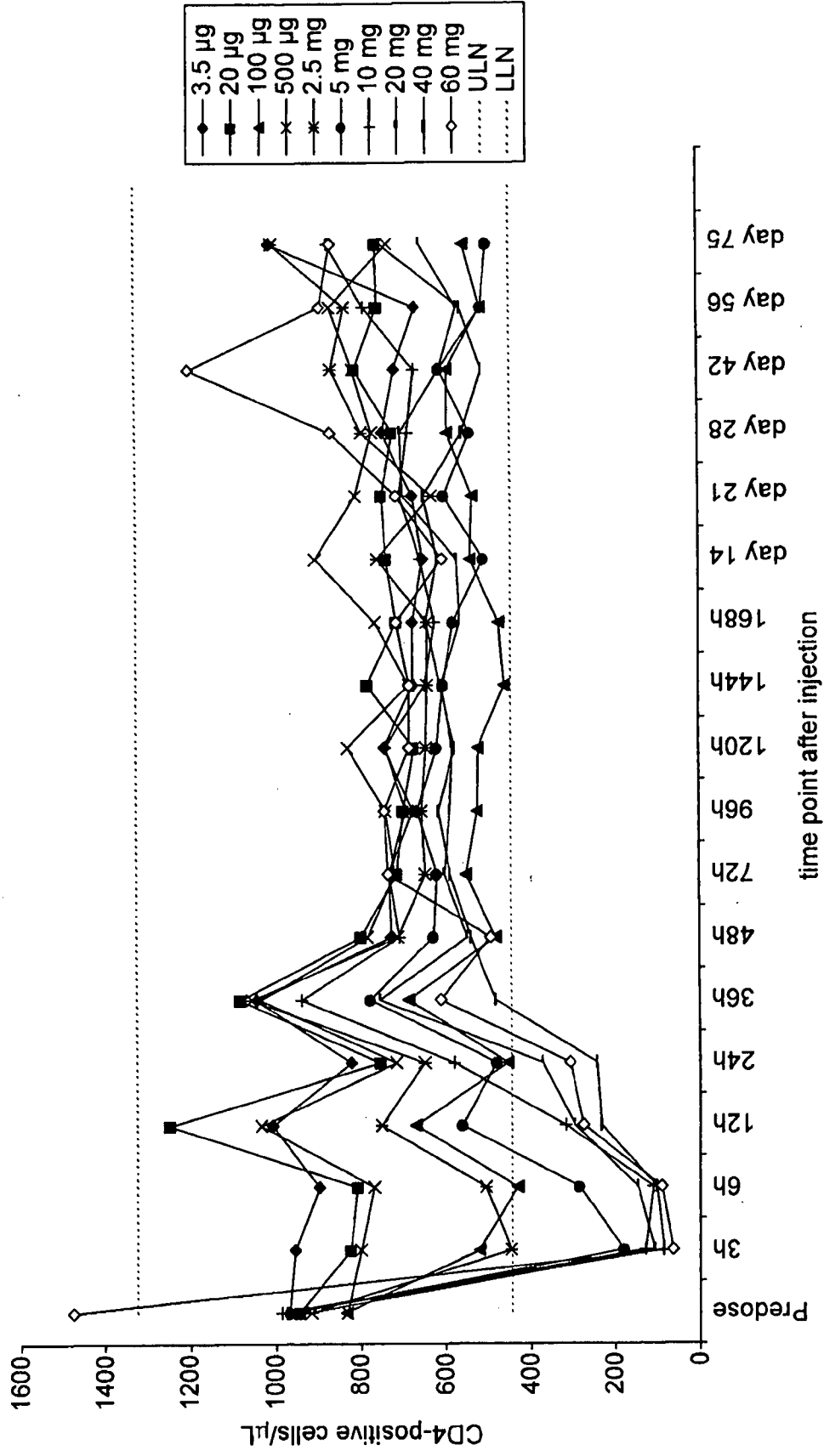


FIG. 12

27 / 37

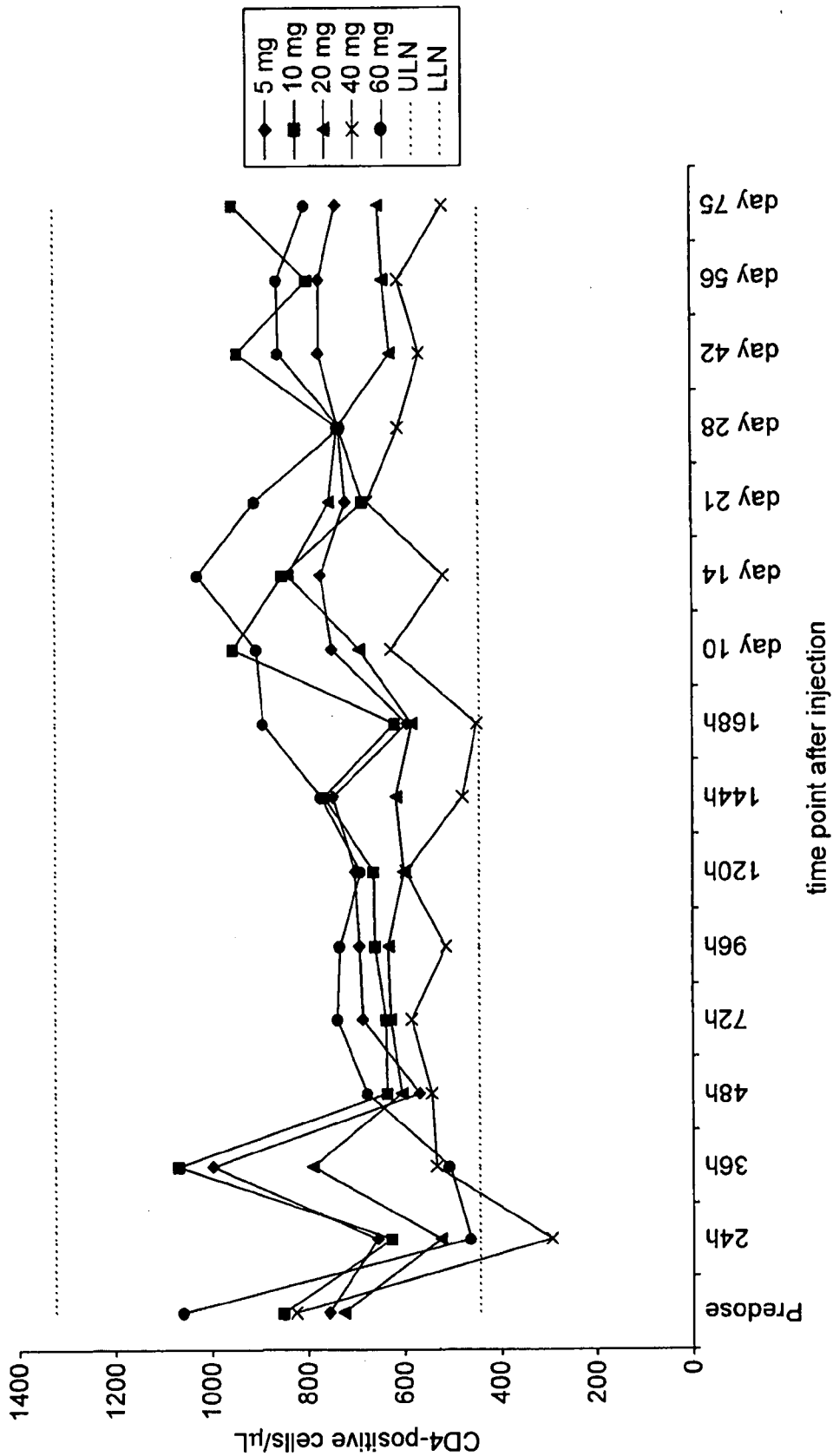


FIG. 13

99

28/37



Area of marked  
Desquamation

Area of  
marked  
Erythema

Area of marked  
Desquamation

FIGURE 14 A

29/37

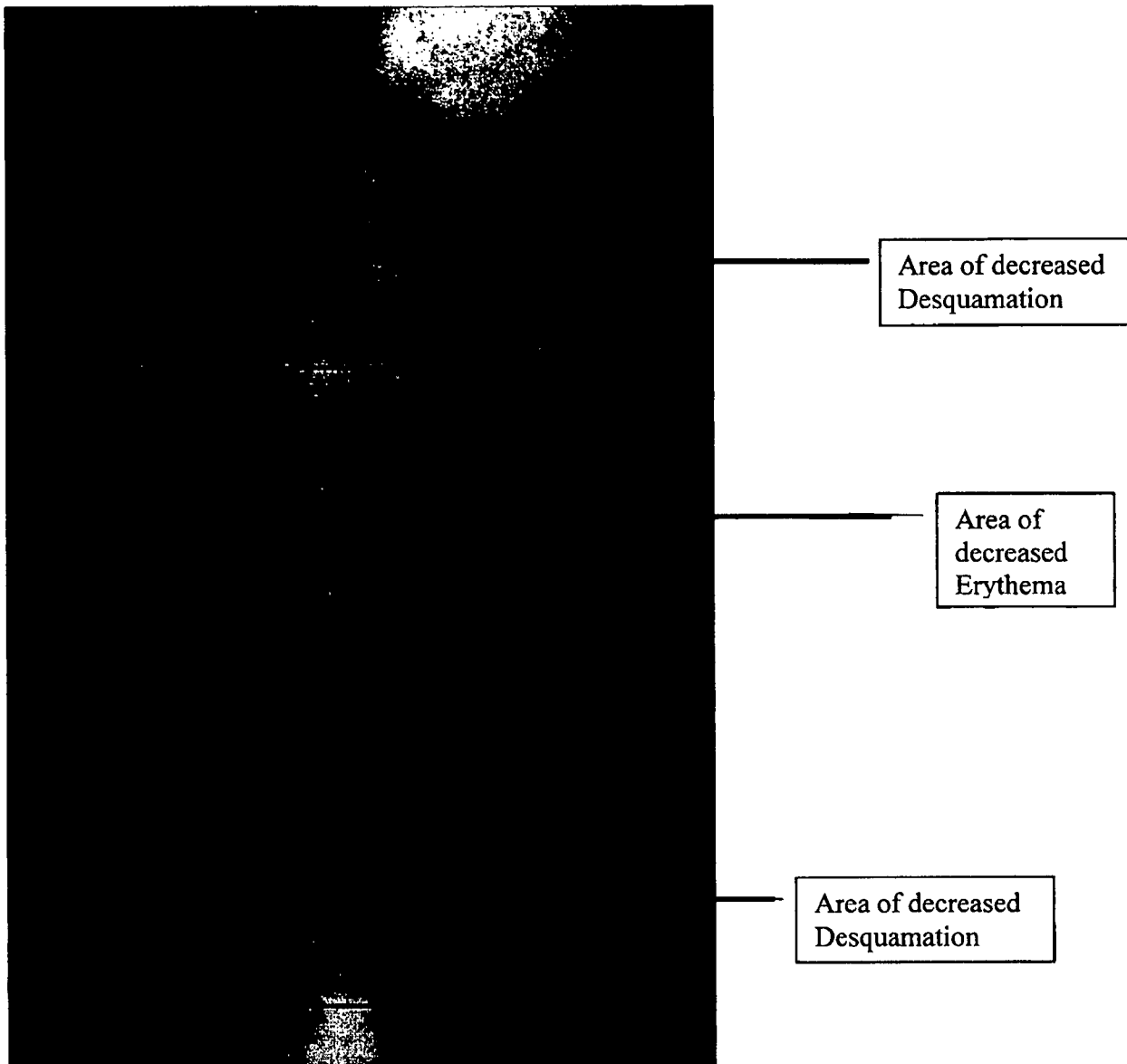


FIGURE 14 B

101

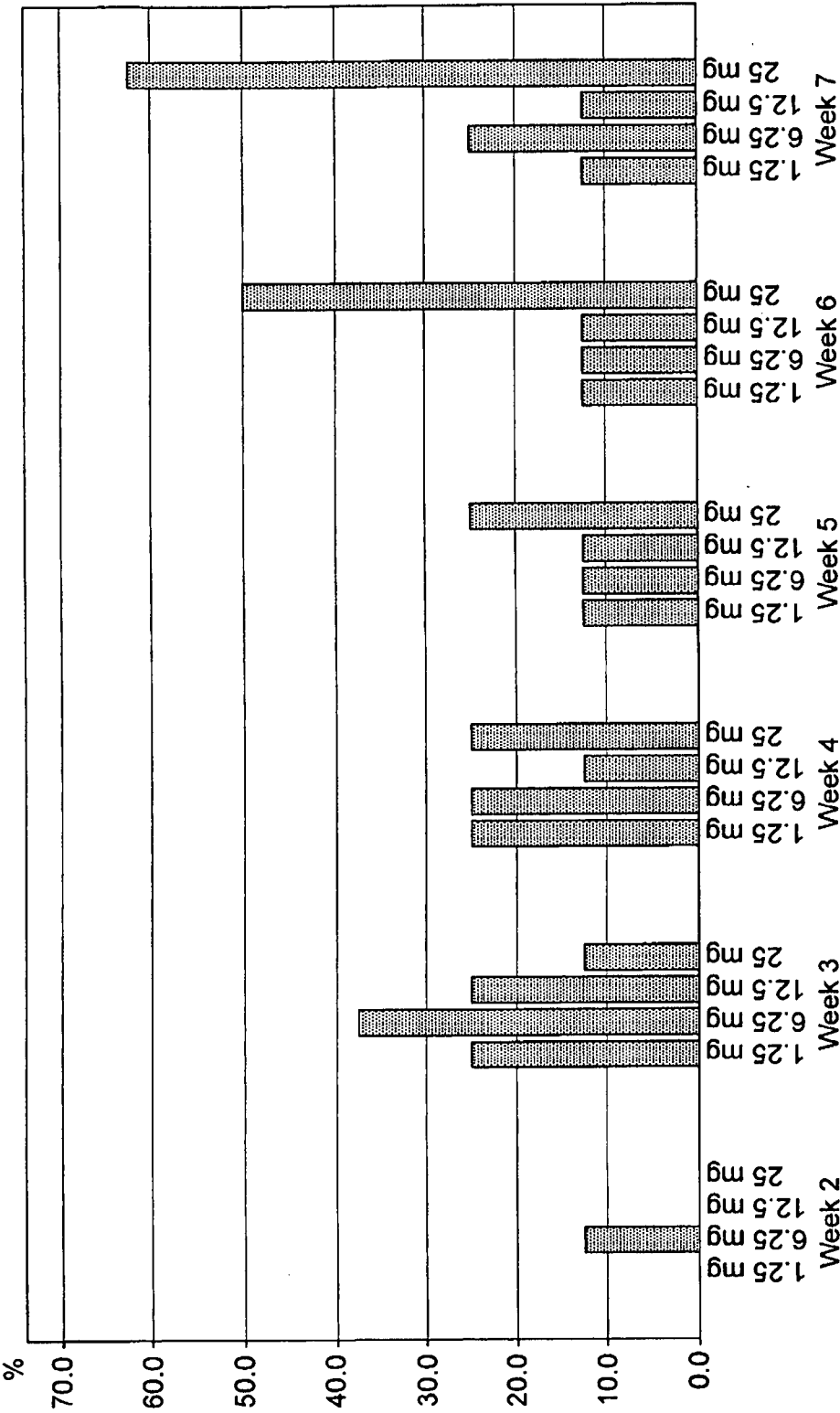


FIG. 15

102

31 / 37

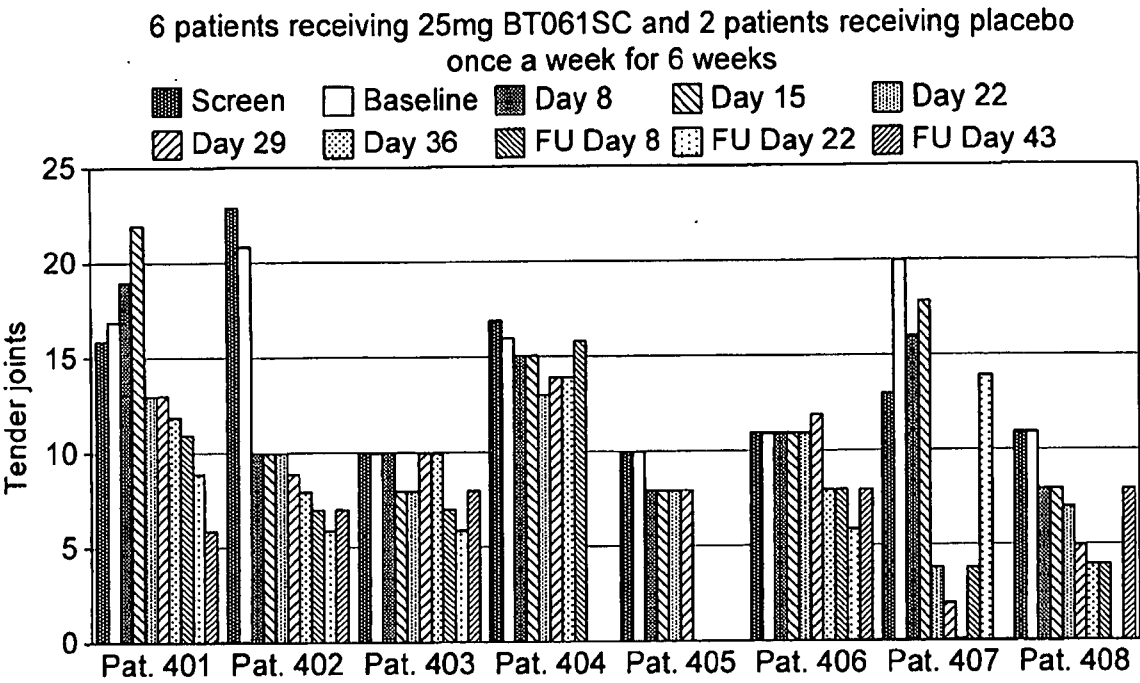


FIG. 16A

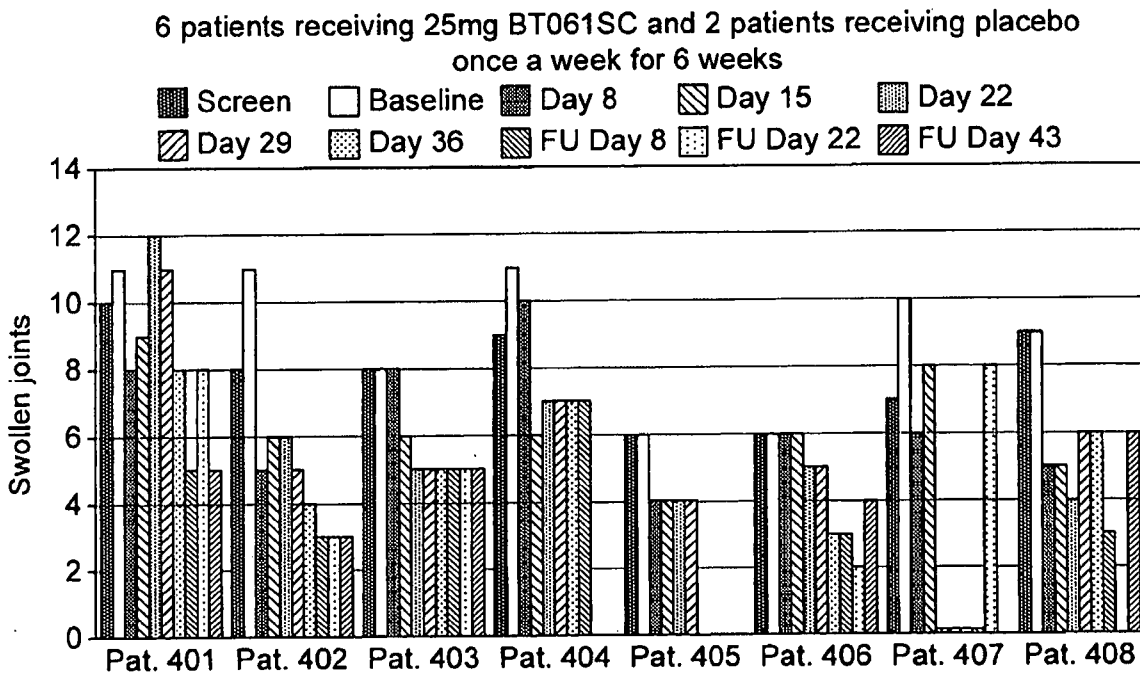


FIG. 16B

103

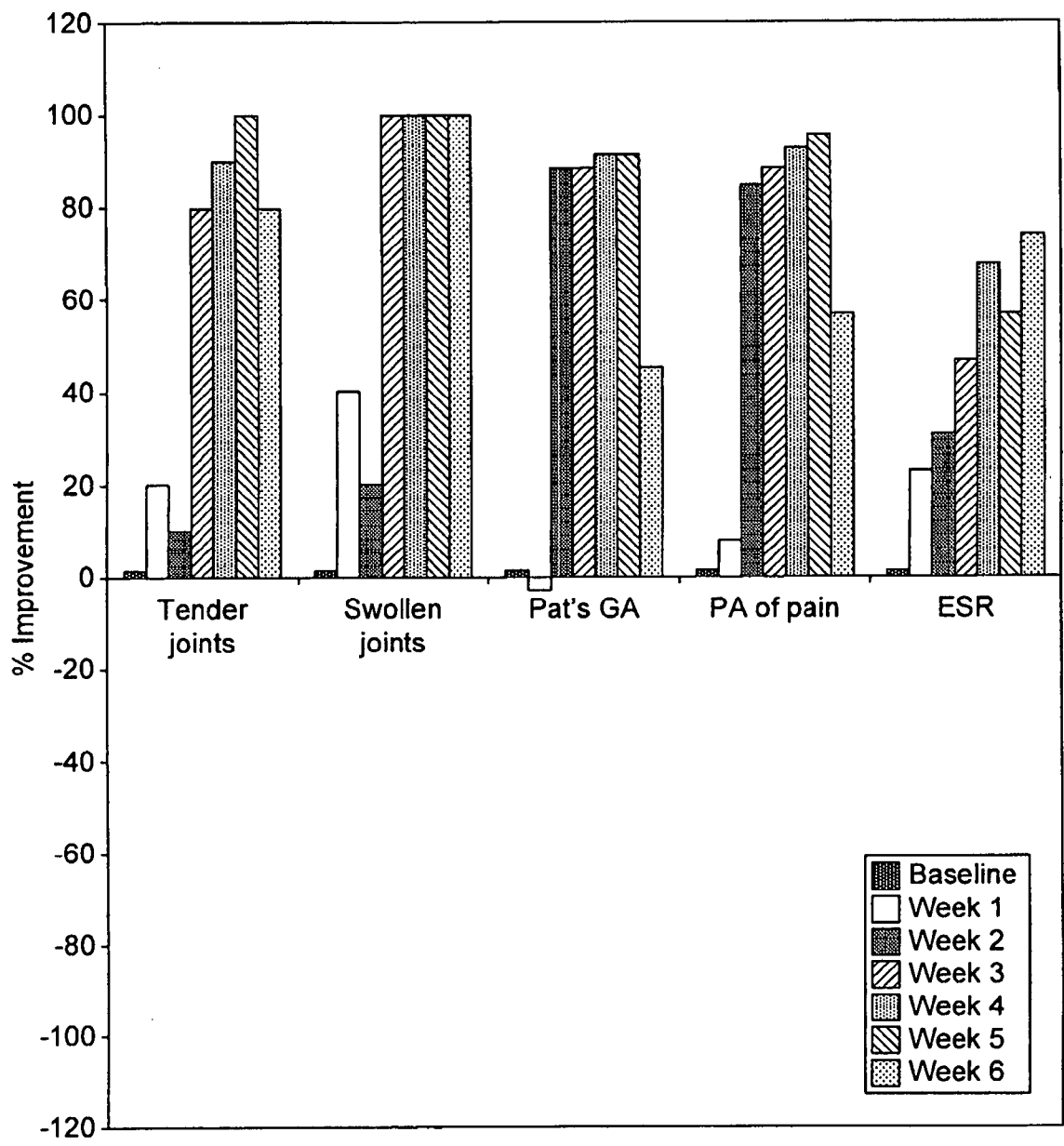


FIG. 17A

104

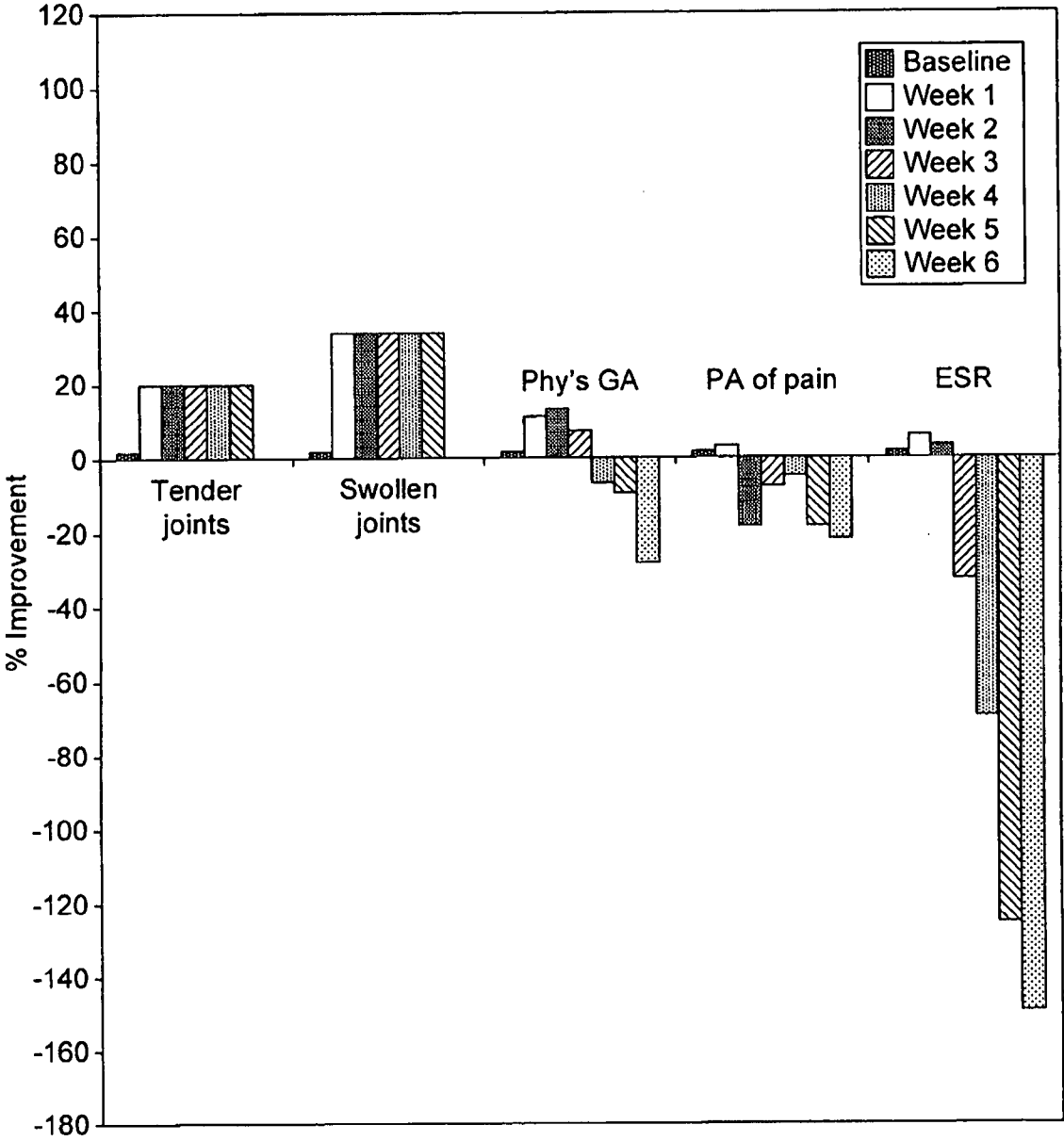


FIG. 17B

105

34 / 37

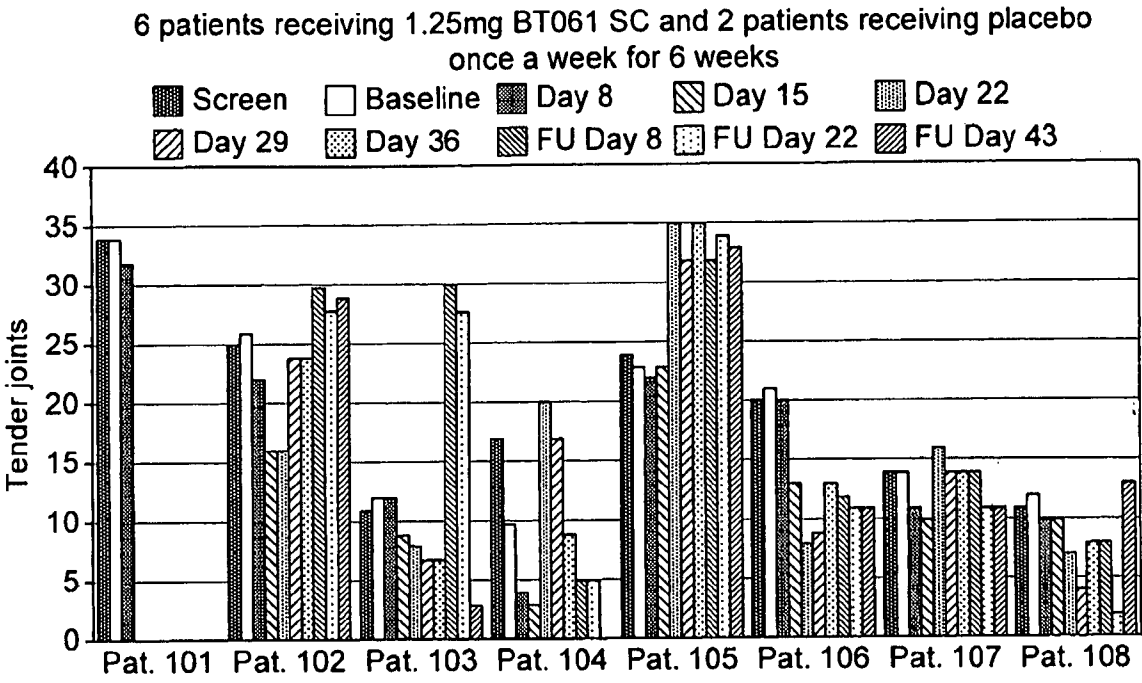


FIG. 18A

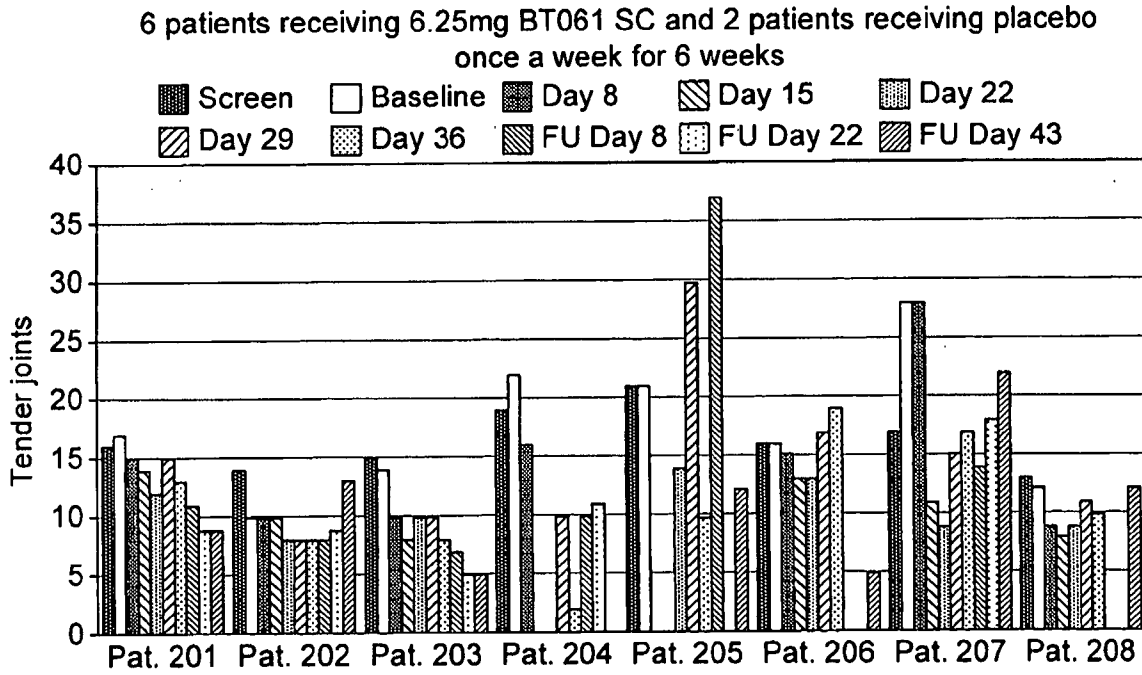


FIG. 18B

106

35 / 37

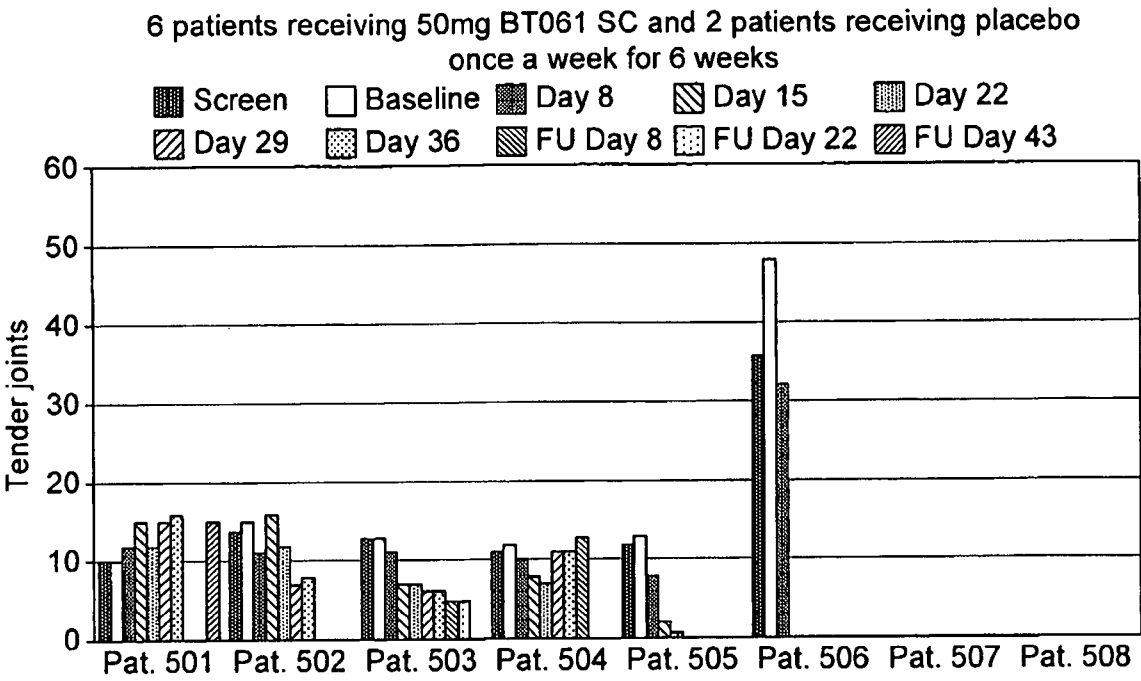


FIG. 19A

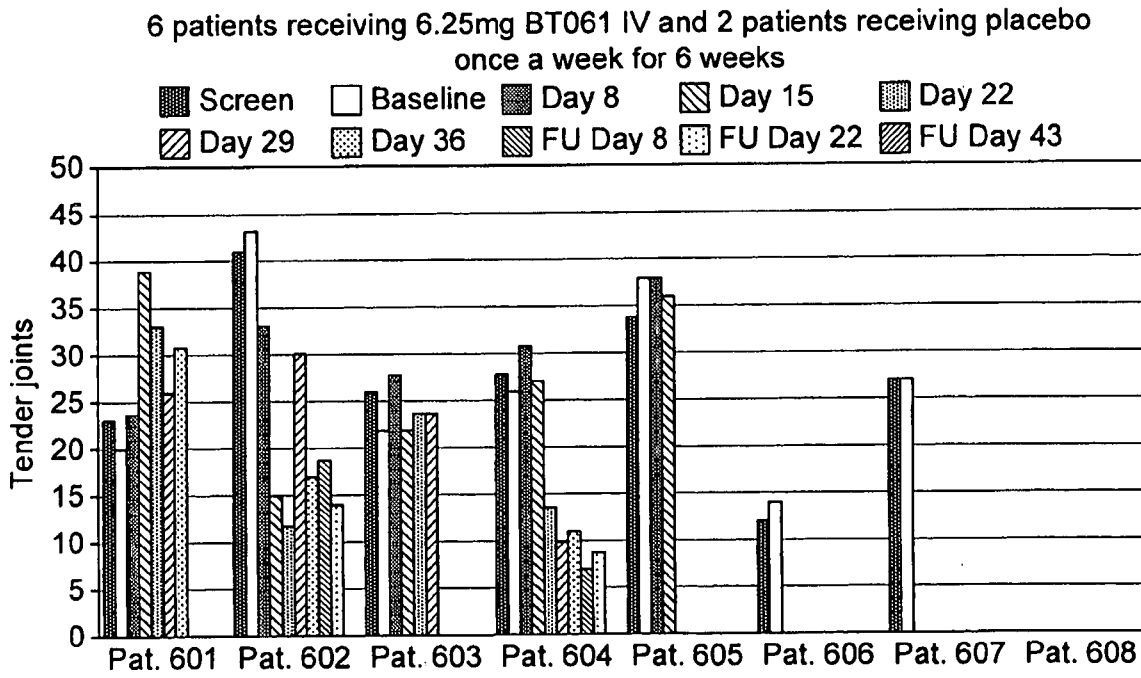


FIG. 19B

107

36 / 37

|          | FR1                      |                                  | CDR1            |   | FR2 |  |
|----------|--------------------------|----------------------------------|-----------------|---|-----|--|
|          | 1                        | 2                                | 3               | 4 |     |  |
|          | 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               | 8 |     |  |
|          | 0123456                  | 78901234567890123456789012345678 |                 |   |     |  |
| mB-F5    | LASILES                  | GVPCRFSGSGSGTDFTLN               | IHPVEEEDAATYYC  |   |     |  |
| hB-F5L4M | LASILES                  | GVPDRLFSGSGSGTDFTLT              | ISSLQAEDVAVYYC  |   |     |  |
| hB-F5L4L | -----                    | -----                            | -----           |   |     |  |
| FK-001   |                          | GVPDRLFSGSGSGTDFTLT              | ISSLQAEDVAVYYC  |   |     |  |
|          |                          |                                  |                 |   |     |  |
|          | CDR3                     |                                  | FR4             |   |     |  |
|          | 9                        | 10                               |                 |   |     |  |
|          | 901234567                | 8901234567                       |                 |   |     |  |
| mB-F5    | QHSRELPWT                | FGGGTKLEIK                       |                 |   |     |  |
| hB-F5L4M | QHSRELPWT                | FGQGTKVEIK                       |                 |   |     |  |
| hB-F5L4L | -----                    | -----                            |                 |   |     |  |
| FK-001   |                          | FGQGTKVEIK                       |                 |   |     |  |

FIG. 20

FIG. 21

Sequence Listing  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Biotest AG

&lt;120&gt; Agent for Treating Disease

&lt;130&gt; 314788.WO/JND/CJS

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; V domain of H chain of humanized antibody hB-F5H37L

&lt;400&gt; 1

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys  
20 25 30Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu  
50 55 60Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala  
100 105 110Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; V domain of K chain of humanized antibody hB-F5L4M

&lt;400&gt; 2

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

110

Sequence Listing

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

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

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

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

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

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

<210> 3  
<211> 550  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Part of plasmid encoding V domain of H chain of humanized antibody hB-F5

<400> 3  
gaggagctcc agacaatgtc tgtctccttc ctcatcttcc tgcccgtgct gggcctccca 60  
tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg aggggtgttt 120  
cactttgctg tttccttttg tctccagggtg tctgtgcaga ggaacagctt gtggagtctg 180  
ggggaggctt ggtgaaaccc ggaggttctc tgaggctctc ctgtgcagcc tcgggtttca 240  
gtttcagtga ctgccggatg tactgggttc gccaggctcc agggaagggg ctggagtggg 300  
ttggtgtgat ttcagtcaaa tctgagaatt atggagcaaa ttatgcagag tctgtgaggg 360  
gcagattcac tatttcaaga gatgattcaa aaaacacggt ctatctgcag atgaacagct 420  
tgaagaccga agacactgcc gtttattatt gtagtgcctc ctattatagg tacgacgtgg 480  
gggcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca ggtaagaatg 540  
gccaagcttg 550

<210> 4  
<211> 498  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Part of plasmid encoding V domain of K chain of humanized antibody hB-F5

<400> 4  
ggaggatcca attatctgct gacttataat actactagaa agcaaattta aatgacatat 60  
ttcaattata tctgagacag cgtgtataag tttatgtata atcattgtcc attcctgact 120

119

Sequence Listing

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

<210> 5  
<211> 372  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

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

<210> 6  
<211> 383  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 6  
gacattgtgc tgacacagtc tccttcttcc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60  
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac 120  
caacagatcc caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccat cctagaatct 180  
ggggctccctg gcaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg 300  
acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 360  
atcttccac catccagtga gca 383

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

<400> 7  
Gln Glu Tyr Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Asn  
1 5 10 15

(12

Sequence Listing

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys  
20 25 30  
Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu  
50 55 60  
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
65 70 75 80  
Val Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

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

<400> 8

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

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

113

Sequence Listing

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
20

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

<400> 10

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

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

<400> 11

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

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

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

<400> 12

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

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

<400> 13

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

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

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

114

Sequence Listing

<400> 14

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

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

<400> 15

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

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

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

<400> 16

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

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

<220>  
<223> V domain of the H chain of humanized antibody hB-F5H37V

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

## Sequence Listing

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

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

<220>  
 <223> V domain of K chain of humanized antibody hB-F5L4L

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

### AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunes. La invención involucra un agente altamente efectivo tal como un anticuerpo monoclonal humanizado que puede administrarse a pacientes en dosis menores a las previamente conocidas. Es particularmente efectivo para pacientes que tienen enfermedades o características que requieren dosis menores 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 anticuerpo.

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 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-

107

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.

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 las 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.

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 ignorancia inmune (anergia), delección periférica y supresión activa.

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

(2000); Read et al., J Exp. Med. 192: 295-302 (2000). En general, 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)).

10           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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y Tregs inducidas periféricamente Tr1 y Th3. Además, NKTregs y Tregs CD8<sup>+</sup> se han descrito en humanos y  
15 roedores (Fehérvári et al., J. Clin. Investigation 114: 1209-1217 (2004)).

Células Treg derivadas de timo (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg de origen natural) son las células regulatorias principales involucradas, que utilizan una matriz de TCRs dirigidas a  
20 reconocimiento autoantígeno a fin de mantener homeostasis inmune in la periferia y regular autoinmunidad y respuestas inmunes patogénicas.

Las características esenciales de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg de origen natural son:

- 25           i) son células T CD4<sup>+</sup> y constituyen 5-10% de las células T CD4<sup>+</sup> periféricas
- ii) maduran en el timo
- iii) en general se caracterizan por la expresión combinada del receptor IL-2 (CD25), la isoforma molecular  
30 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-Payer et al.; J. Immunol. 160: 1212-1218 (1998)).

La inclusión del sub-conjunto  $CD4^+CD25^+$  en los 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, epidimitis 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs  
5 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs mediante TCR pero Tregs no muestra una  
10 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<sup>+</sup> T y células T CD8<sup>+</sup> así como inhibir la activación de célula B y expansión  
15 clonal.

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

Dentro del sub-conjunto de células T CD4<sup>+</sup> al menos 2 tipos más diferentes de células con función supresora pueden existir, que se inducen después de  
30 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs con 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 y cantidades moderadas de TGF- $\beta$  (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- $\beta$  y cantidades variables de IL-4 y IL-10, y IL-4, mismo, se mostró que es un factor clave para diferenciación de células Th3, en contraste con células Tr1 (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  
5 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  
10 citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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  
15 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  
20 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 TGN  
25 1412 (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).

30 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 5 confirman el interés potencial de este enfoque, también desarrollan varios aspectos a resolver a fin de hacer anti-CD4 mAbs más adecuados para utilizar en la práctica clínica rutinaria.

Varios mecanismos diferentes de acción para CD4 10 mAbs se han propuesto incluyendo: (1) antagonismo de interacciones CD4-MHC II que resultan en inhibición de 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 15 través del receptor CD4 en la ausencia de entrelazamiento de receptor de células T, que puede suprimir activación de 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 20 anticuerpo (ADCC) que lleva a agotamiento de células T CD4, y (5) estímulo de células T regulatorias.

Varios anticuerpos anti-CD4 que hacen diana en células T han estado en desarrollo clínico (Schulze-Koops et al., J Rheumatol. 25(11): 2065-76 (1998); Mason et al., 25 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); 30 Jabado et al., J Immunol. 158(1): 94-103 (1997)) primordialmente dirigida al agotamiento de células CD4 con

124

solo unos cuantos anticuerpos cd4 que se han atribuido a los otros mecanismos como TRX-1, TNX-355, IDEC-151, OKTcdr4A.

Respuesta clínica en enfermedades autoinmunes se correlaciona con bloqueo de células T CD4+ directamente en el sitio de inflamación en vez de acción con células T CD4+ en sangre periférica. Por tanto dosis con altas concentraciones de anticuerpo hasta de 1000 mg en ciclos sencillos o múltiples, de preferencia en el intervalo de 10-450 mg en ciclos sencillos o múltiples deben ser empleadas para lograr beneficio clínico (Schulze-Koops et al., J Rheumatol. 25(11): 2065-76 (1998); (Mason et al., J. Rheumatol. 29 (2): 220-229 (2002); Choy et al., Rheumatology 39(10): 1139-46 (2000); Choy et al., Rheumatology 41:1142-1148 (2002); Kon et al., Eur. Respir J. 18(1):45-52 (2001)); (Skov et al., Arch Dermatol. 139(11): 1433-1439 (2003)); Kuritzkes et al., J Infect Dis 2004, 189:286-91 (2004); Hepburn et al., Rheumatology 42(1):54-61 (2003)).

El anticuerpo B-F5 (IgG1 murino anti-humano CD4) 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 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 significativa (Wendling et al. J Rheumatol; 25(8):1457-61, 1998).

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

En enfermedad de Crohn severa, no se observó mejora significativa en pacientes que reciben B-F5 por 7  
10 días consecutivos (Canva-Delcambre et al., Aliment 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  
15 (Dantal et al. Transplantation, 27; 62(10):1502-6, 1996).

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 anti-ratón en los recipientes humanos. Esto no solo  
20 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.

Esta desventaja, en principio puede evitarse por  
25 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  
30 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 artritis reumatoide. Esta solicitud de patente describe composiciones para la administración parenteral, 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.

El estudio también se describió por Wijdenes et al., en un extracto y cartel presentado en la conferencia EULAR, junio 2005. Ellos describieron 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 (Wijdenes et al., Abstract and poster, EULAR conference, June 2005).

El anticuerpo descrito en este estudio no se describe conveniente para utilizar a dosis inferiores, y todavía es conveniente encontrar tratamientos a dosis inferiores 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 objetivo de la presente invención es encontrar tratamientos autoinmunes que pueden ser aplicados en menores dosis a pacientes a fin de mejorar la respuesta a tratamiento para pacientes que no son capaces de tolerar las dosis actuales.

De acuerdo con esto, la presente invención 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 0.2 mg a 30 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 la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.10 a 20 mg/m<sup>2</sup>.

Aún más, la invención 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 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 T regulatorias CD4+CD25+, en donde el agente está presente en una concentración de 10 µg/ml a 150 mg/ml.

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

En particular, la invención proporciona el uso del agente como se define anteriormente 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 anteriormente. La invención también proporciona un agente como se define anteriormente para utilizar en el tratamiento de enfermedad autoinmune en donde el agente se va a administrar a un sujeto en una  
5 dosis como se define anteriormente.

Se apreciará de las dosis anteriores que los inventores han encontrado de manera sorprendente que bajas dosis del anticuerpo BT061 proporcionan activación efectiva y específica de células T regulatorias de origen natural  
10 (CD4+CD25+ Tregs) que proporcionan un efecto clínico in vivo a dosis mucho menores que las previamente empleadas, tales como aquellas descritas en WO 2004/083247. Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que el anticuerpo humanizado BT061 no modula substancialmente  
15 niveles 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 provoca un agotamiento a largo plazo substancial de linfocitos CD4+.

20 La concentración del agente no se limita especialmente, siempre que esté presente en una concentración que es baja en comparación con concentraciones conocidas. Sin embargo, de preferencia, la concentración del agente es desde 0.1 µg/ml a 30 mg/ml, o  
25 0.1 a 1000 µg/ml, y más preferible desde 1 - 500 µg/ml y 2-250 µg/ml. Más preferible, la concentración del agente (es aproximadamente) cualquiera de 15 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1 mg/ml, 12.5 mg/ml, o 25 mg/ml.

30 El volumen de dosis aplicado a un sujeto que utiliza la composición no se limita especialmente siempre

que suministre una dosis total baja en comparación con dosis ya conocidas y por lo tanto es adecuado para tratar a todos los pacientes debido a un nivel menor de efectos secundarios en especial en el tratamiento de individuos que no toleran dosis como se describe en WO 2004/083247. 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 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

lista para administración que no requiere dilución, de manera tal que puedan administrarse fácilmente por personal no médico.

5 Como se ha mencionado previamente, no se conocía que los agentes capaces de tratar enfermedad autoinmune pudieran administrarse en las bajas dosis que se conciben 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  
10 darse cuenta que pueden ya ser efectivas en dosis mucho menores ha abierto el camino para un tratamiento más efectivo de algunas enfermedades autoinmunes y clases de pacientes.

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

La Figura 1 muestra la dependencia de dosis de enlace de BT061 a linfocitos periféricos humanos. El enlace de BT061 en una serie de dilución se detecta con un  
20 anticuerpo anti-humano etiquetado con fluoróculo. La intensidad de fluorescencia promedio se determina por análisis citométrico de flujo.

La Figura 2 muestra el esquema de purificación de células T regulatorias CD4+CD25+ y células efectoras  
25 CD4+CD25+ por etapas combinadas de selección positiva negativa;

La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la región V<sub>H</sub> B-F5 de ratón (SEQ ID NO: 5);

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos  
30 que codifica la región V<sub>K</sub> 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<sub>H</sub> 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

5 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<sub>K</sub> de BF-5 humanizado. La secuencia que codifica la región V está sub-rayada y la secuencia de

10 polipéptidos correspondiente (SEQ ID NO: 2) se indica abajo de la secuencia de nucleótidos;

La Figura 7 muestra datos de células CD25+Tregs (donador-A) y CD8+ (donador-B) cultivadas en la presencia de PBMC irradiadas (donador-A) en la presencia/ausencia de

15 diferentes anti-CD4 mAb. La proliferación de células T CD8+ alloreactivas se determinó después de 4 días de cultivo al agregar 37 kBq/pozo de 3H-Tdr. Se muestran valores promedio de cpm (triplicados).

La Figura 8 partes A - H proporcionan gráficas

20 que muestran datos de las pruebas clínicas con pacientes de soriasis del grupo de dosis I como se describe en el ejemplo 3, en donde se tratan pacientes con una inyección intravenosa de 0.5 mg de BT061 o un placebo. Las partes A a H de la Figura 8 proporcionan gráficas de las

25 calificaciones PASI de los pacientes 1 a 8 del grupo de dosis I, respectivamente.

La Figura 9 partes A a H proporcionan gráficas que muestran datos de los pros clínicas con pacientes de soriasis del grupo II como se escribe el ejemplo 3, en

30 donde los pacientes se tratan con un 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.

Las Figuras 10A y 10B respectivamente muestran la liberación de  $\text{TFN}\alpha$  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.

La Figura 11 muestra niveles de IL-2 y IFN- $\gamma$  en plasma después de administración de una sola dosis intravenosa o subcutánea de BT061 en voluntarios sanos. ULN = límite superior de normal. (Calculados con base en niveles de citoquina medidos en 39 sujetos sanos; ULN = valor promedio + 2 x desviación estándar).

La Figura 12 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 13 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.

5 Líneas punteadas indican el límite superior de normal (ULN) y el límite inferior de normal (LLN) ambas calculadas con base en los recuentos de células CD4 medidos en 15 sujetos sanos como el valor de pre-dosis promedio más (o menos) 2x desviación estándar.

10 Figura 14 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 3. Las fotografías son del mismo paciente que era un miembro del grupo de dosis II. La fotografía mostrada en  
15 la parte A fue tomada antes del tratamiento. La fotografía mostrada en la parte B se tomo 28 días después de tratamiento.

La Figura 15 proporciona resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide como se  
20 describe en el Ejemplo 5. 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  
25 mientras que dos pacientes recibieron un placebo.

Las Figuras 16A y 16B proporcionan resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 16A muestra una gráfica de barras del número de articulaciones sensibles  
30 para pacientes del grupo de dosis que recibe 25 mg de BT061 subcutáneos. La Figura 16B 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.

5 Las Figuras 17A y 17B proporciona resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 16A muestra los cambios de parámetros individuales (en %) para un paciente respondedor (Figura 17A) y un paciente no respondedor  
10 (Figura 17B) del grupo de dosis subcutáneas de 25 mg. 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.

15 Las Figuras 18A y 18B proporciona resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 5. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes del grupo de dosis subcutáneas de 1.25 mg (Figura 18A) del grupo de  
20 dosis subcutáneas de 6.25 mg (Figura 18B).

Las Figuras 19A y 19B proporcionan adicionales resultados de la prueba clínica con pacientes de artritis reumatoide, como se describe en el Ejemplo 5. Las Figuras muestran el número de articulaciones sensibles en pacientes  
25 del grupo de dosis subcutáneas de 50 mg (Figura 19A) y del grupo de dosis intravenosas de 6.25 mg (Figura 19B).

La Figura 20 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  
30 humanizada del B-F5 (es decir BT061).

La Figura 21 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 de 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 los niveles vistos después de administración de 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/ $\mu$ l (o al menos 250 células/ $\mu$ 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 provoca agotamiento de células CD4+ substancial y de larga duración o induce liberación de citoquina substancial en comparación con 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 o más dominios variables que  
15 son capaces de ligar a CD4. El anticuerpo puede comprender una región constante humana (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  
20 IgG4. Regiones constantes preferidas se eligen entre dominios constantes de IgG, en 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)'<sub>2</sub>,  
25 Fv y scFv.

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  
30 este anticuerpo es el anticuerpo BT061.

El BT061, sus fragmentos y derivados.

140

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:

5           - EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMWLRQA PGKGL  
EWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCSAS  
YYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

- dominio V cadena L:

          - DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ  
10 KPGQPPKLLIYLAILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWT  
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  
15 secuencias de polipéptidos que tienen al menos 80%, de 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  
20 complementariedad (CDRs) del B-F5 mAb de ratón, y recibe la 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 20 y 21. Estos anticuerpos opcionalmente pueden tener variaciones en la  
25 secuencia de las CDRs que no afectan substancialmente la 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  
30 puede seleccionarse entre los dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG,

141

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  
5 fragmento del anticuerpo hB-F5 o su derivado que comprende sus regiones 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  
10 fusionarse con un polinucleótido que codifica la región constante de una cadena H o L humana, con el propósito de expresar las cadenas H y L completas obtenidas de esta manera; una secuencia que codifica un péptido de señal que permite la secreción de la proteína, también puede  
15 agregarse.

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  
20 en una célula hospedera selecta, y vectores recombinantes 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  
25 técnica bien conocida de ADN recombinante e ingeniería genética.

La invención también utiliza una célula hospedera, transformada por un polinucleótido de la invención. Células hospederas útiles dentro del marco de la  
30 presente invención pueden ser células procarióticas o 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.

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

10           El anticuerpo BT061 (hB-F5) empleado en la invención, puede obtenerse al cultivar una célula hospedera 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.

15           *Construcción de B-F5 humanizado*

*Diseño de regiones V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> B-F5 humanizadas*

          Secuencias de ADN que codifican las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> 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<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> humanas en las cuales las CDRs de ratón se injertan, se seleccionaron al buscar bases de datos para V<sub>H</sub> humana más semejante a V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> B-F5 de ratón original. La región V<sub>H</sub> de un anticuerpo humano (M26; Número de Acceso A36006) tuvo la más alta homología con V<sub>H</sub> de B-F5. La región V<sub>K</sub> de otro anticuerpo humano (FK-001; NAKATANI et al., *Biotechnology*, 7 (1989), 805-810)) tuvo la más alta homología con V<sub>K</sub> de B-F5.

          Dos tipos de V<sub>K</sub> difieren entre ellas en que el 4° residuo fue Leucina o Metionina se construyeron y diseñaron como L4L y L4M. Dos tipos de V<sub>H</sub> que difieren entre ellas en 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 20. El alineamiento de las secuencias de polipéptidos de B-F5, M26, H37L, y H37V se muestra en la Figura 21. 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.

#### *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.

Brevemente, plásmidos de expresión para la cadena H (región humanizada  $V_H$  fusionada a la región constante de una cadena humana  $\gamma$ -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-1581) utilizando Lipofectin<sup>ni</sup>. 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.

5 *Caracterización de las diferentes versiones de B-F5 humanizado.*

*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  
10 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  
15 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:

20 Tabla A

145

5

10

15

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

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 <sup>37</sup>Leu a <sup>37</sup>Val. 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 <sup>37</sup>Leu y <sup>37</sup>Val de V<sub>H</sub> 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.

5 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,  
10 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  
15 donador. También murinos y hB-F5s fueron capaces de inhibir proliferación de PBMC específica de Ag inducida por PPD.

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  
20 efectivo que el tipo IgG2 del cual la actividad inhibitoria fue casi la misma que mB-F5. Para el tipo IgG1, H37L/L4M 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  
25 proliferación PBMC inducida por PPD fueron como sigue:  
H37L/L4M IgG1 > H37L/L4L IgG1 > H37L/L4M IgG2 = H37L/L4L IgG2 = mB-F5.

Considerando la eficacia de la actividad biológica *in vitro* y el número menor de aminoácidos de  
30 ratón, H37L/L4M IgG1 se eligió para mayor evaluación y es este anticuerpo que se nombra BT061 y se emplea para

demostrar la presente invención en los ejemplos que se proporcionan en esta aplicación.

#### Composiciones y usos

Como se ha mencionado, la composición  
5 farmacéutica y medicamentos empleados en la presente invención de preferencia son capaces de tratar una enfermedad autoinmune en pacientes que se benefician de dosis inferiores. Estos pacientes incluyen a todos los pacientes debido a un nivel menor de efectos secundarios  
10 pero especialmente a individuos que no toleran dosis como se describe en WO 2004/08324.

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  
15 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 comprende el anticuerpo en una concentración desde 10 µg/ml a 150 mg/ml, de preferencia desde 0.5 mg/ml a 75 mg/ml.

20 La invención además 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  
25 donde el medicamento se administra a un sujeto en una sola dosis o una pluralidad de dosis en una cantidad del anticuerpo desde 0.2 a 30 mg por dosis.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad  
30 autoinmune que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar las células T regulatorias

CD4+CD25+, en donde la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.2 mg a 30 mg, 0.2 mg a 20 mg, 0.3 mg a 7.5 mg, 0.3 mg a 5 mg por dosis o de preferencia 0.3 a 1 mg por dosis. Más preferiblemente, el intervalo de mg por dosis se extiende entre 0.3 mg a 0.9 mg o 0.3 a 0.99 mg.

En un aspecto de la invención, el sujeto va a recibir una pluralidad de dosis. En estas situaciones, es conveniente que la dosis sobre un período de 10 días está entre 0.2 a a menos que 25 mg, más preferiblemente entre 0.2 y 20 mg, y más preferible entre 0.2 a menos que 10 mg. Además, la dosis sobre un periodo de 5 días prestar entre 0.2 a menos que 15 mg preferiblemente entre 0.2 mg y 12 mg y más preferiblemente entre 0.2 mg a menos que 5 mg.

En este aspecto de la invención, se prefiere que, cuando la dosis se va a administrar intensamente, la dosis sobre un período de 10 días está entre 0.2 a menos que 10 mg, más preferible entre 0.2 y 7.5 mg. En forma alterna, cuando las dosis se va a administrar en forma subcutánea o intramuscular, se refiere que las dosis sobre un período de 10 días estén entre 1 mg a 30 mg, más preferible entre 5 mg y 30 mg.

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:  $BSA (m^2) = 0.20247 \times$   
 Altura (m)<sup>0.725</sup> x Peso (kg)<sup>0.425</sup>

(DuBois D; DuBois EF: A formula to estimate the  
 approximate surface area if height and weight be known.

5 Arch Int Med 1916 17:863-71.

Fórmula de Haycock:  $BSA (m^2) = 0.024265 \times$  Altura (cm)<sup>0.3964</sup> x  
 Peso (kg)<sup>0.5378</sup>

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

Fórmula de Gehan y George:  $BSA (m^2) = 0.0235 \times$   
 Altura (cm)<sup>0.42246</sup> x Peso (kg)<sup>0.51456</sup>

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

Fórmula de Boyd:  $BSA (m^2) = 0.0003207 \times$   
 Altura (cm)<sup>0.3</sup> x Peso (gramos)<sup>(0.7285 - (0.0188 x LOG(gramos))</sup>

De acuerdo con la invención, la dosis del agente  
 20 al sujeto es desde 0.10 a 20 mg/m<sup>2</sup> de área superficial  
 corporal del paciente, de preferencia de 0.12 a 15 mg/m<sup>2</sup>, y  
 más preferiblemente 0.20 a 10 mg/m<sup>2</sup> y más preferiblemente  
 0.30 a 0.50 mg/m<sup>2</sup>.

Además, la dosis puede calcularse con base en el  
 25 peso corporal del sujeto. De acuerdo con la invención, la  
 dosis del agente al sujeto es desde 1 a 500 µg/kg, de  
 preferencia 2 a 400 µg/kg, más preferiblemente 2 a 250  
 µg/kg y más preferiblemente 2.5 a 20 µg/kg.

En estos aspectos de la invención, cuando la  
 30 dosis se basa en el área superficial del cuerpo o el peso  
 corporal del sujeto, se prefiere que cuando la dosis se va

a administrar intravenosamente, las dosis sobre un período de 10 días estén entre 0.20 a 10 mg/m<sup>2</sup>, más preferible entre 0.2 a 4 mg/m<sup>2</sup>, o entre 2 a 250 µg/kg, más preferible entre 2 a 100 µg/kg. En forma alterna, cuando las dosis se  
5 van a administrar subcutánea o intramuscularmente, se prefiere que las dosis sobre un período de 10 días estén entre 0.30 a 20 mg/m<sup>2</sup>, más preferible entre 0.5 a 20 mg/m<sup>2</sup>, o entre 2.5 a 500 µg/kg, más preferible entre 20 a 500 µg/kg.

10 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 las siguientes bases: diaria, cada día salteado, semanal, cada  
15 4 semanas, cada 6 semanas, cada 12 semanas, cada 24 semanas, cada mes 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, o al menos un mes, o al menos 3 meses, por al menos  
20 6 meses o por al menos un año (lo que significa que las dosis se toman cada día o cada semana, o cada mes, o 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.

25 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 manejable para el paciente. En general, la dosis se  
30 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 para administración simultánea, secuencial o separada a un sujeto.

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

También se proporciona un método para tratamiento  
10 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 regulatorias CD4+CD25+ y en donde el medicamento se administra al sujeto en una cantidad como se describió  
15 anteriormente.

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

En general, la composición farmacéutica y los  
20 medicamentos empleados de acuerdo con la presente invención, son para tratar una enfermedad autoinmune. De preferencia, la enfermedad autoinmune se elige de psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedades inflamatorias intestinales,  
25 enfermedad de Crohn, 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-contrainjerto, o en  
30 general aspectos de tolerancia de órganos.

En un aspecto preferido de la invención, la

enfermedad autoinmune es psoriasis.

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 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 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

| Grado de severidad<br>(por región del<br>cuerpo) | Valor<br>dado |  | Superficie<br>involucrada<br>(por región<br>del cuerpo) | Valor<br>dado |
|--------------------------------------------------|---------------|--|---------------------------------------------------------|---------------|
| Sin síntomas                                     | 0             |  | < 10%                                                   | 1             |
| Ligero                                           | 1             |  | 10-29%                                                  | 2             |
| Moderado                                         | 2             |  | 30-49%                                                  | 3             |
| Marcado                                          | 3             |  | 50-69%                                                  | 4             |
| Muy marcado                                      | 4             |  | 70-89%                                                  | 5             |
|                                                  |               |  | 90-100%                                                 | 6             |

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

$$PASI = 0.1 (E_h + I_h + D_h) A_h + 0.2 (E_u + I_u + D_u) A_u +$$

$$0.3(E_t + I_t + D_t)A_t + 0.4(E_l + I_l + D_l)A_l$$

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 una modalidad adicional de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica se va a administrar en forma intravenosa, subcutánea o intramuscular en las dosis aquí especificadas. En particular, cuando la dosis se va a administrar en forma intravenosa, se prefiere que la dosis esté entre 0.2 mg a 7.5 mg, más preferible entre 0.3 a 5 mg. Cuando el paciente va a recibir una pluralidad de dosis, la dosis sobre un período de 10 días de preferencia está entre 0.2 a menos de 10 mg. En forma alterna, cuando la dosis se va administrar en forma subcutánea o intramuscular, se prefiere que la dosis esté entre 0.2 mg a 30 mg, más preferible entre 5 mg a 30 mg. Cuando el paciente va a recibir una pluralidad de dosis, las dosis sobre un período de 10 días de preferencia están entre 0.2 a menos de 25 mg.

En un aspecto adicional de la presente invención,

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 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) (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 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 intravenosa, subcutánea o intramuscular en las 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 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, penicilinamina, ciclofosfamida, sales de oro, azotipoprina, leflunomida, etc.

5 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  
10 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  
15 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  
20 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

25 EJEMPLO 1 - Enlace de BT061 con linfocitos periféricos humanos primarios (resultados se muestran en la Figura 1).

#### Método

PBMCs humanas se aislaron por centrifugación con  
30 gradiente de densidad y tiñeron con anticuerpo anti-CD3 etiquetado con FITC (345763; Becton/Dickinson) y diluciones

en serie de BT061. El enlace de BT061 fue detectado con un anticuerpo IgG humano etiquetado con ficoeritrina (109 116 098; Jackson, Immunoresearch). Por análisis citométrico de flujo se determinó la intensidad de fluorescencia promedio  
5 de linfocitos que enlazan CD3+ BT061.

Los resultados se establecen en la Figura 1.

#### *Resultados*

BT061 liga a linfocitos humanos a bajas concentraciones. Por debajo de 10 ng/ml la saturación  
10 máxima media de enlace se observa. Se encuentra saturación a 100 ng/ml. Las concentraciones son como se esperaba para pacientes que recibieron dosis de 30 y 300 µg.

EJEMPLO 2 - Inhibición de proliferación de células T CD8+ por células T reg estimuladas por BT061  
15 (resultados se muestran en la figura 7)

#### *Método*

##### *Aislamiento de poblaciones de células T humanas*

Tregs CD25<sup>high</sup> se separaron de capas leucocitarias y/o leucaféresis de voluntarios sanos mediante separación  
20 celular de perlas magnéticas de acuerdo con el siguiente protocolo.

Células T regulatorias CD4+CD25+ se aislaron de capas leucocitarias de voluntarios sanos por 2 etapas. En la primera etapa, células T CD4+ utilizando 2-4µl de CD4-  
25 MACS-Multisort-Beads (Miltenyi Biotec) por 10<sup>7</sup> PBMCs se seleccionaron positivamente. Después de 15 minutos de incubación, se realizó selección magnética. En la siguiente etapa células aisladas en forma positiva se agotaron de células no-CD4 que expresan CD25- con CD8-, CD19- y CD14-  
30 Dynabeads (Dynal, Oslo, Noruega). Las células T CD4+CD25+ resultantes fueron 95-98% puras. Células T CD4+CD25+

intactas se aislaron por selección negativa de PBMC por agotamiento de células que expresan CD8, CD19, CD56, CD14, CD235a, CD25 y CD45RO con Dynabeads. El esquema de purificación se muestra en la Figura 2.

## 5 Ensayo de Co-cultivo

Para evaluar la influencia de anti-CD4 mAb en la función de Tregs CD25+ humanas, Tregs CD25+ humanas recientemente aisladas fueron co-cultivadas con células T PBMC agotadas de (CD3)-singénicas (CD3 Dynabeads, Dynal) y células T CD8+ alogénicas en la presencia de diferentes anti-CD4 mAb. Brevemente,  $1 \times 10^5$  Tregs CD25+ recientemente aisladas se incubaron con  $3 \times 10^5$  PBMC singénicas irradiadas (50 Gy) en la presencia de cantidades variantes de anti-CD4 mAb. Ya sea indirectamente o 24 hrs después  $1 \times 10^5$  células T CD8+ alogénicas se agregaron a los cultivos y se determinó la proliferación 72 h después. Diferentes anti-CD4 mAbs a concentraciones desde 0.01  $\mu\text{g/ml}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$  se probaron en este ensayo. Células T CD8+ se aislaron utilizando CD8-Microbeads

20 Los resultados se muestran en la Figura 7

### Resultados

BT061 induce en forma reproducir la actividad supresora en Tregs en una forma dependiente de dosis, resultando en inhibición de la proliferación de células T CD8+ aloreactivas. BT061 estimula Tregs CD4+CD25+ que directamente inhibe células T CD8+.

En particular, los resultados confirman que hay inhibición de la proliferación de células T CD8+ a concentraciones tan bajas como 10 ng/ml correspondientes a aplicación de baja dosis en pacientes de 30  $\mu\text{g}$ .

EJEMPLO 3 - Prueba clínica de BT061 en pacientes

con soriasis crónica moderada a severa (resultados se muestran en las Figuras 8A a 8H, Figuras 9A a 9H y en las Figuras 14A y 14B)

La capacidad de hB-F5 BT061 para tratar una enfermedad autoinmune se prueba en 56 pacientes que sufren de soriasis moderada a severa crónica. La prueba comprende un solo estudio a escala de dosis 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 de dosis (grupos de dosis I a V) van a recibir el anticuerpo 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 recibieron placebo, 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 reciben 0.5 mg de BT061 intravenoso. En los grupos de dosis II a V, los seis pacientes reciben 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, o 20 mg de BT061, respectivamente. En los grupos de dosis VI y VII en donde la administración es subcutánea, los seis pacientes reciben 12.5 mg o 25 mg de BT061, respectivamente.

Para administración intravenosa, el anticuerpo/placebo se somete como infusión en la vena de antebrazo de acuerdo con procedimientos médicamente aceptados. En el presente caso, el volumen total se administra como una sola infusión intravenosa continua por un período de 2 horas mediante un perfusor (Fresenius Pilot C, Fresenius AG, Alemania). Cada dosis del anticuerpo se

diluye con una inyección de cloruro de sodio 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 sola inyección subcutánea. El mismo procedimiento aplica para el placebo.

El nivel de soriasis exhibido por cada pacientes se registra utilizando la calificación de área de soriasis e índice de severidad (PASI = Psoriasis Area and Severity Index). Como se describe anteriormente, superiores calificaciones PASI corresponden a niveles superiores de soriasis. Los pacientes que participan en la prueba tienen soriasis moderada a crónica severa, i.e. una calificación PASI de 10 o más.

La calificación PASI de los pacientes se estima antes de la prueba para proporcionar un valor de "línea base" o "de referencia" al 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 sola aplicación intravenosa de 0.5 mg de BT061, mientras que dos pacientes del grupo de dosis I recibieron el placebo. Las dosis por peso y la dosis por área superficial del cuerpo (BSA = Body Surface Area) para cada pacientes se ilustran en la Tabla C. Se calculó el área superficial del cuerpo de acuerdo con la fórmula Mosteller aquí descrita.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis I, se ilustran en la Tabla C junto con la mejora porcentual 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 = Body Surface Area) para cada paciente se  
5 ilustran en la Tabla D1.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis II, se ilustran en la tabla D1 junto con la mejora porcentual en la calificación PASI de línea base.

#### *Grupo de Dosis III*

10 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 = Body Surface Area) para cada pacientes  
15 ilustran en la Tabla D2.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis III, se ilustran en la tabla D2 junto con la mejora porcentual en la calificación PASI de línea base.

#### *Grupo de Dosis IV*

20 Seis pacientes del grupo de dosis IV recibieron una sola aplicación intravenosa de 10.0 mg de BT061 mientras que dos pacientes del grupo de dosis IV recibieron el placebo. La dosis por peso y la dosis por área superficial del cuerpo (BSA = Body Surface Area) para cada  
25 paciente se ilustran en la Tabla D3.

Las calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis IV, se ilustran en la tabla D3 junto con la mejora porcentual en la calificación PASI de línea base.

30 TABLA C - Calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis I (0.5 mg de dosis intravenosa) durante el curso de la prueba

181

5

| Paciente                           | 1                                                           | 2             | 3             | 4             |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg] /<br>[mg/m²] | 5.2 /<br>0.23                                               | 5.9 /<br>0.25 | 4.6 /<br>0.22 | 5.3 /<br>0.24 |
|                                    |                                                             |               |               |               |
|                                    | Calificación PASI (cambio relativo/<br>mejora a línea base) |               |               |               |
| Línea base                         | 12.2                                                        | 13.5          | 12.1          | 14.0          |

10

15

20

25

|        |              |               |           |               |
|--------|--------------|---------------|-----------|---------------|
| Día 5  | 12.0<br>(2%) | 12.1<br>(10%) | 9.1 (25%) | 12.2<br>(13%) |
| Día 7  | 12.0<br>(0%) | 10.7<br>(21%) | 7.7 (36%) | 11.6<br>(17%) |
| Día 14 | 11.8<br>(3%) | 9.5<br>(30%)  | 5.7 (53%) | 9.6<br>(31%)  |
| Día 21 | 11.6<br>(5%) | 10.0<br>(26%) | 5.1 (58%) | 7.2<br>(49%)  |
| Día 28 | -            | 10.4<br>(23%) | 4.8 (60%) | 8.4<br>(40%)  |
| Día 42 | 11.4<br>(7%) | 11.2<br>(17%) | 5.1 (58%) | 8.4<br>(40%)  |
| Día 56 | 11.4<br>(7%) | 10.1<br>(25%) | 4.2 (65%) | 9.2<br>(34%)  |
| Día 75 | 11.6<br>(5%) | 7.7<br>(43%)  | 5.1 (58%) | 9.8<br>(30%)  |

TABLA C (Cont.)

162

5

| Paciente                           | 5             | 6             | 7             | 8             |
|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg] /<br>[mg/m²] | 4.8 /<br>0.22 | 8.5 /<br>0.31 | 4.7 /<br>0.21 | 7.0 /<br>0.28 |
|                                    |               |               |               |               |

10

15

20

25

|            | Calificación PASI (cambio<br>relativo/ mejora a línea base) |               |              |               |
|------------|-------------------------------------------------------------|---------------|--------------|---------------|
| Línea base | 12.1                                                        | 12.6          | 12.1         | 15.2          |
| Día 5      | 10.9<br>(10%)                                               | 11.8<br>(6%)  | 9.4<br>(22%) | 10.2<br>(33%) |
| Día 7      | 11.2<br>(7%)                                                | 10.7<br>(15%) | 9.3<br>(23%) | 9.0<br>(41%)  |
| Día 14     | 8.7<br>(28%)                                                | 10.4<br>(17%) | 7.8<br>(36%) | 7.2<br>(53%)  |
| Día 21     | 8.0<br>(34%)                                                | 8.0<br>(37%)  | 6.0<br>(50%) | 6.5<br>(57%)  |
| Día 28     | 8.2<br>(32%)                                                | 6.5<br>(48%)  | 6.4<br>(47%) | 6.4<br>(58%)  |
| Día 42     | 7.9<br>(35%)                                                | 6.1<br>(52%)  | 5.5<br>(55%) | 5.5<br>(55%)  |
| Día 56     | 7.9<br>(35%)                                                | 5.7<br>(55%)  | 5.3<br>(56%) | 5.3<br>(56%)  |
| Día 75     | 9.6<br>(21%)                                                | 5.1<br>(60%)  | 5.4<br>(55%) | 7.8<br>(49%)  |

TABLA D1 - Calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis II (2.5 mg de dosis intravenosa) durante el curso de la prueba

5

10

15

20

25

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

TABLA D1 (Cont.)

5

10

15

20

25

| Paciente                           | 5                                                           | 6              | 7              | 8              |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg] /<br>[mg/m²] | 28.4 /<br>1.19                                              | 39.4 /<br>1.49 | 26.5 /<br>1.17 | 28.4 /<br>1.19 |
|                                    |                                                             |                |                |                |
|                                    | Calificación PASI (cambio<br>relativo/ mejora a línea base) |                |                |                |
| Línea base                         | 15.0                                                        | 12.6           | 13.9           | 13.5           |
| Día 5                              | 12.1<br>(19%)                                               | 12.6<br>(0%)   | 19.5<br>(+40%) | 15.6<br>(+16%) |
| Día 7                              | 14.0<br>(7%)                                                | 13.0<br>(+3%)  | 17.0<br>(+22%) | 14.8<br>(+10%) |
| Día 14                             | 11.8<br>(21%)                                               | 16.6<br>(+32%) | 11.4<br>(18%)  | 8.0<br>(41%)   |
| Día 21                             | 12.4<br>(17%)                                               | 11.4<br>(10%)  | 7.9<br>(43%)   | 7.1<br>(47%)   |
| Día 28                             | 12.2<br>(19%)                                               | 12.8<br>(+2%)  | 8.2<br>(41%)   | 6.5<br>(52%)   |
| Día 42                             | 12.2<br>(19%)                                               | 11.0<br>(13%)  | 7.8<br>(44%)   | 9.0<br>(33%)   |
| Día 56                             | 14.2<br>(5%)                                                | 9.7<br>(23%)   | 8.2<br>(41%)   | 7.8<br>(42%)   |
| Día 75                             | 14.7<br>(2%)                                                | 10.4<br>(17%)  | 10.2<br>(27%)  | 8.1<br>(40%)   |

TABLA D2 - Calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis III (5.0 mg de dosis intravenosa) durante el curso de la prueba

165

5

10

15

20

25

| Paciente                          | 1                                                           | 2               | 3             | 4             |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|---------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg]/<br>[mg/m²] | 70.4 /<br>2.73                                              | 57.5 /<br>2.40  | 43.9 /        | 59.5 /        |
|                                   |                                                             |                 |               |               |
|                                   | Calificación PASI (cambio<br>relativo/ mejora a línea base) |                 |               |               |
| Línea base                        | 15.8                                                        | 14.1            | 17.4          | 12.4          |
| Día 5                             | 13.0<br>(18%)                                               | 27.2<br>(+93%)  | 17.7<br>(+2%) | 12.0<br>(3%)  |
| Día 7                             | 14.3<br>(9%)                                                | 18.9<br>(+34%)  | 15.6<br>(10%) | 11.1<br>(10%) |
| Día 14                            | 13.5<br>(15%)                                               | 30.3<br>(+115%) | 14.0<br>(20%) | 9.3<br>(25%)  |
| Día 21                            | 10.1<br>(36%)                                               | 23.1<br>(+64%)  | 14.4<br>(17%) | 9.2<br>(26%)  |
| Día 28                            | 9.6<br>(39%)                                                | 23.1<br>(+64%)  | 13.4<br>(23%) | 10.2<br>(18%) |
| Día 42                            | 9.2<br>(42%)                                                | 20.1<br>(+43%)  | 14.4<br>(17%) | 10.2<br>(18%) |
| Día 56                            | 10.0<br>(37%)                                               | 20.1<br>(+43%)  | 15.8<br>(9%)  | -             |
| Día 75                            | 12.8<br>(19%)                                               | 22.5<br>(+60%)  | 16.0<br>(8%)  | 9.0<br>(27%)  |

TABLA D2 (Cont.)

166

5

10

15

20

25

| Paciente                           | 5                                                           | 6             | 7             | 8            |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg] /<br>[mg/m²] | 52.4 /                                                      | 56.8 /        | 71.4 /        | 66.2 /       |
|                                    |                                                             |               |               |              |
|                                    | Calificación PASI (cambio<br>relativo/ mejora a línea base) |               |               |              |
| Línea base                         | 17.3                                                        | 12.4          | 13.5          | 10.4         |
| Día 5                              | 16.8<br>(3%)                                                | 10.6<br>(15%) | -             | -            |
| Día 7                              | 17.6<br>(+2%)                                               | 11.4<br>(8%)  | 11.0<br>(19%) | 8.2<br>(21%) |
| Día 14                             | 14.4<br>(17%)                                               | 13.0<br>(+5%) | 9.4<br>(30%)  | 7.6<br>(27%) |
| Día 21                             | 14.7<br>(15%)                                               | 11.6<br>(6%)  | 9.4<br>(30%)  | -            |
| Día 28                             | 13.8<br>(20%)                                               | 11.2<br>(10%) | 8.3<br>(39%)  | 8.6<br>(17%) |

|        |               |               |              |          |
|--------|---------------|---------------|--------------|----------|
| Día 42 | 13.2<br>(24%) | 12.6<br>(+2%) | 8.3<br>(39%) | -        |
| Día 56 | 13.2<br>(24%) | 10.6<br>(15%) | 9.6<br>(20%) | -        |
| Día 75 | 13.2<br>(24%) | 13.2<br>(+6%) | 13.4<br>(1%) | 9.6 (8%) |

TABLA D3 - Calificaciones PASI para los pacientes en el grupo de dosis IV (10.0 mg de dosis intravenosa) durante el curso de la prueba

5

10

15

20

25

| Paciente                           | 1                                                           | 2            | 3             | 4             |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg] /<br>[mg/m²] | 173.0<br>/                                                  | 142.9 /      | 102.8<br>/    | 115.6 /       |
|                                    |                                                             |              |               |               |
|                                    | Calificación PASI (cambio<br>relativo/ mejora a línea base) |              |               |               |
| Línea base                         | 14.6                                                        | 11.0         | 21.6          | 22.0          |
| Día 5                              | 12.8<br>(12%)                                               | 11.0<br>(0%) | 21.6<br>(0%)  | 16.8<br>(24%) |
| Día 7                              | 12.8<br>(12%)                                               | 11.0<br>(0%) | 21.6<br>(0%)  | 16.8<br>(24%) |
| Día 14                             | 11.4<br>(22%)                                               | 11.0<br>(0%) | 21.6<br>(0%)  | 18.1<br>(18%) |
| Día 21                             | 11.4<br>(22%)                                               | 11.0<br>(0%) | 22.5<br>(+4%) | 19.0<br>(14%) |
| Día 28                             | 11.4<br>(22%)                                               | 8.9<br>(19%) | 22.0<br>(7%)  | 17.7<br>(20%) |
| Día 42                             | 11.0<br>(25%)                                               | 9.4<br>(15%) | 22.6<br>(+5%) | 18.8<br>(15%) |
| Día 56                             | 11.4<br>(22%)                                               | 9.8<br>(11%) |               |               |
| Día 75                             |                                                             |              |               |               |

TABLA D3 (Cont.)

(68

5

| Paciente                          | 5                                                              | 6            | 7             | 8            |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| Dosis Rel.<br>[µg/kg]/<br>[mg/m²] | 119.6/                                                         | 108.8/       | 75.9/         | 106.6/       |
|                                   |                                                                |              |               |              |
|                                   | Calificación PASI (cambio<br>relativo/ mejora a línea<br>base) |              |               |              |
| Línea base                        | 19.0                                                           | 11.6         | 14.0          | 12.4         |
| Día 5                             | 18.8<br>(1%)                                                   | 11.2<br>(3%) | 14.2<br>(+1%) | 11.4<br>(8%) |
| Día 7                             | 18.2<br>(4%)                                                   | 11.2<br>(3%) | 14.2<br>(+1%) | 8.4<br>(32%) |

10

15

|        |               |  |  |  |
|--------|---------------|--|--|--|
| Día 14 | 16.7<br>(12%) |  |  |  |
| Día 21 | 17.3<br>(9%)  |  |  |  |
| Día 28 |               |  |  |  |
| Día 42 |               |  |  |  |
| Día 56 |               |  |  |  |
| Día 75 |               |  |  |  |

20

Además, las calificaciones PASI contra el tiempo para pacientes individuales, se ilustran en forma de gráfica en las Figuras 8A a 8H y en las Figuras 9A a 9H. Las gráficas mostradas en las Figuras 8A a 8H representan calificaciones PASI para pacientes del grupo de dosis I, mientras que las gráficas mostradas en las Figuras 9A a 9H representan calificaciones PASI para pacientes del grupo de dosis II.

25

30

Como puede verse de los resultados mostrados en las Tablas C y D, 75% de todos los pacientes del grupo de dosis I y grupo de dosis II muestran una clara mejora en sus calificaciones PASI, i.e. al menos una mejora del 40% 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 en el grupo de dosis II recibieron un placebo.

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

Los pacientes en el grupo de dosis III, también muestran una mejora en su calificación PASI, con seis de ocho pacientes que muestran una mejora mayor a 20% y dos de esos seis que muestran una mejora mayor a 30% después de tratamiento. Sin embargo, la mejora no fue tan significativa como la vista en pacientes del grupo de dosis I y del grupo de dosis II que recibe una dosis menor 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 muestra en la Tabla D3) muestra una mejora clara en sus calificaciones PASI, aunque esto es 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% mejora en calificación PASI, se muestra en

CAO

la Tabla E.

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

|    |              |                                         |                                          |                                           |
|----|--------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 5  |              | Grupo de<br>Dosis I*<br>0.5 mg<br>BT061 | Grupo de<br>Dosis II*<br>2.5 mg<br>BT061 | Grupo de<br>Dosis III*<br>5.0 mg<br>BT061 |
| 10 | Mejora ≥ 40% | 6/8<br>pacientes                        | 6/8<br>pacientes                         | 1/8<br>pacientes                          |
|    | Mejora ≥ 50% | 4/8<br>pacientes                        | 5/8<br>pacientes                         | 0/8<br>pacientes                          |
|    | Mejora ≥ 60% | 1/8<br>pacientes                        | 2/8<br>pacientes                         | 0/8<br>pacientes                          |
| 15 | Mejora ≥ 75% | 0/8<br>pacientes                        | 1/8<br>pacientes                         | 0/8<br>pacientes                          |

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

20 Las Figuras 14 A y 14 B proporcionan evidencia fotográfica de la mejora en el nivel de psoriasis antes y después de tratamiento. La Figura 14 A muestra un área de psoriasis en la piel de un paciente en el grupo de dosis II antes de administración. La Figura 14 B muestra la misma  
25 área de psoriasis 28 días después de administración. Las áreas de mejora están marcadas en la Figura 14 B con recuadros negros.

De estos resultados puede verse claramente que BT061 proporciona tratamiento efectivo de psoriasis  
30 moderada y severa crónica incluso con una dosis tan baja como 0.5 mg. Además, la dosis sencilla proporciona un

(7)

efecto terapéutico que todavía puede verse de seis a ocho semana después.

EJEMPLO 4 - Seguridad y tolerabilidad de dosis en escala de BT061 (se muestran resultados en las Figuras 10 a 5 13)

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  $\geq 18$  a  $\leq 75$  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 F a continuación:

TABLA F - Dosis intravenosa de BT061

172

5

10

15

| 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 continua sencilla durante 2 horas.

20

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

TABLA G - Dosis subcutánea de BT061

5

10

| Administración de BT061        |                                 |                               |                               |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Dosis<br>total de<br>BT061 mab | Volumen de<br>BT061-<br>12.5 mg | Volumen de<br>BT061-<br>25 mg | Volumen de<br>BT061-<br>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<br>ml              |

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

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

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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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+.

Resultados

174

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

#### Niveles de citoquina

5 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  
10 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  
15 antihistamina hidrocloreuro 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  
20 el uso clínico de este anticuerpo primordialmente a 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  
25 (Teplizumab y TRX4) exhiben reducidos efectos secundarios 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  
30 inactivación de células T de células que expresan receptor Fc todavía se observa que lleva a liberación de citoquina

AS

generalmente conectada con efectos secundarios dependientes de citoquina.

En el presente estudio, se encontró de manera sorprendente que la inducción de citoquina observada en voluntarios sanos después de aplicación intravenosa o subcutánea de BT061 fue comparativamente 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 citoquina es mucho menor que la que se ve con otros anticuerpos monoclonales que interactúan con célula T.

Las concentraciones pico promedio para las citoquinas observadas en cualquier punto en tiempo dentro de 96 h después de administración utilizando las más altas dosis (40 mg a 60 mg de BT061) se ilustran en las Figuras 10 y 11.

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 10 A y B muestran que la liberación de  $\text{TNF}\alpha$  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 11 muestra los niveles de plasma IL-2 y IFN- $\gamma$  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

5 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

10 transitoria. Niveles de TNF- $\alpha$  y IL-6 se aumentaron ligeramente. Las Figuras 10 A y B muestra que los valores pico medianos de IL-6 y los niveles de citoquina TNF $\alpha$  detectados en plasma después de aplicación de BT061 (40 y 60 mg) son menores que aquellos vistos después de

15 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- $\gamma$  y IL-2 (Figura 11) como se reportó para la aplicación de

20 TRX4 (Keymeulen et al. 2005 N. Engl. J. Med. Type 1 Diabetes patients).

#### Linfocitos CD4+

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

25 plasma recolectadas.

Los resultados de la administración intravenosa se muestran a continuación en las Tablas H, J y K. La Tabla L muestra los resultados de la prueba con administración subcutánea. Los resultados se ilustran

30 gráficamente en las Figuras 12 y 13.

#### TABLA H Conteos celulares CD4+ en voluntarios

177

sanos individuales después de administración intravenosa de  
3.5 µg a 2.5 mg de BT061

5

10

15

20

25

| TIEMPO   | DOSIS  |        |        |       |       |
|----------|--------|--------|--------|-------|-------|
|          | 3.5 µg | 3.5 µg | 3.5 µg | 20 µg | 20 µg |
| Predosis | 998    | 878    | 1025   | 955   | 1209  |
| 3h       | 1098   | 746    | 1020   | 708   | 1121  |
| 6h       | 922    | 710    | 1063   | 746   | 1091  |
| 12h      | 898    | 1183   | 942    | 1016  | 1667  |
| 24h      | 868    | 825    | 769    | 699   | 1043  |
| 36h      | 948    | 1035   | 1148   | 861   | 1549  |
| 48h      | 798    | 542    | 834    | 566   | 1119  |
| 72h      | 798    | 626    | 766    | 622   | 942   |
| 96h      | 469    | 715    | 838    | 583   | 978   |
| 120h     | 736    | 643    | 843    | 604   | 942   |
| 144h     | 663    | 593    | 766    | 635   | 1200  |
| 168h     | 753    | 576    | 695    | 616   | 1012  |
| Día 14   | 716    | 615    | 625    | 696   | 867   |
| Día 21   | 941    | 378    | 707    | 637   | 971   |
| Día 28   | 821    | 569    | 840    | 652   | 863   |
| Día 42   | 922    | 442    | 784    | 676   | 1044  |
| Día 56   | 573    | 597    | 828    | 839   | 871   |
| Día 75   | 1821   | 512    | 692    | 659   | 1058  |
| Día 90   |        |        |        |       |       |
|          |        |        |        |       |       |

1778

5

|                                                     |      |      |      |      |      |
|-----------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| Recuento<br>celular<br>mínimo<br>(72 h a<br>día 75) | 469  | 378  | 625  | 583  | 863  |
| Reducción<br>máxima de<br>células<br>CD4+ (%)       | 53.0 | 56.9 | 39.0 | 39.0 | 28.6 |

10

Tabla H (continúa)

15

| TIEMPO    | DOSIS |        |        |        |        |
|-----------|-------|--------|--------|--------|--------|
|           | 20 µg | 100 µg | 100 µg | 100 µg | 500 µg |
| Pre-dosis | 666   | 1164   | 800    | 543    | 759    |
| 3h        | 642   | 452    | 791    | 319    | 777    |
| 6h        | 590   | 353    | 627    | 314    | 805    |
| 12h       | 1055  | 465    | 1065   | 477    | 955    |
| 24h       | 517   | 399    | 606    | 347    | 687    |
| 36h       | 836   | 559    | 1016   | 485    | 869    |
| 48h       | 711   | 384    | 644    | 413    | 730    |
| 72h       | 575   | 400    | 749    | 503    | 696    |
| 96h       | 531   | 475    | 698    | 400    | 800    |
| 120h      | 472   | 401    | 650    | 511    | 830    |

20

25

179

5

10

15

|                                         |      |      |      |      |      |
|-----------------------------------------|------|------|------|------|------|
| 144h                                    | 510  | 372  | 573  | 432  | 705  |
| 168h                                    | 505  | 348  | 646  | 426  | 740  |
| Día 14                                  | 645  | 400  | 771  | 451  | 713  |
| Día 21                                  | 633  | 391  | 805  | 404  | 651  |
| Día 28                                  | 649  | 497  | 775  | 503  | 752  |
| Día 42                                  | 700  | 569  | 758  | 455  | 700  |
| Día 56                                  | 553  | 489  | 607  | 441  | 674  |
| Día 75                                  | 553  | 466  | 735  | 459  | 645  |
| Día 90                                  |      |      |      |      |      |
|                                         |      |      |      |      |      |
| Recuento celular mínimo (72 h a día 75) | 472  | 348  | 573  | 400  | 645  |
| Reducción máxima de células CD4+ (%)    | 29.1 | 70.1 | 28.4 | 26.3 | 15.0 |

20 Tabla H (continúa)

25

| TIEMPO    | DOSIS  |        |        |        |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
|           | 500 µg | 500 µg | 2.5 mg | 2.5 mg |
| Pre-dosis | 493    | 1240   | 891    | 782    |
| 3h        | 566    | 1058   | 392    | 461    |
| 6h        | 381    | 1115   | 487    | 512    |

180

5

10

15

20

|                                            |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|
| 12h                                        | 643  | 1505 | 669  | 881  |
| 24h                                        | 439  | 1017 | 521  | 701  |
| 36h                                        | 688  | 1542 | 976  | 1207 |
| 48h                                        | 509  | 1108 | 574  | 815  |
| 72h                                        | 484  | 969  | 537  | 689  |
| 96h                                        | 390  | 1026 | 499  | 785  |
| 120h                                       | 488  | 1168 | 501  | 782  |
| 144h                                       | 394  | 953  | 518  | 745  |
| 168h                                       | 475  | 1073 | 568  | 773  |
| día 14                                     | 600  | 1398 | 663  | 883  |
| día 21                                     | 533  | 1241 | 530  | 758  |
| día 28                                     | 445  | 1109 | 590  | 914  |
| día 42                                     | 617  | 1120 | 770  | 901  |
| día 56                                     | 616  | 1311 | 634  | 1017 |
| día 75                                     | 522  | 1026 | 731  | 1032 |
| día 90                                     |      |      |      |      |
|                                            |      |      |      |      |
| Recuento celular<br>mínimo (72 h a día 75) | 390  | 953  | 499  | 689  |
| Reducción máxima de<br>células CD4+ (%)    | 20.9 | 23.1 | 44.0 | 11.9 |

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

181

5

10

15

20

25

30

| 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<br>(72 h a día 75) | 579  | 669  | 300  | 475  |
| Reducción máxima de<br>células CD4+ (%)    | 46.4 | 40.1 | 51.8 | 59.1 |

Tabla J (continúa)

5

10

15

20

25

30

| TIEMPO                                  | DOSIS |       |       |       |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                         | 10 mg | 10 mg | 10 mg | 20 mg |
| Pre-Dosis                               | 840   | 835   | 1281  | 700   |
| 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 12 muestra que los 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 se calcularon con base en recuentos celulares medidos en 11 voluntarios sanos usando metodología idéntica a la empleada para medir los recuentos celulares de los voluntarios que reciben BT061. ULN y LLN representan el promedio de todos los valores de 11 voluntarios sanos + (o -) la desviación estándar. Valores de norma para recuentos de células CD4 se calcularon entre 443 células CD4 por  $\mu$ l (límite inferior de normal; LLN) y 1324 células CD4 por  $\mu$ l (límite superior de normal; ULN).

La Figura 13 muestra los recuentos celulares CD4 (células por ml de plasma) en voluntarios tratados con la dosis subcutánea sencilla de BT061. Como con la Figura 12, 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 K    Recuentos celulares CD4+ en voluntarios sanos individuales después de administración intravenosa 20 mg a 60 mg de BT061**

184

5

10

| 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   |
| 96h       | 468   | 755   | 567   | 545   |
| 120h      | 391   | 795   | 578   | 517   |

15

20

25

|                                            |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|
| 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<br>(72 h a día 75) | 331  | 755  | 439  | 440  |
| Reducción máxima de<br>células CD4+ (%)    | 60.7 | 38.8 | 61.9 | 44.2 |

Tabla K (continúa)

5

| 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   |

10

|      |     |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|
| 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 |

15

|        |     |      |     |      |
|--------|-----|------|-----|------|
| 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 |     |      |     |      |

20

|                                            |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|
|                                            |      |      |      |      |
| Recuento celular mínimo<br>(72 h a día 75) | 570  | 466  | 546  | 423  |
| Reducción máxima de<br>células CD4+ (%)    | 41.6 | 48.2 | 44.8 | 83.3 |

25

30

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

86

BT061

|    | TIEMPO                                     | DOSIS    |      |      |       |       |
|----|--------------------------------------------|----------|------|------|-------|-------|
|    |                                            | 5 mg     | 5 mg | 5 mg | 10 mg | 10 mg |
| 5  | Pre-dosis                                  | 1053     | 553  | 663  | 962   | 697   |
|    | 24h                                        | 858      | 402  | 707  | 640   | 623   |
|    | 36h                                        | 1131     | 916  | 946  | 1232  | 955   |
|    | 48h                                        | 625      | 526  | 550  | 610   | 757   |
|    | 72h                                        | 814      | 661  | 580  | 589   | 709   |
| 10 | 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   |
| 15 | 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   |
| 20 | día 75                                     | 852      | 592  | 772  | 1268  | 679   |
|    |                                            |          |      |      |       |       |
|    | Recuento celular mínimo<br>(72 h a día 75) | 719      | 450  | 437  | 589   | 653   |
| 25 | Reduc-ción máxima de<br>células CD4+ (%)   | 31.<br>7 |      |      |       |       |
|    |                                            | 18.6     | 34.1 | 38.8 | 6.3   |       |

Tabla L (continúa)

187

5

10

15

20

25    Tabla  
L (continúa)

| TIEMPO                                     | DOSIS    |       |          |       |          |
|--------------------------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|
|                                            | 10 mg    | 20 mg | 20 mg    | 20 mg | 40 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<br>(72 h a día 75) | 516      | 603   | 469      | 531   | 239      |
| Reduc-ción máxima de<br>células CD4+ (%)   | 42.<br>1 |       | 32.<br>2 |       | 65.<br>3 |

5

10

15

20

25

| 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<br>mínimo (72 h a<br>día 75) | 515   | 541   | 568   | 639   | 505   |
| Reducción máxima<br>de cél CD4+ (%)           | 45.6  | 35.6  | 49.0  | 11.1  | 62.5  |

30

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 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  
5 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  
10 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 células CD4 por µl; 1 voluntario del grupo 10 mg: 440  
15 células CD4 por µl; y 1 voluntario del grupo 20 mg: 392 células CD4 por µl.

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

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  
25 específicos de CD4, BT061 solo induce un declive transitorio de células CD4-positivas seguido por una recuperación general. Del declive transitorio y recuperación general rápida a valores de norma se concluye  
30 que una redistribución transitoria de las células CD4-positivas se ha llevado a cabo, en vez del agotamiento de

estas células.

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

La capacidad de BT061 hB-F5 para tratar artritis reumatoide se prueba en pacientes que sufren de esta enfermedad. La prueba comprende un estudio de dosis 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 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.

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 301-308. 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.

El procedimiento de administración intravenosa y subcutánea fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 3 para la prueba de psoriasis.

El nivel de artritis reumatoide se registra semanalmente al estimar los parámetros ACR y en particular

196

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 M a S proporcionan el número de articulaciones sensibles e hinchadas durante el curso de la prueba.

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

| Pacientes<br>- 1.25 mg<br>grupo de<br>dosis SC | Articu-<br>lacio-<br>nes<br>(no.) | Visitas                 |                              |                              |                               |                               |
|------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                                |                                   | Visi-<br>ta de<br>Criba | Día<br>1<br>Se-<br>mana<br>1 | Día<br>8<br>Se-<br>mana<br>2 | Día<br>15<br>Se-<br>mana<br>3 | Día<br>22<br>Se-<br>mana<br>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                             |
| 104                                            | sensible                          | 17                      | 10                           | 4                            | 3                             | 20                            |
|                                                | hinchada                          | 8                       | 6                            | 0                            | 0                             | 0                             |

192

5

|     |          |    |    |    |    |    |
|-----|----------|----|----|----|----|----|
| 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 |

10

Tabla M (continúa)

15

|                                                |       | Visitas |          |          |           |
|------------------------------------------------|-------|---------|----------|----------|-----------|
| Pacientes -<br>1.25 mg<br>grupo de<br>dosis SC | Día   | Día     |          |          |           |
|                                                | 29    | 36      | Día FU   | Día FU   | Día FU    |
|                                                | Sema- | Se-     | 43       | 57       | 78        |
|                                                | na 5  | mana 6  | Semana 7 | Semana 9 | 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         |

20

25

30

|     |    |    |    |    |    |
|-----|----|----|----|----|----|
| 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  |

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

10

15

|           |                                   | Visitas                 |                              |                              |                               |                               |
|-----------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Pacientes | Arti-<br>cula-<br>ciones<br>(no.) | Visi-<br>ta de<br>Criba | Día<br>1<br>Se-<br>mana<br>1 | Día<br>8<br>Se-<br>mana<br>2 | Día<br>15<br>Se-<br>mana<br>3 | Día<br>22<br>Se-<br>mana<br>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                             |

20

25

30

|     |          |    |    |    |    |    |
|-----|----------|----|----|----|----|----|
| 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 |

194

Tabla N (continúa)

|    |           |        |        |        |        |        |
|----|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 5  | Visitas   |        |        |        |        |        |
|    | Pacientes | Día    |        | Día FU | Día FU | Día FU |
|    | - 6.25 mg | 29     | Día 36 | 43     | 57     | 78     |
|    | grupo de  | Semana | Semana | Semana | Semana | Semana |
|    | dosis SC  | 5      | 6      | 7      | 9      | 12     |
| 10 | 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      |
| 15 | 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      |
| 20 |           |        |        |        |        |        |
| 25 |           |        |        |        |        |        |

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

5

10

| Pacientes | Arti-<br>cula-<br>ciones<br>(no.) | Visitas                 |                              |                              |                               |                               |
|-----------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|           |                                   | Visi-<br>ta de<br>Criba | Día<br>1<br>Se-<br>mana<br>1 | Día<br>8<br>Se-<br>mana<br>2 | Día<br>15<br>Se-<br>mana<br>3 | Día<br>22<br>Se-<br>mana<br>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                            |

15

|     |          |    |    |    |    |    |
|-----|----------|----|----|----|----|----|
| 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  |

20

25

Tabla P (continúa)

5

|            |        | Visitas |        |        |        |
|------------|--------|---------|--------|--------|--------|
| Pacientes  | Día    |         | Día FU | Día FU | Día FU |
| - 12..5 mg | 29     | Día 36  | 43     | 57     | 78     |
| grupo de   | Semana | Semana  | Semana | Semana | Semana |
| dosis SC   | 5      | 6       | 7      | 9      | 12     |
| 301        | 16     | 16      | 20     | 14     | 14     |
|            | 8      | 8       | 6      | 6      | 6      |
| 302        | -      | -       | -      | -      | 30     |
|            | -      | -       | -      | -      | 18     |

10

15

|     |    |    |    |    |    |
|-----|----|----|----|----|----|
| 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  |

20

25

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

197

5

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

10

|     |          |    |    |    |    |    |
|-----|----------|----|----|----|----|----|
| 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  |

15

|     |          |    |    |    |    |    |
|-----|----------|----|----|----|----|----|
| 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  |

20

5

|           |        | Visitas |        |        |        |
|-----------|--------|---------|--------|--------|--------|
| Pacientes |        |         | Día FU | Día FU | Día FU |
| - 25 mg   | Día 29 | Día 36  | 43     | 57     | 78     |
| grupo de  | Semana | Semana  | Semana | Semana | Semana |
| dosis SC  | 5      | 6       | 7      | 9      | 12     |
| 401       | 13     | 12      | 11     | 9      | 6      |
|           | 11     | 8       | 5      | 8      | 5      |

10

|     |    |    |    |    |    |
|-----|----|----|----|----|----|
| 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  |

15

20

25

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

30

5

10

15

20

25

|           |                                   | Visitas                         |                              |                           |                               |                               |
|-----------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Pacientes | Arti-<br>cula-<br>ciones<br>(no.) | Cri-<br>ba<br>de<br>Vi-<br>sita | Día<br>1<br>Se-<br>mana<br>1 | Día 8<br>Se-<br>mana<br>2 | Día<br>15<br>Se-<br>mana<br>3 | Día<br>22<br>Se-<br>mana<br>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 R (continúa)

200

5

10

15

20

25

| Pacientes -<br>50 mg grupo<br>de dosis SC | Día<br>29<br><br>Sema-<br>na 5 | Visitas                       |                          |                             |                              |
|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                                           |                                | Día<br>36<br>Se-<br>mana<br>6 | Día FU<br>43<br>Semana 7 | Día FU<br>57<br>Semana<br>9 | Día FU<br>78<br>Semana<br>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 S - Recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas del grupo de dosis intravenosas de 6.25 mg.

2011

5

10

15

20

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

|     |                                             |         |      |        |        |          |  |
|-----|---------------------------------------------|---------|------|--------|--------|----------|--|
|     |                                             | Visitas |      |        |        |          |  |
| 5   | Pacientes -<br>6.25 mg grupo<br>de dosis IV | Día     | Día  |        |        |          |  |
|     |                                             | 29      | 36   | Día FU | Día FU | Día FU a |  |
|     |                                             | Se-     | Se-  | 43     | 57     | 78       |  |
|     |                                             | mana    | mana | Semana | Semana | Semana.  |  |
|     | 5                                           | 6       | 7    | 9      | 12     |          |  |
| 601 |                                             | 26      | 31   |        |        |          |  |
|     |                                             | 20      | 21   |        |        |          |  |
| 10  | 602                                         |         | 30   | 17     | 19     | 14       |  |
|     |                                             |         | 6    | 5      | 5      | 7        |  |
|     | 603                                         |         | 24   |        |        |          |  |
|     |                                             |         | 6    |        |        |          |  |
| 15  | 604                                         |         | 10   | 11     | 7      | 9        |  |
|     |                                             |         | 2    | 2      | 3      | 1        |  |
|     | 605                                         |         |      |        |        |          |  |
|     |                                             |         |      |        |        |          |  |
|     | 606                                         |         |      |        |        |          |  |
|     |                                             |         |      |        |        |          |  |
| 20  | 607                                         |         |      |        |        |          |  |
|     |                                             |         |      |        |        |          |  |
|     | 608                                         |         |      |        |        |          |  |
|     |                                             |         |      |        |        |          |  |

25            La Figura 15 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 16 A y 16 B 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 17A y 17B, 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 18A, 18B, 19A y 19B

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 5 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 0.2 mg a 30 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 cantidad desde 0.2 a 20 mg.

3. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el agente se va a administrar a un sujeto en una cantidad desde 0.3 a 5  
15 mg.

4. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el agente se va a administrar a un sujeto en una cantidad desde 0.3 a 1  
mg.

20 5. 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  
25 del agente desde 0.10 a 20 mg/m<sup>2</sup> de área superficial del cuerpo del sujeto.

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 desde 0.12 a 15 mg/m<sup>2</sup>.

7. Una composición farmacéutica de conformidad

con la reivindicación 6, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente desde 0.20 a 10 mg/m<sup>2</sup>.

8. Una composición farmacéutica de conformidad  
5 con la reivindicación 7, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente desde 0.30 a 0.50 mg/m<sup>2</sup>.

9. Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune, caracterizada porque comprende un  
10 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 1 a 500 µg/kg.

10. Una composición farmacéutica de conformidad  
15 con la reivindicación 9, caracterizada porque la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 2 a 400 µg/kg.

11. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la  
20 composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 2 a 250 µg/kg.

12. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque la  
composición se va a administrar a un sujeto en una dosis  
25 del agente de 2.5 a 20 µg/kg.

13. 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,  
30 enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, tireoiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune,

lupus sistémico eritematoso y enfermedades relacionadas a transplante tales como de injerto-contra-hospedero o aspectos de tolerancia general de órganos.

14. Una composición farmacéutica de conformidad  
5 con la reivindicación 13, caracterizada porque la enfermedad es psoriasis.

15. Una composición farmacéutica de conformidad  
con la reivindicación 14, caracterizada porque la  
composición es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al  
10 menos una mejora del 40% en la calificación de Área de  
psoriasis e Índice de Severidad (PASI) del paciente.

16. Una composición farmacéutica de conformidad  
con la reivindicación 15, caracterizada porque la  
composición es capaz de tratar psoriasis al proporcionar al  
15 menos un 50% de mejora en la calificación de Área de  
Psoriasis e Índice de Severidad (PASI) del paciente.

17. Una composición farmacéutica de conformidad  
con la reivindicación 13, caracterizada porque la  
enfermedad es artritis reumatoide.

18. Una composición farmacéutica de conformidad  
20 con cualquier reivindicación precedente, caracterizada  
porque la composición es para administración parenteral.

19. Una composición farmacéutica de conformidad  
con la reivindicación 18, caracterizada porque la  
25 composición es para administración intramuscular,  
administración intravenosa o administración subcutánea.

20. Una composición farmacéutica de conformidad  
con la reivindicación 19, caracterizada porque la  
composición es para administración intravenosa y se  
30 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.

21. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque el volumen de dosis es 15 a 25 ml.

22. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque la composición es para administración subcutánea y se proporciona en un volumen de dosis de 0.1 a 3 ml.

23. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 22, caracterizada porque el volumen de dosis es 0.5 a 1.5 ml.

24. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque la composición es para administración intramuscular y se proporciona en un volumen de dosis de 0.1 a 3 ml.

25. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque el volumen de dosis es 0.5 a 1.5 ml.

26. 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.

27. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 26, 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 semanas, cada doce semanas, cada veinticuatro semanas, cada cuarenta y ocho semanas, cada seis meses o cada año.

28. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es psoriasis y la dosis se va a

administrar una vez cada dos semanas.

29. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es psoriasis y la dosis se va a  
5 administrar una vez cada cuatro semanas.

30. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide y la dosis se va a administrar una vez cada dos semanas.

10 31. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide y la dosis se va a administrar una vez cada cuatro semanas.

15 32. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéutico aceptable y un agente capaz de activar células T regulatorias CD4+CD25+, en donde el agente está presente en una concentración de 10 µg/ml a 150 mg/ml.

20 33. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque el agente está presente en una concentración de 15 mg/ml a 75 mg/ml.

34. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 32 ó 33, caracterizada porque el volumen de la composición es de 0.5 a 500 ml.

25 35. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 34, caracterizada porque el volumen de la composición es de 15 a 25 ml.

36. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque el agente  
30 está presente en una concentración de 10 a 28 mg/ml.

37. Una composición farmacéutica de conformidad

con la reivindicación 36, caracterizada porque el volumen de la composición es de 0.1 a 3 ml.

38. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque el volumen  
5 de la composición es de 0.5 a 1.5 ml.

39. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque dentro del periodo de 10 minutos después del inicio de administración a 96 horas después de  
10 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-2.

15 40. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, 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  
20 el plasmas de sangre de un sujeto es menor a un aumento de 20 veces del valor límite superior de lo normal (ULN), en donde la citoquina se elige de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-2, y en donde el valor ULN es 3.8, 2.8, 4.4 y 19.4 pg/ml respectivamente.

25 41. Una composición de conformidad con cualquier 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 250 células/ $\mu$ l.

30 42. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada

porque el agente es un anticuerpo monoclonal humanizado o su fragmento o derivado.

43. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque el agente es  
5 un anticuerpo anti-CD4 o su fragmento o derivado.

44. 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  
10 siguientes secuencias polipéptido:

- dominio V cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG  
ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYWGQGT  
LTVVSS (SEQ ID NO: 1)

15 - dominio V cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYQYQKPGQPPKLLIYLAILE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTWTFGQGTKVEIK (SEQ  
ID NO: 2).

o dominios V que comprenden secuencias de polipéptidos que  
20 tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:  
1 y SEQ ID NO: 2.

45. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación precedente, caracterizada porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado  
25 derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal de ratón.

46. 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  
30 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 12.

47. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque la enfermedad autoinmune es como se define en la reivindicación 13, 5 reivindicación 14 o reivindicación 17.

48. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 46 ó 47, caracterizado porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado, derivado del anticuerpo B-F5 anti-CD4 monoclonal 10 de ratón.

49. Un método para tratamiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 48, caracterizado porque el agente es un anticuerpo anti-CD4 humanizado o su fragmento o derivado que tiene dominios V 15 definidos por las siguientes secuencias de péptidos:

- dominio V cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYG  
ANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYRDVGAWFAYWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 1)

20 - dominio V cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK (SEQ  
ID NO: 2).

o dominios V que comprenden secuencias de polipéptidos que 25 tienen al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

50. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es psoriasis y la dosis se va a 30 administrar una vez cada semana.

51. Una composición farmacéutica de conformidad

con la reivindicación 27, caracterizada porque la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide y la dosis se va a administrar una vez cada semana.

52. Una composición farmacéutica de conformidad  
5 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/ $\mu$ l.

10 53. 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  
15 a o superior que 50% del recuento celular del sujeto inmediatamente antes de administración.

54. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, caracterizada porque la mejora se ve a 56 días después de  
20 administración de una sola dosis de la composición.

55. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, caracterizada porque la mejora se ve a 75 días después de administración de una sola dosis de la composición.

25 56. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15, 16, 54 ó 55, caracterizada porque la dosis del agente es 0.5 mg.

57. Una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15, 16, 54 ó 55,  
30 caracterizada porque la dosis del agente es 2.5 mg.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención 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 la composición se va a administrar a un sujeto en una dosis del agente de 0.2 mg a 30 mg.

215

1 / 37

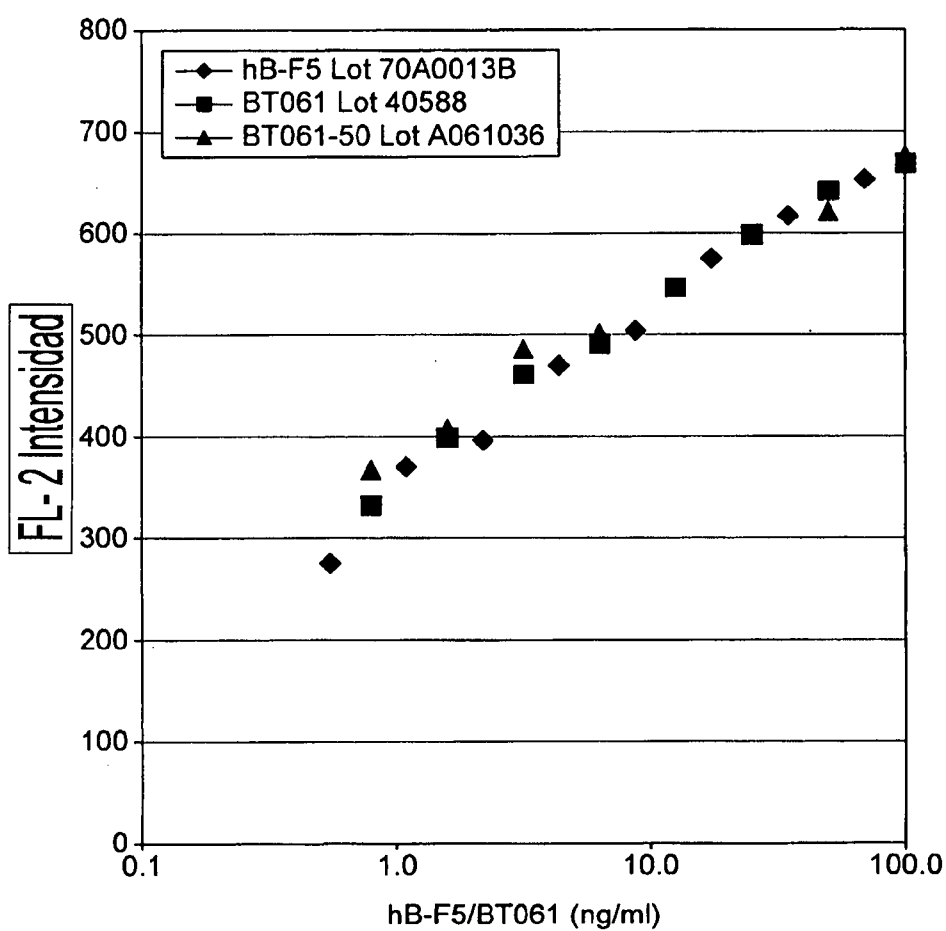


FIG. 1

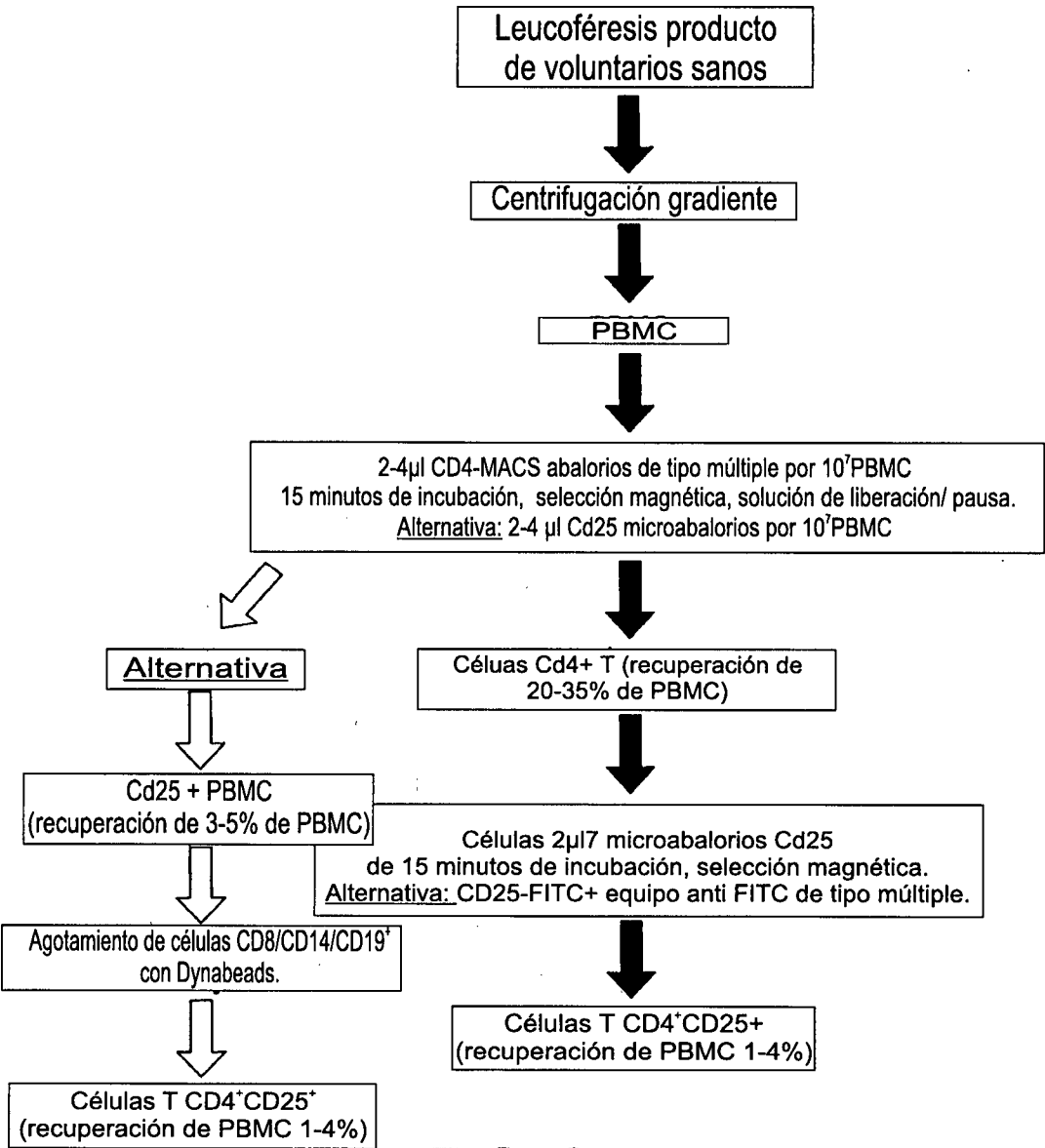


FIG. 2

217

mB-F5 V<sub>H</sub>

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

FIGURA 3

218

mB-F5 V<sub>k</sub>

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

FIGURA 4

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

FIGURA 5

220

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

FIGURA 6

221

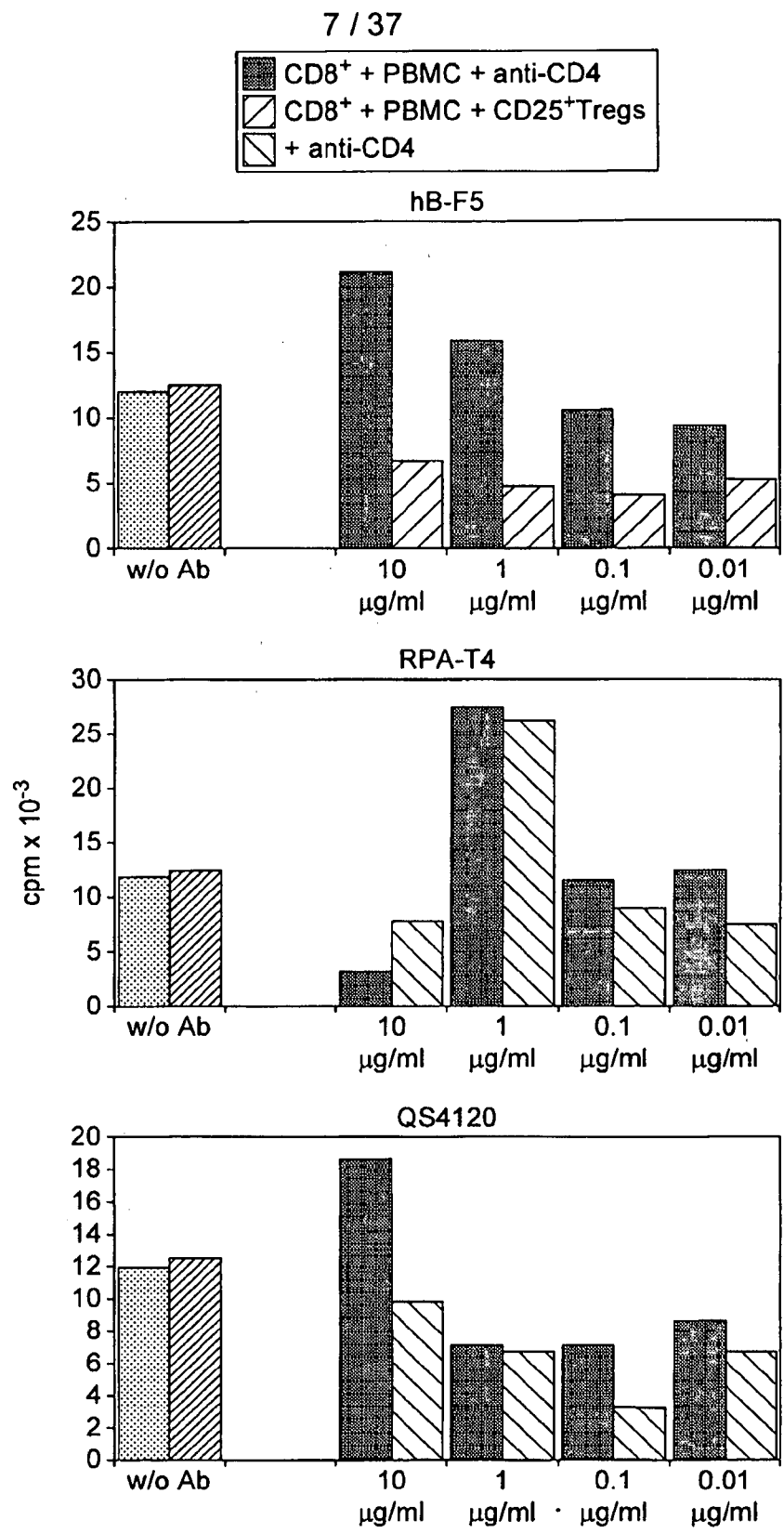


FIG 7

222

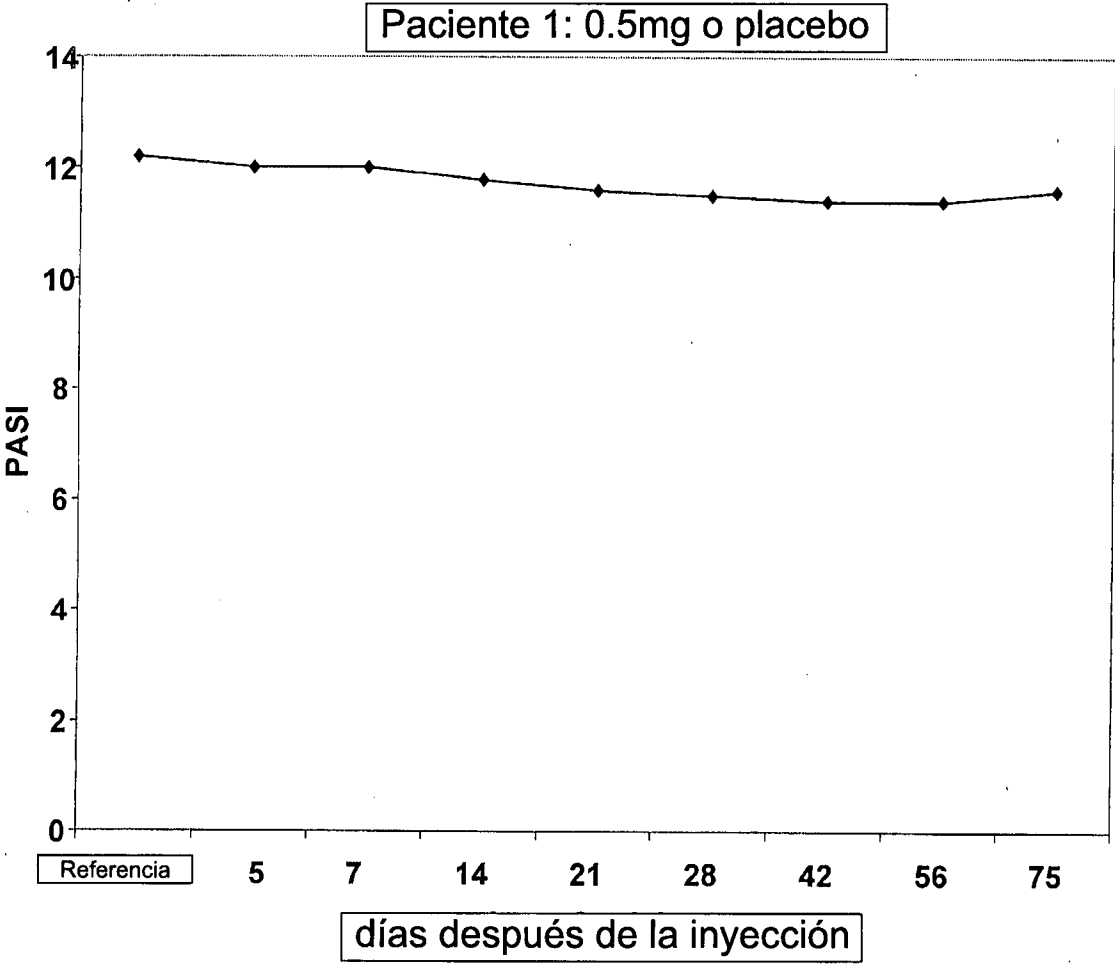


FIG 8A

223

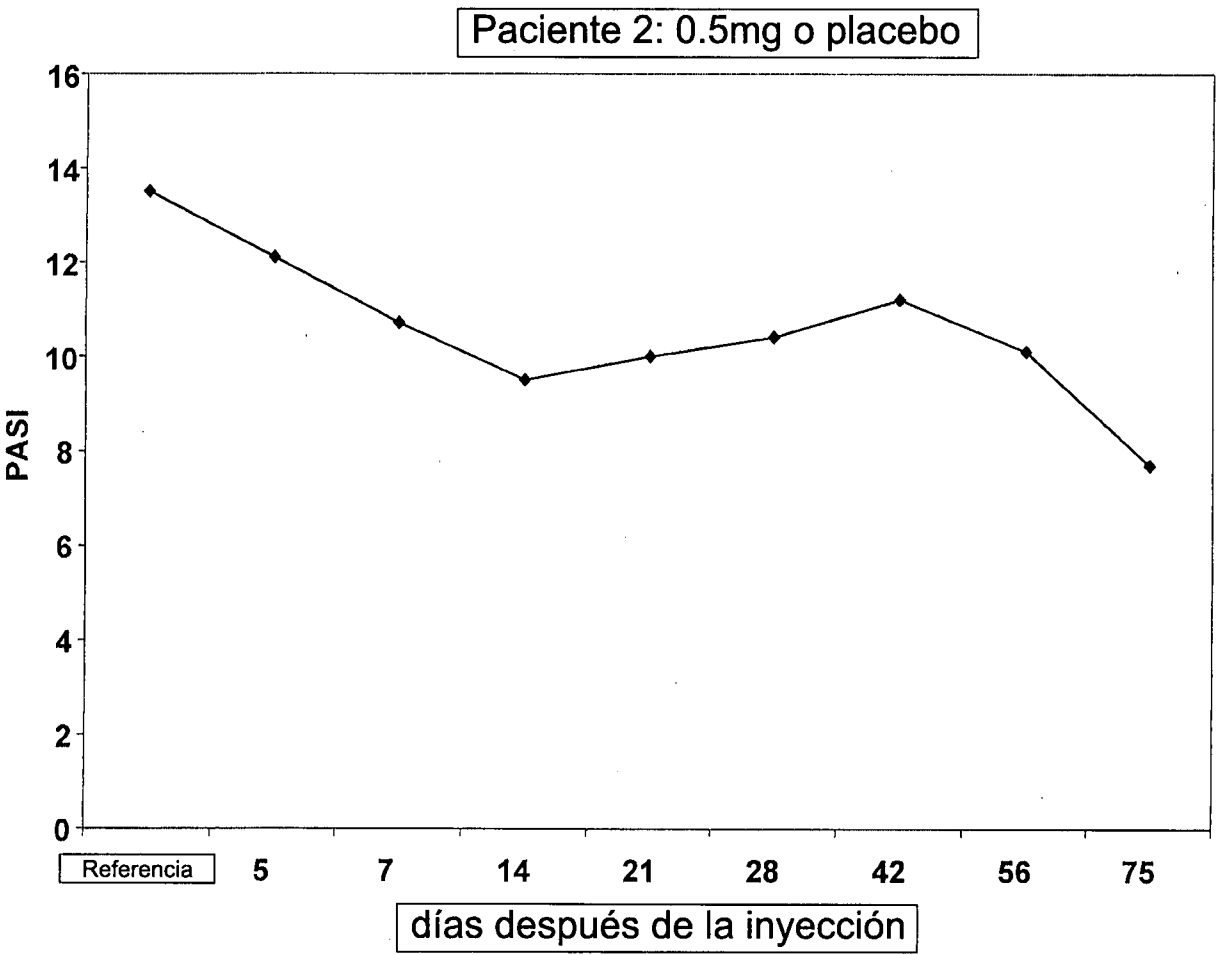


FIG 8B

224

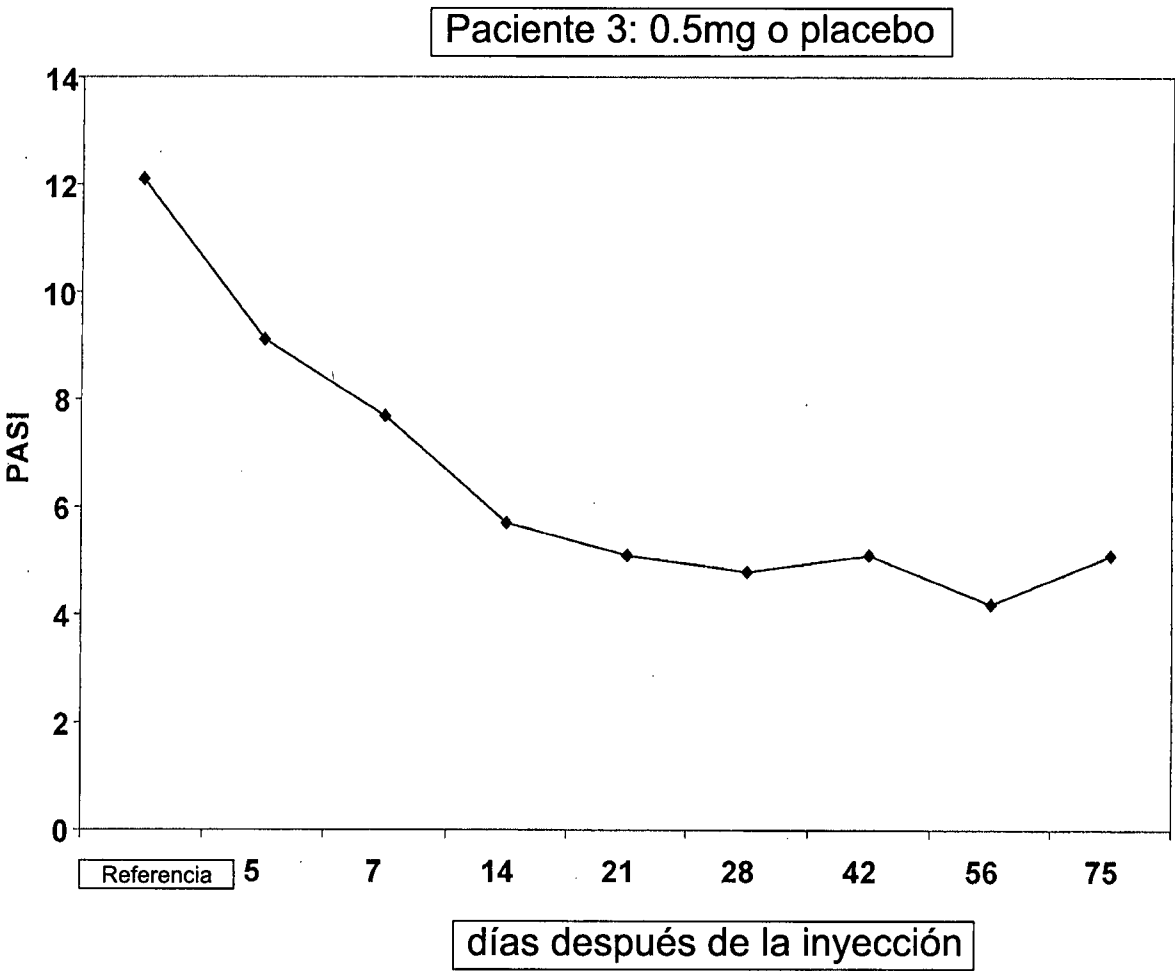


FIG 8C

225

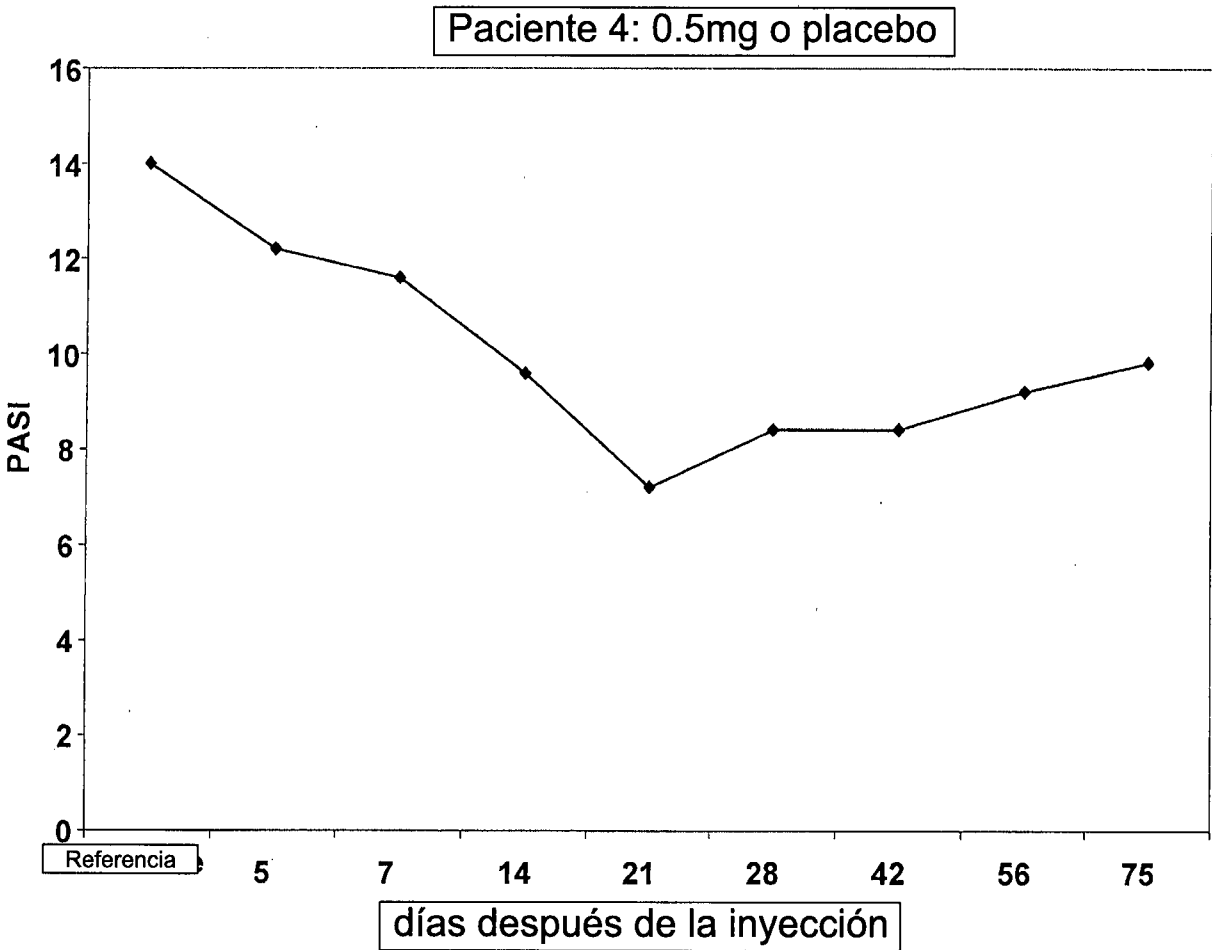


FIG 8D

236

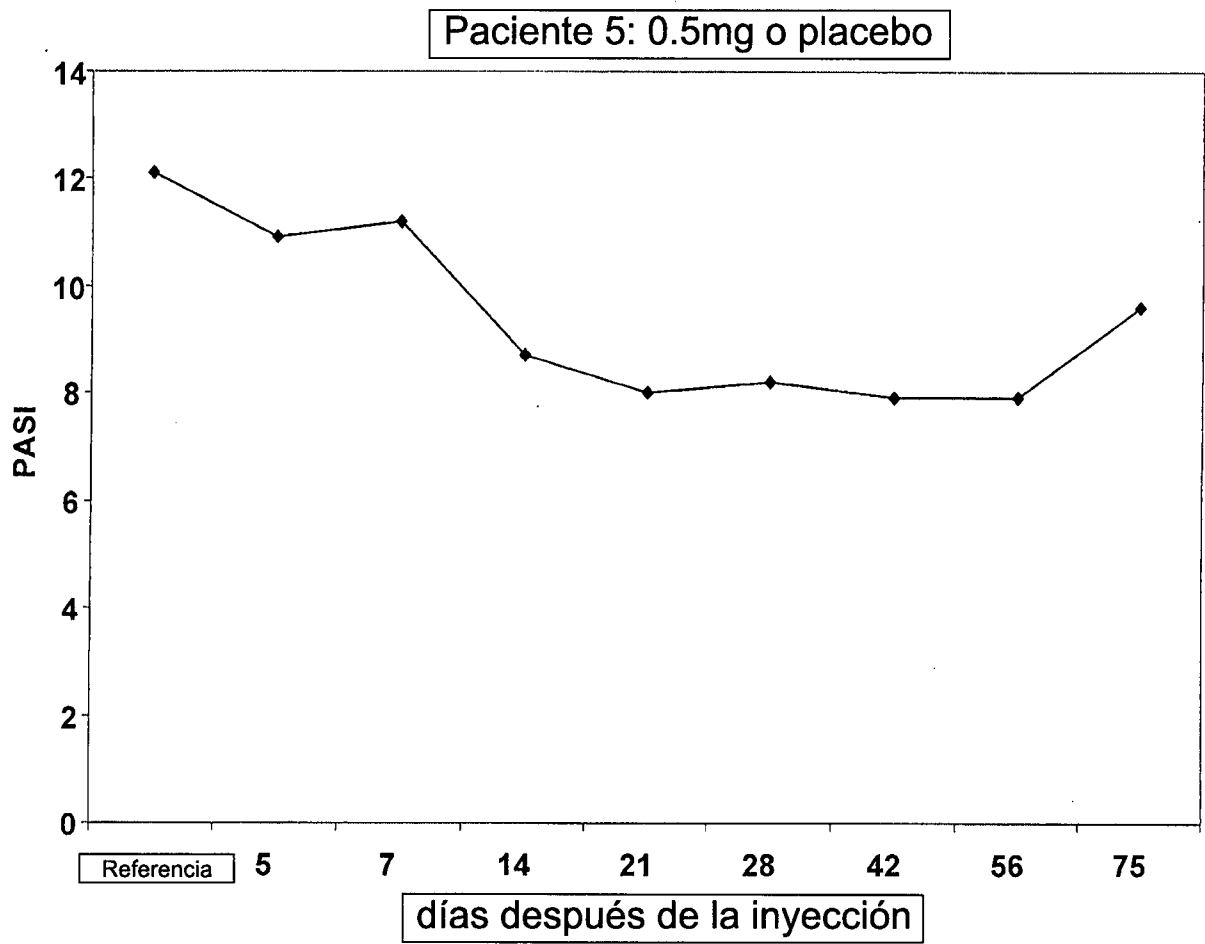


FIG 8E

225

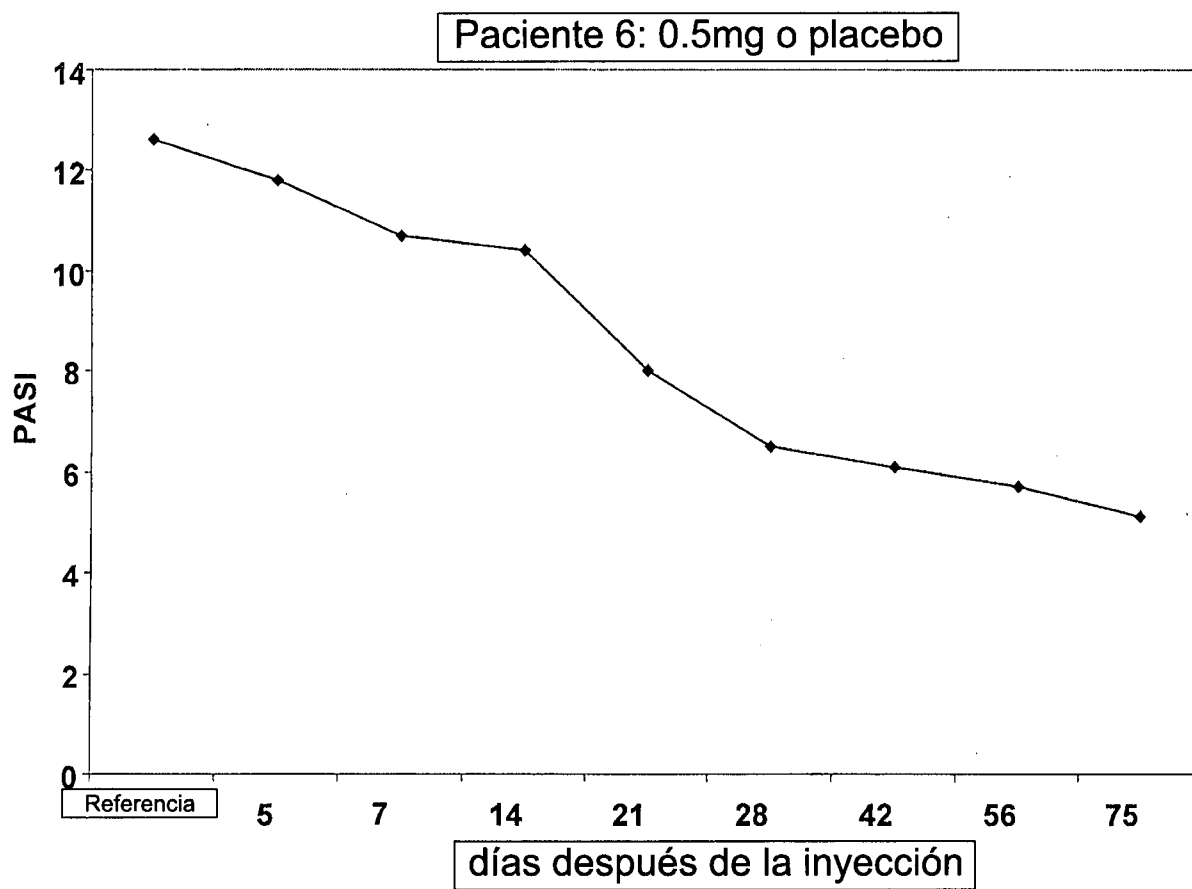


FIG 8F

228

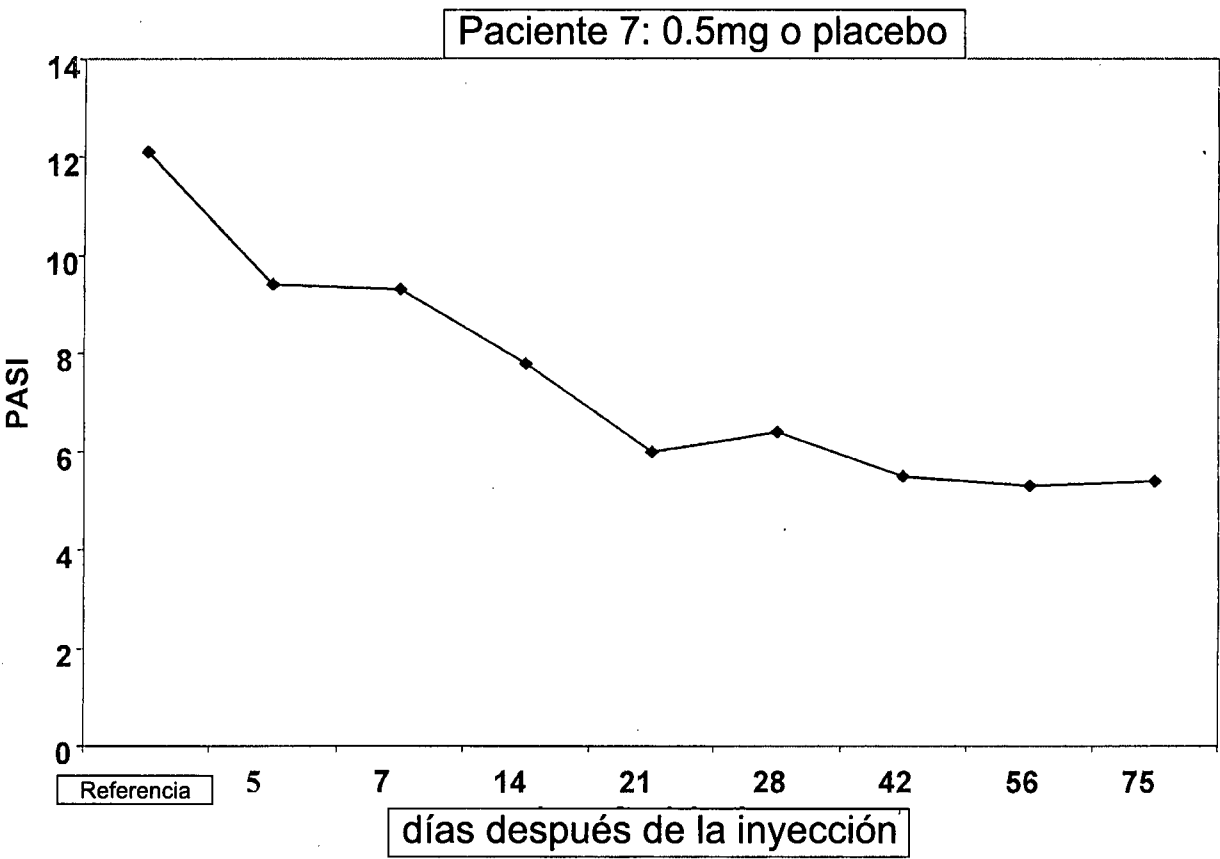


FIG 8G

229

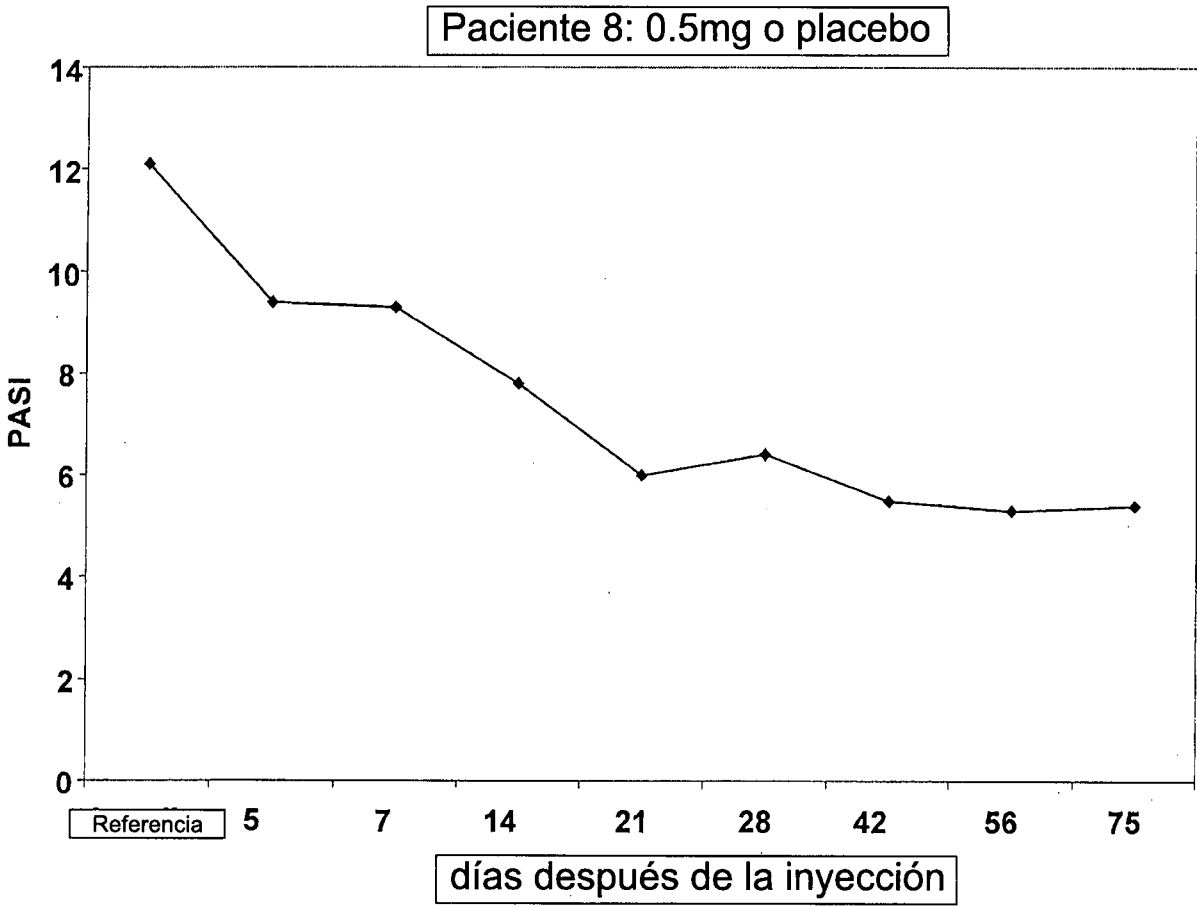


FIG 8H

230

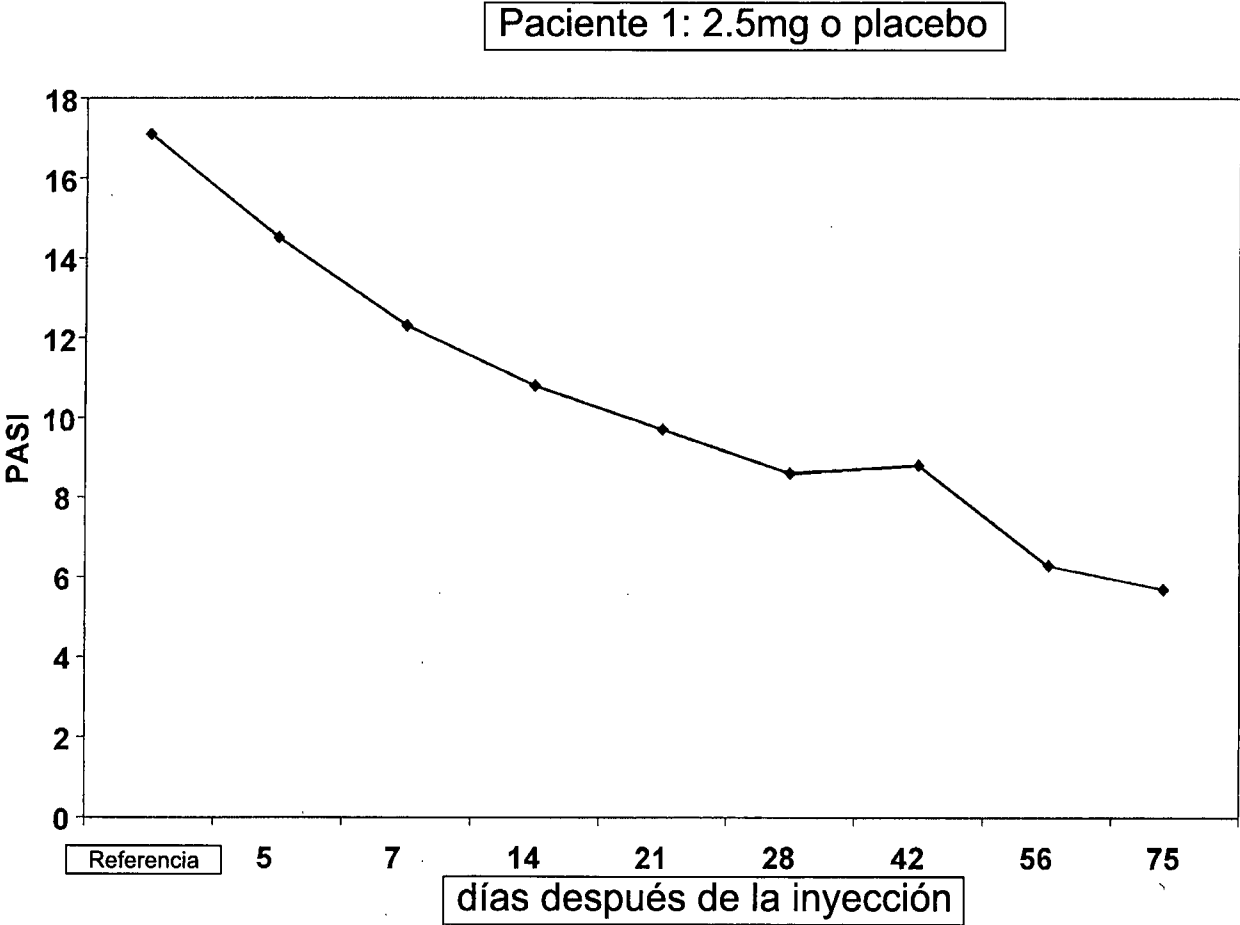


FIG 9A

231

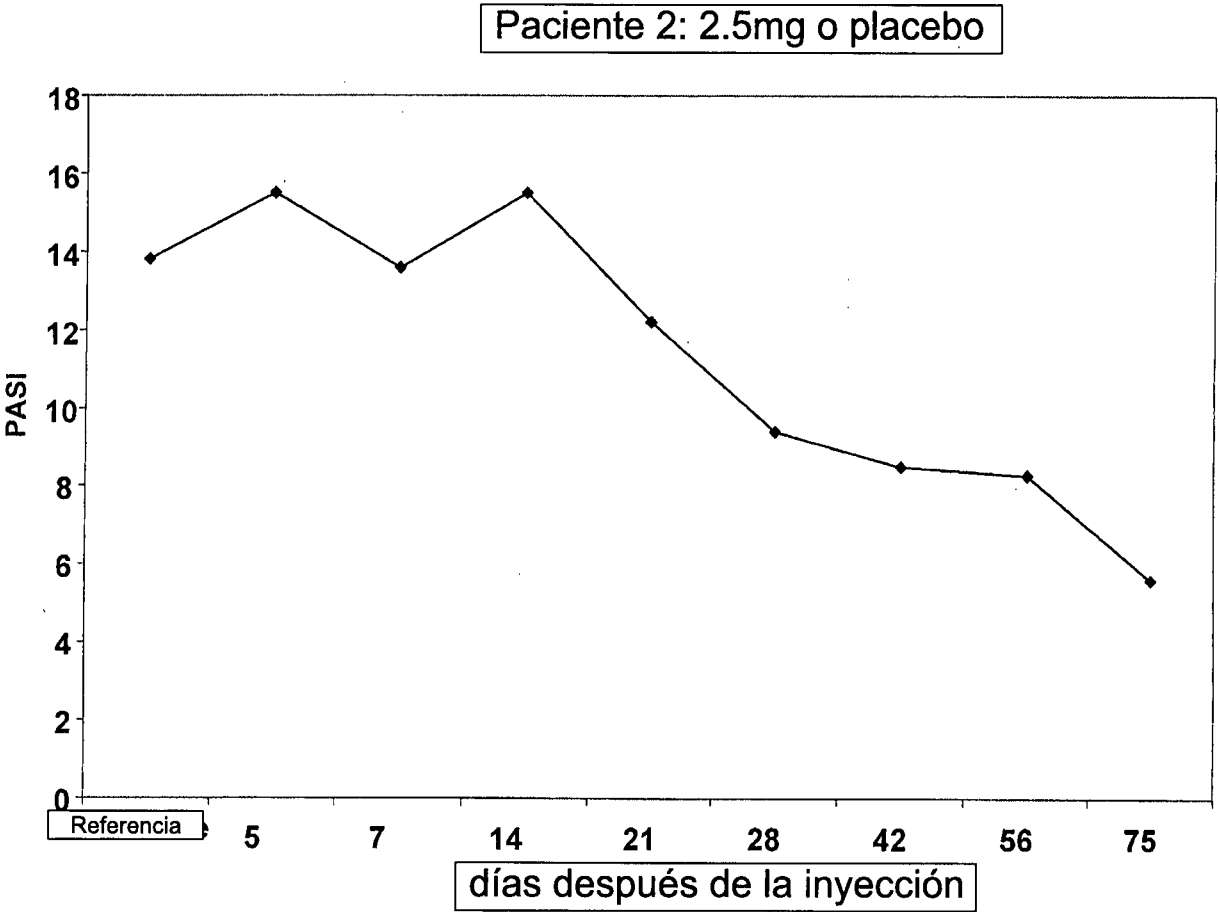


FIG 9B

232

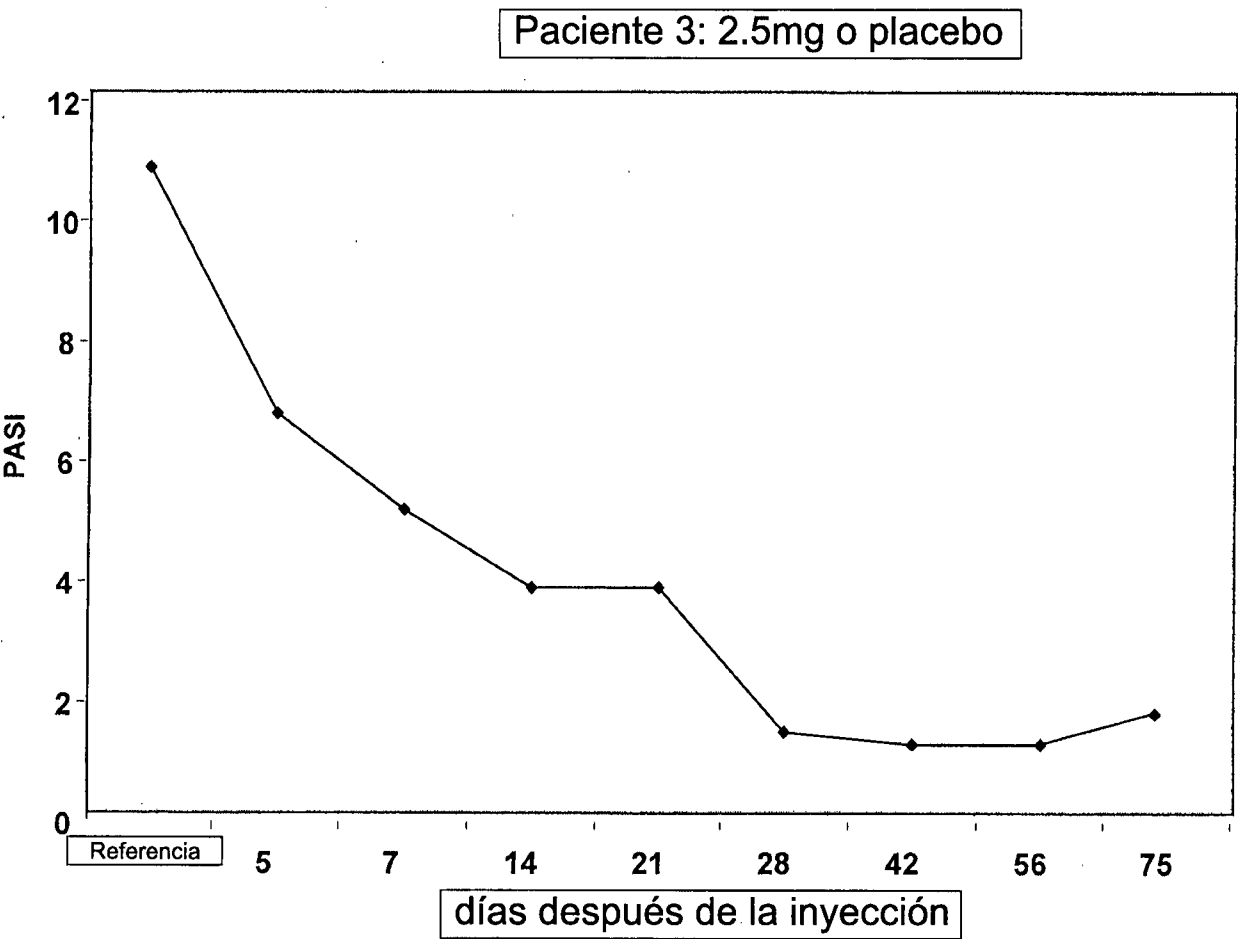


FIG 9C

233

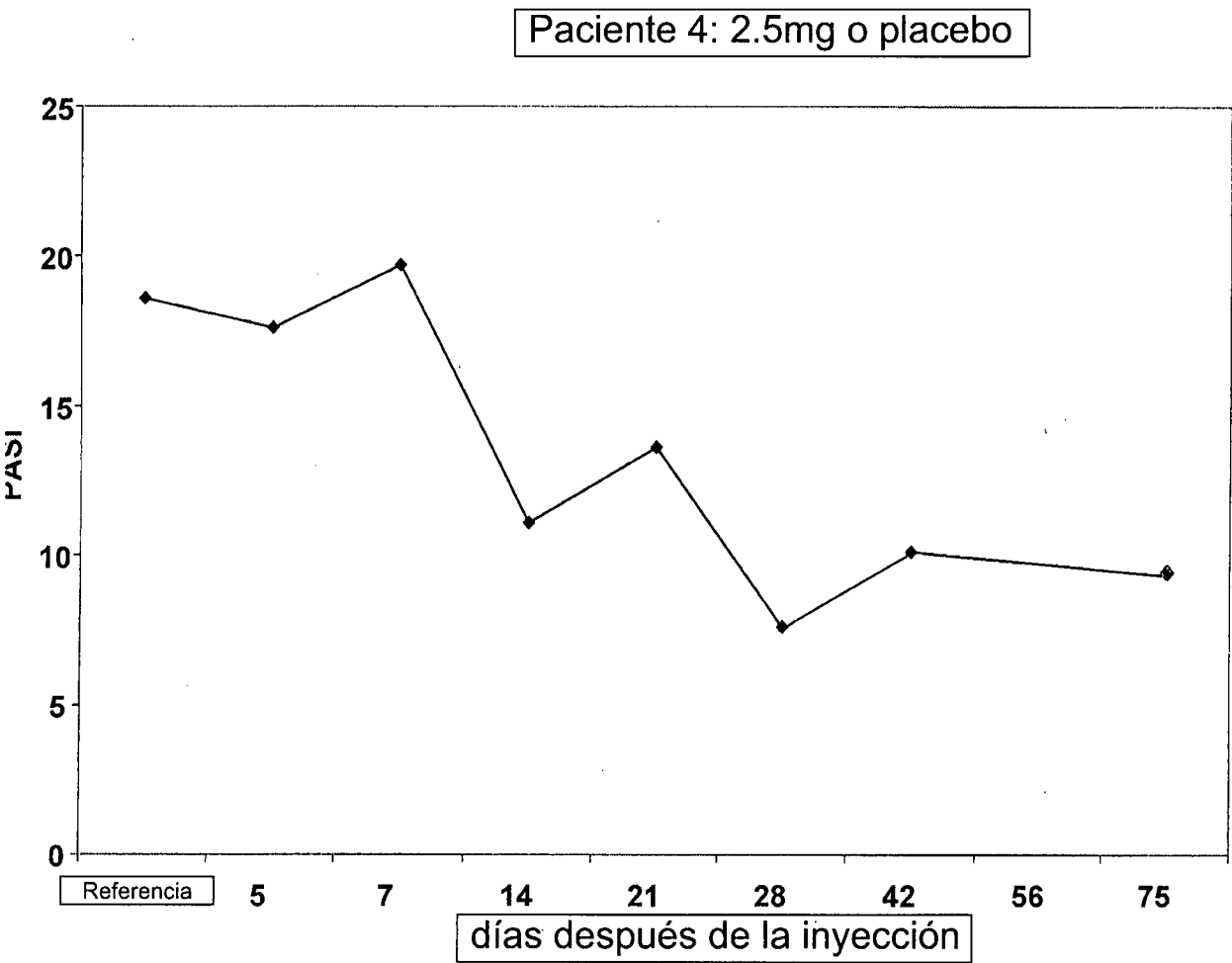


FIG 9D

234

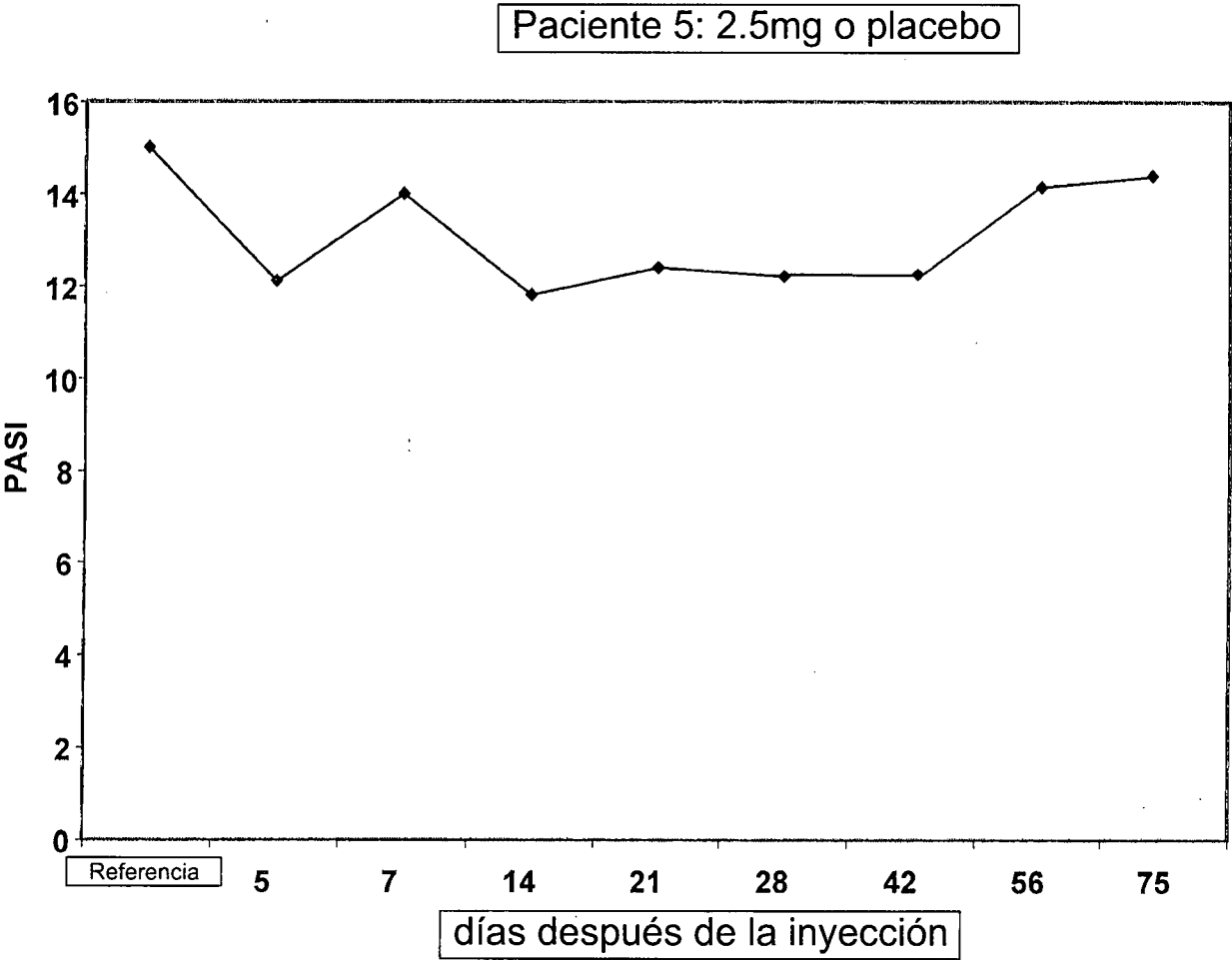


FIG 9E

235

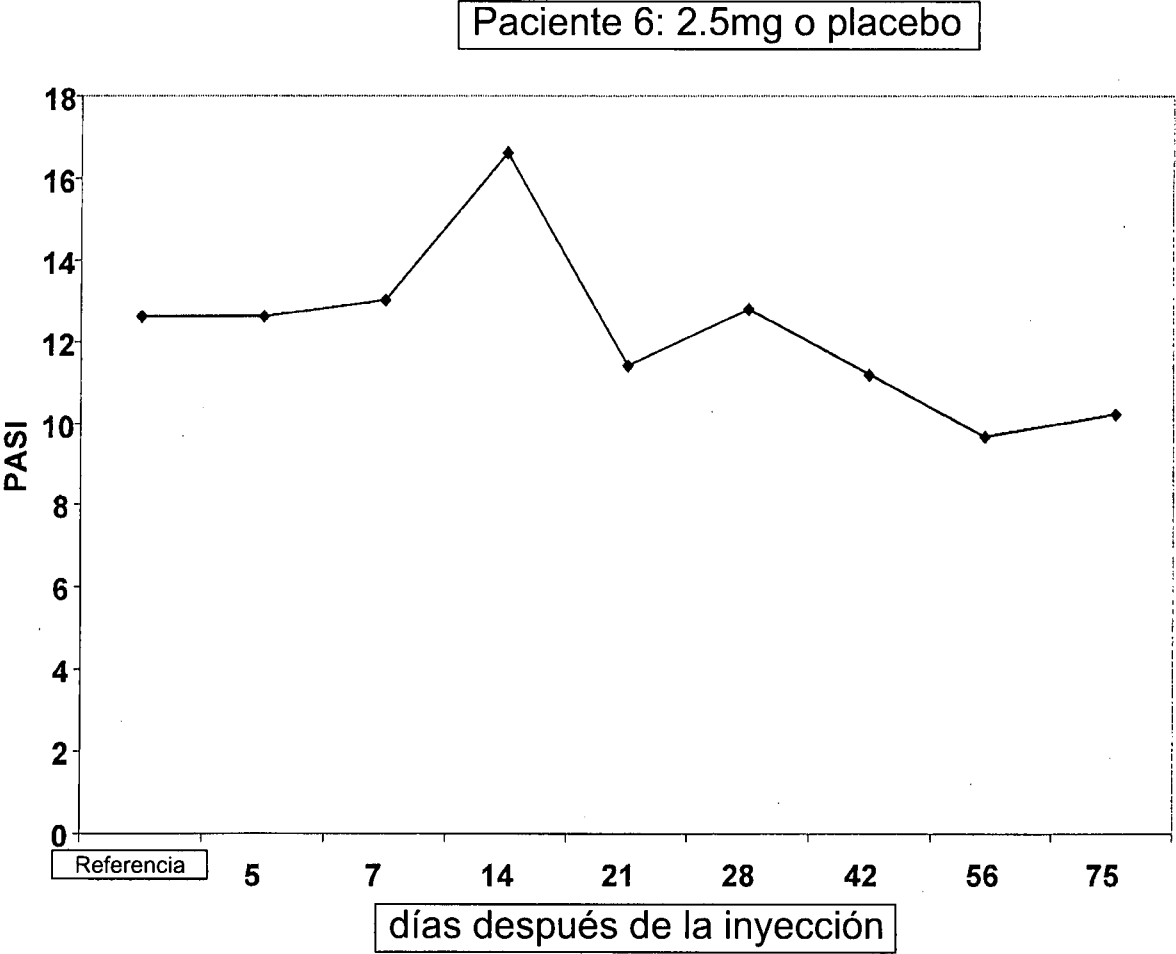


FIG 9F

234

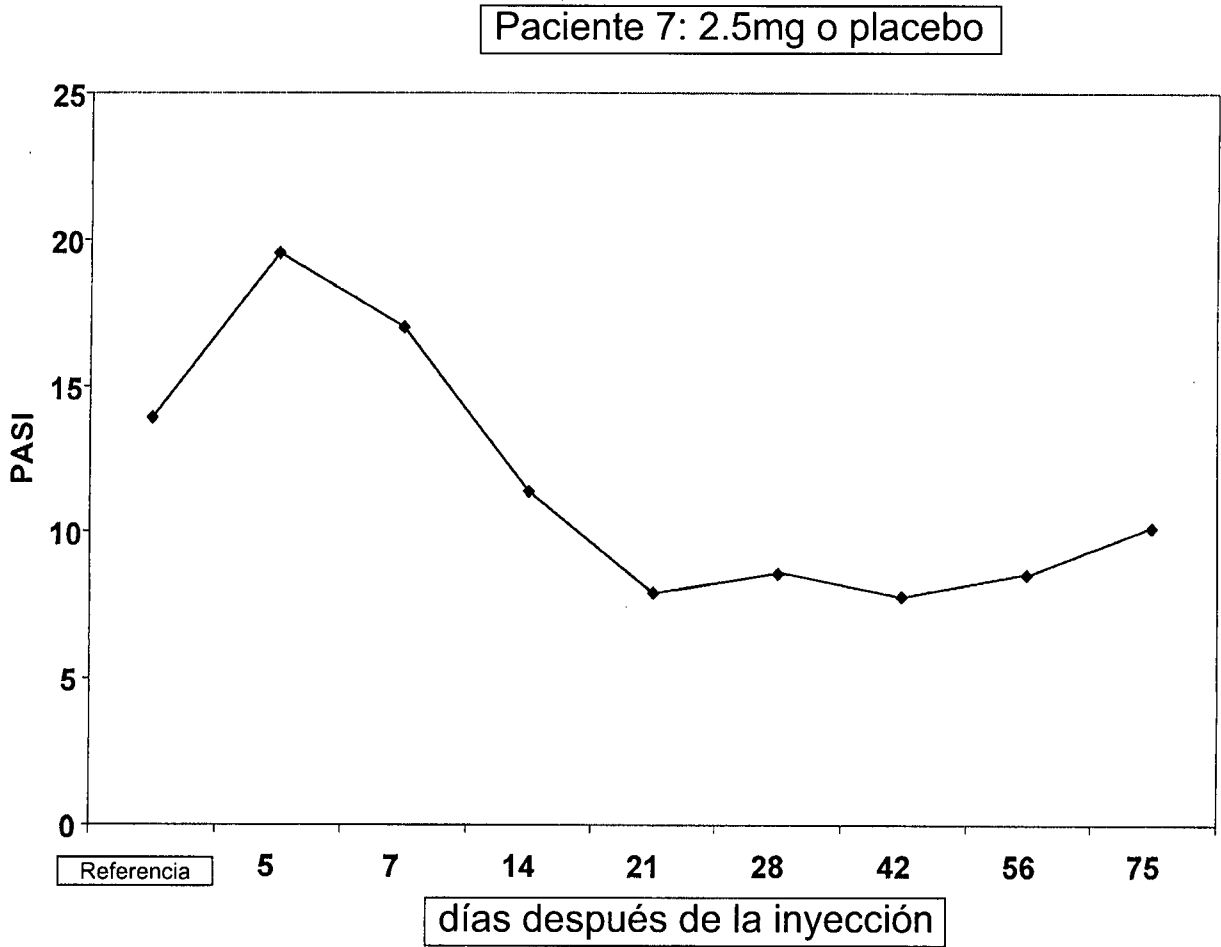


FIG 9G

287

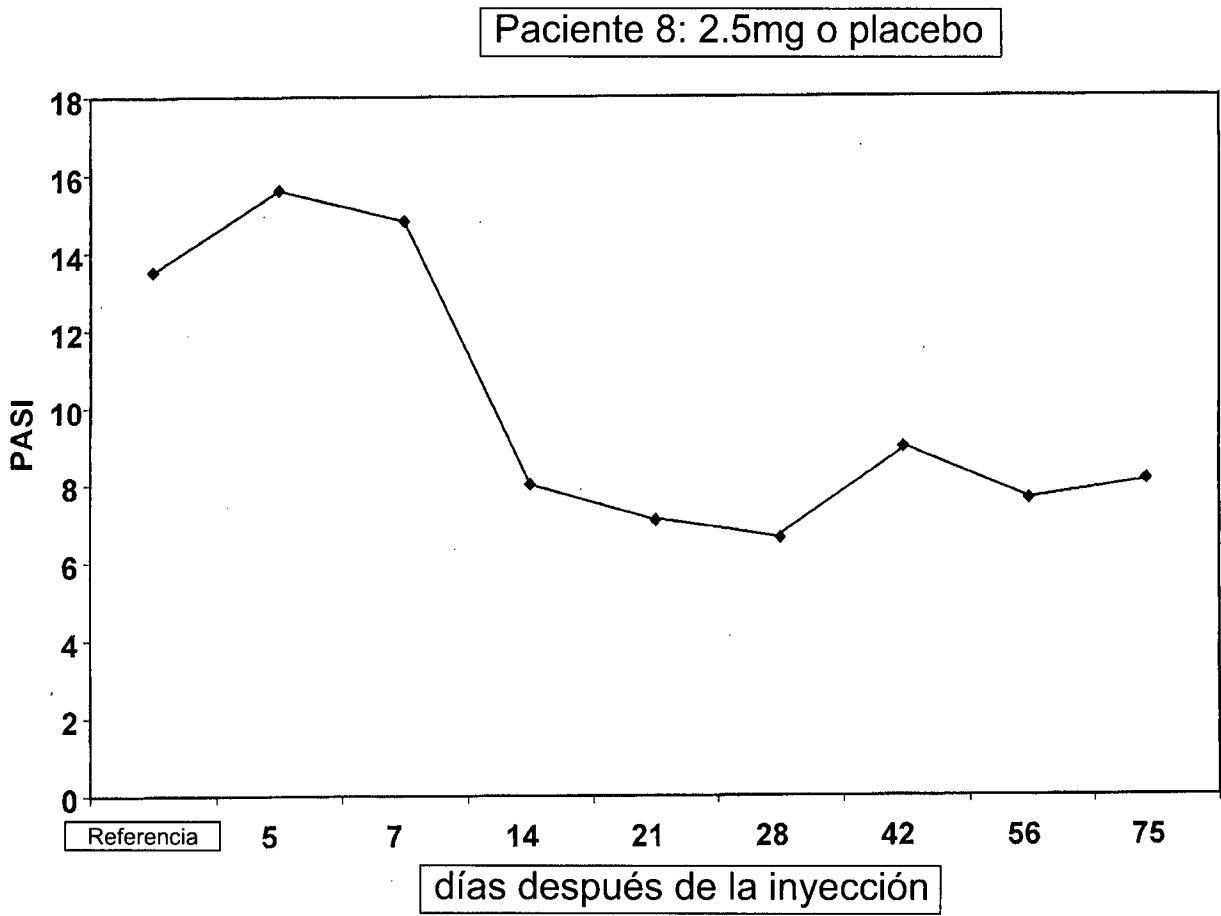


FIG 9H

238



**FIG. 10B**

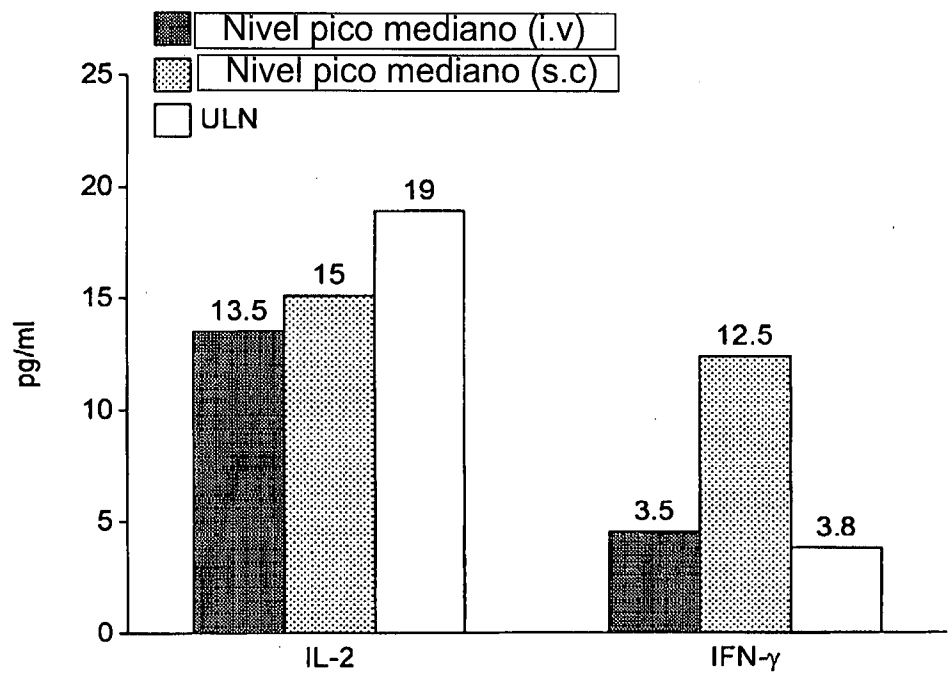


FIG. 11

0/2

26 / 37

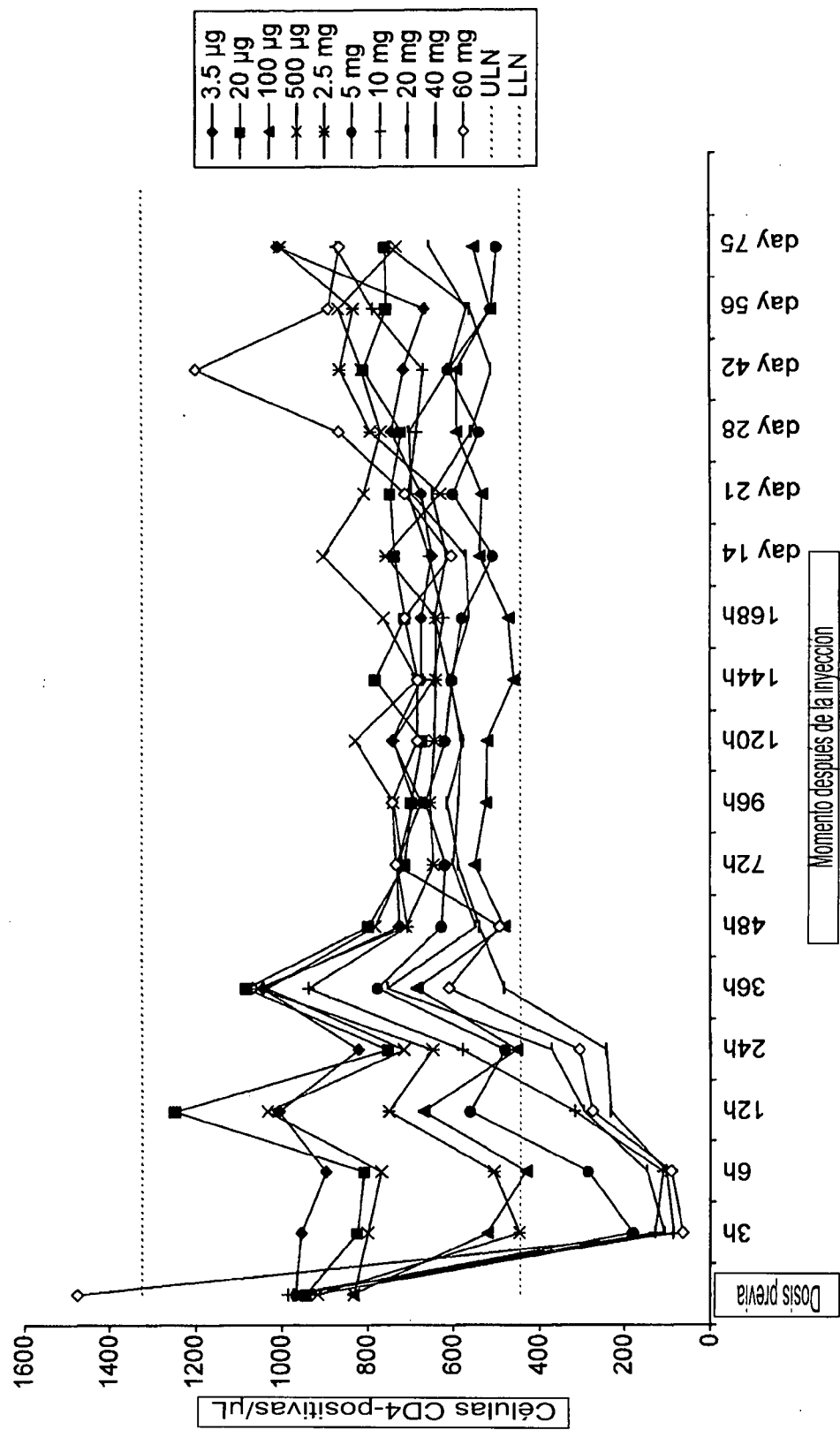


FIG. 12

2/11

27 / 37

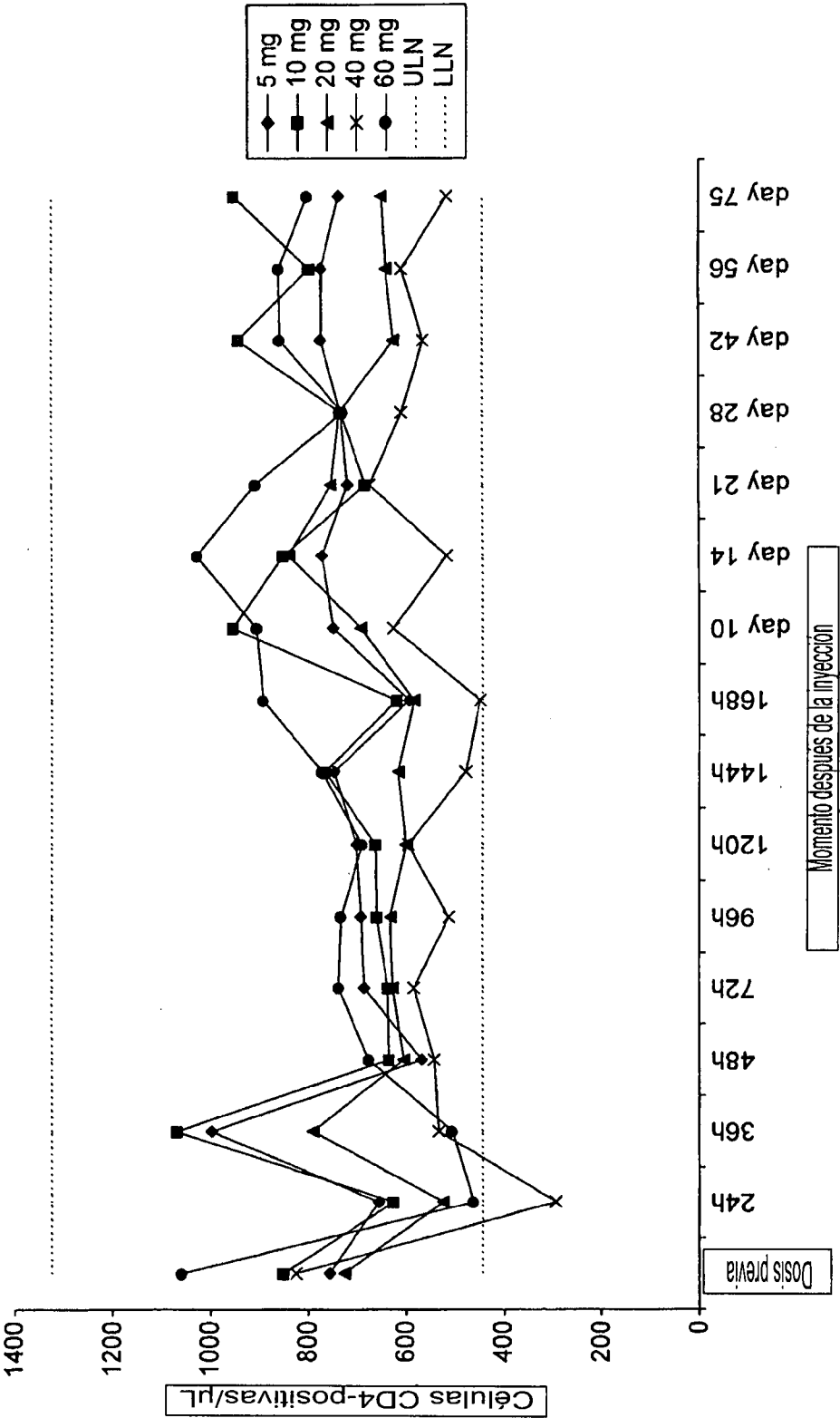


FIG. 13

28/37



Área de marcada  
desfacelación

Área de  
marcado  
eritema

Área de marcada  
desfacelación

FIGURA 14A

243

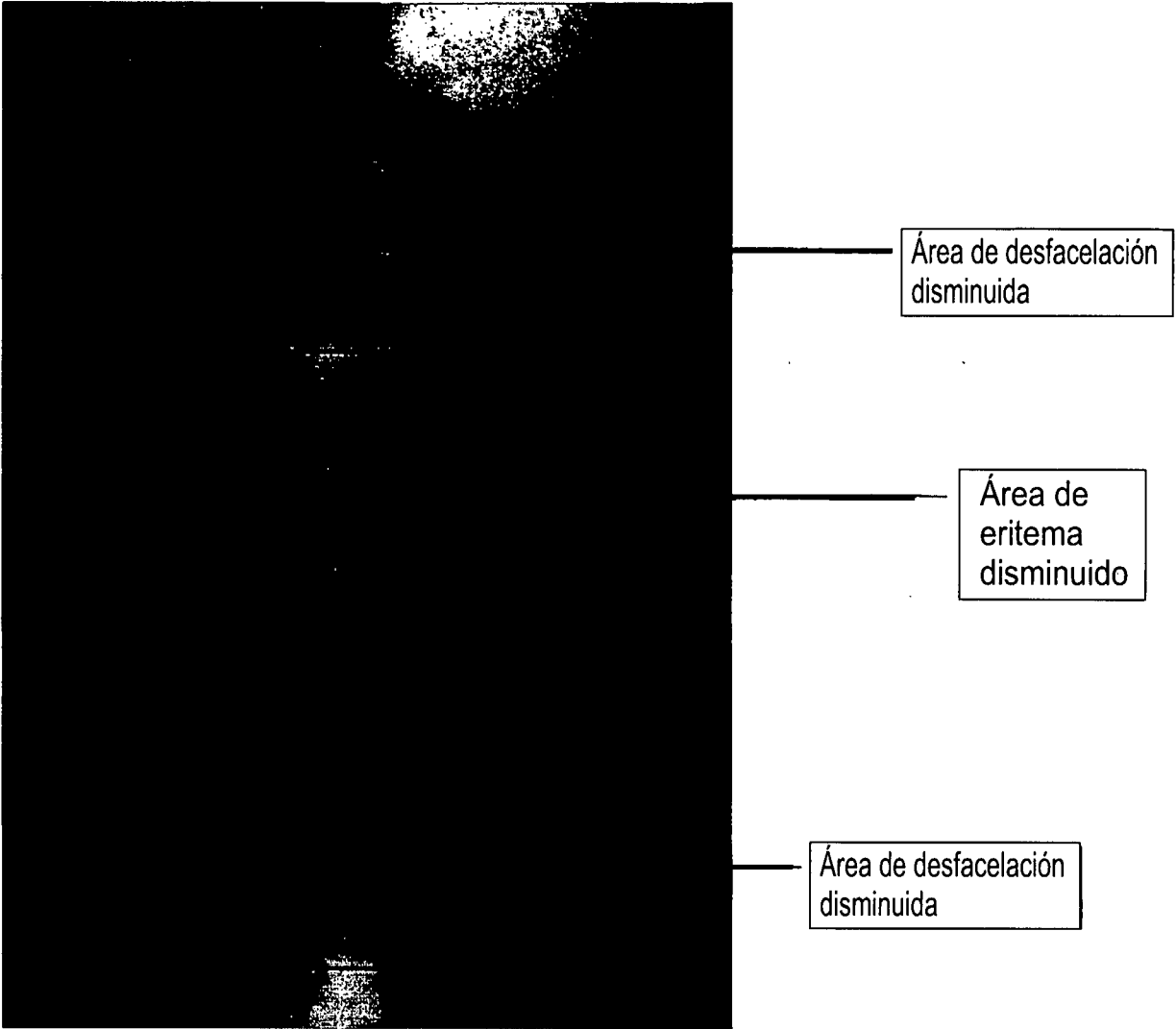


FIGURA 14B

244

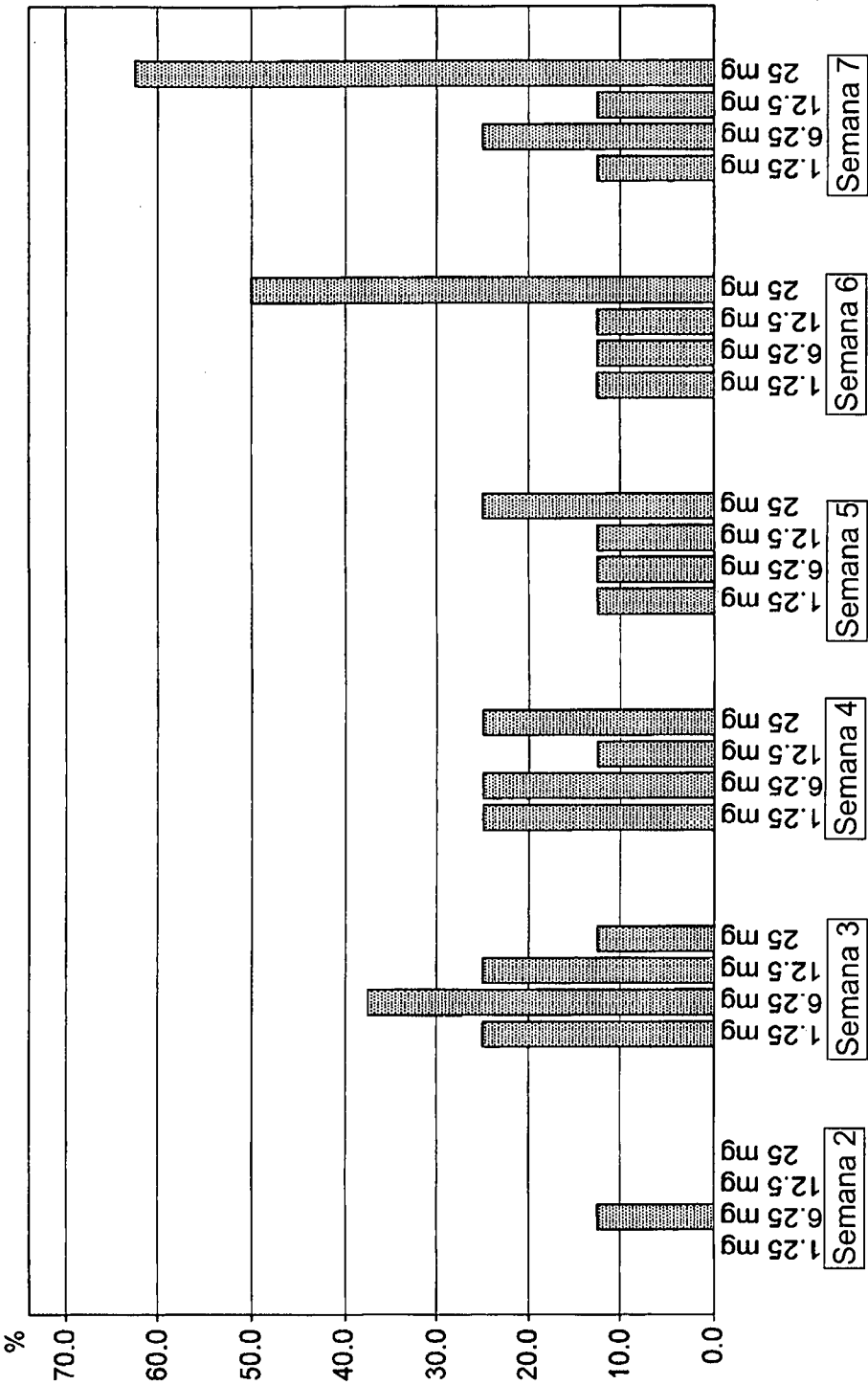


FIG. 15

245

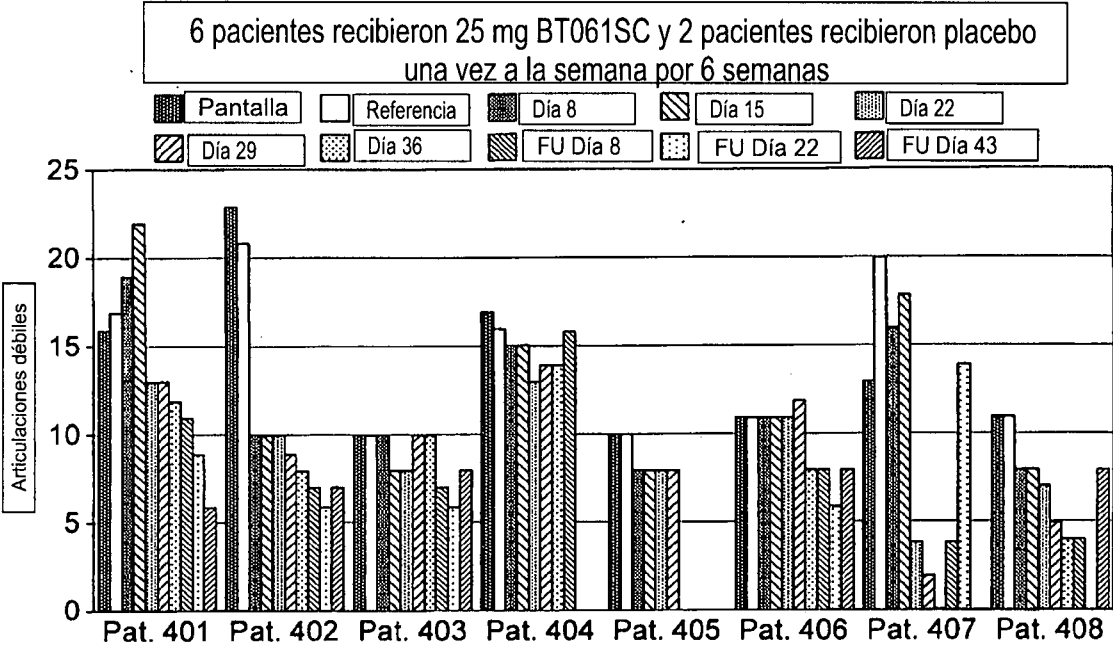


FIG. 16A

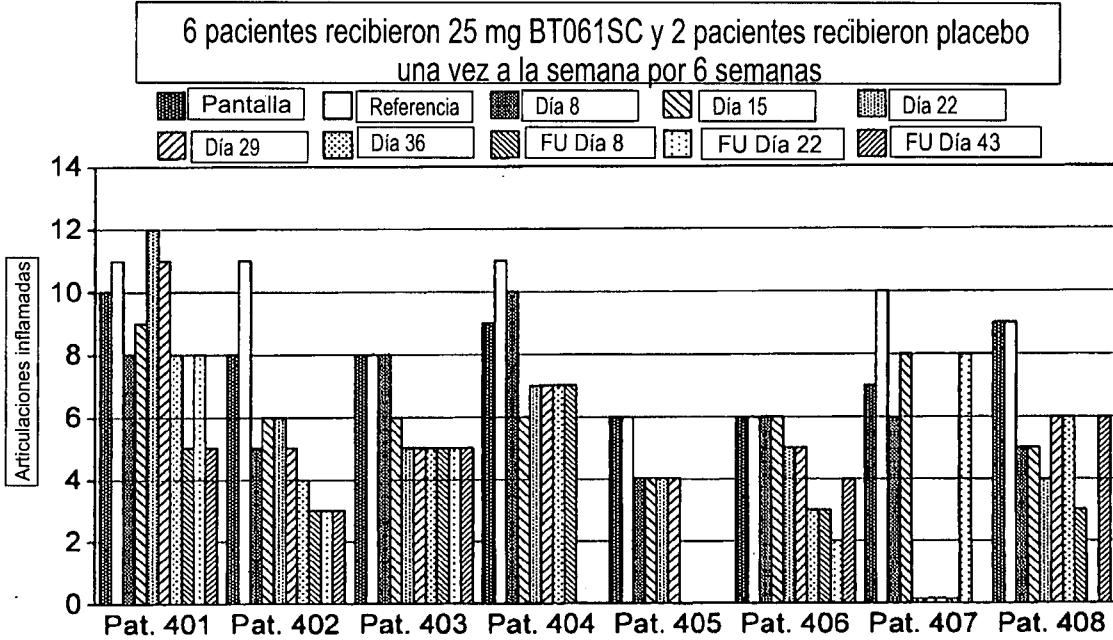


FIG. 16B

246

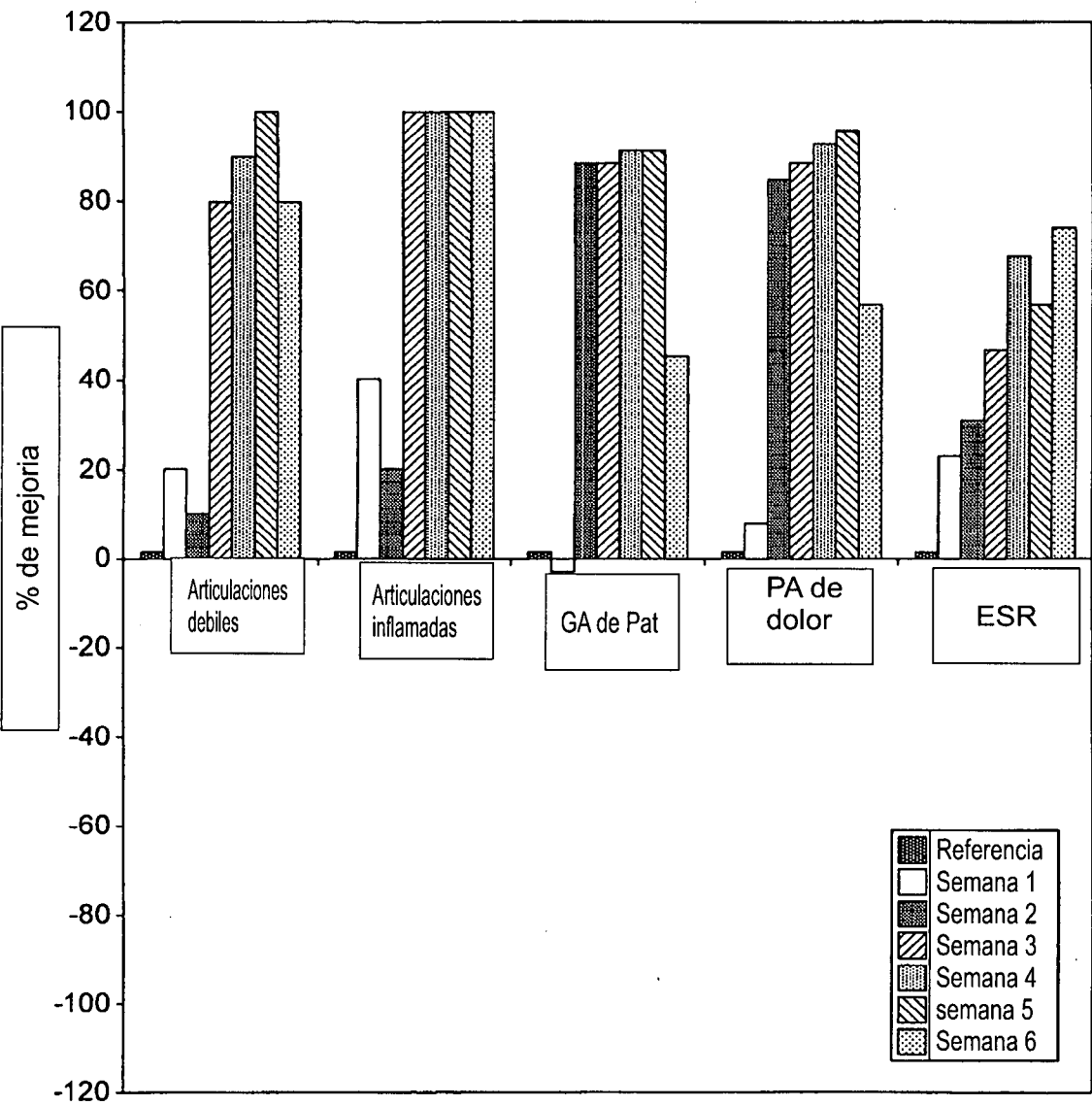


FIG. 17A

247

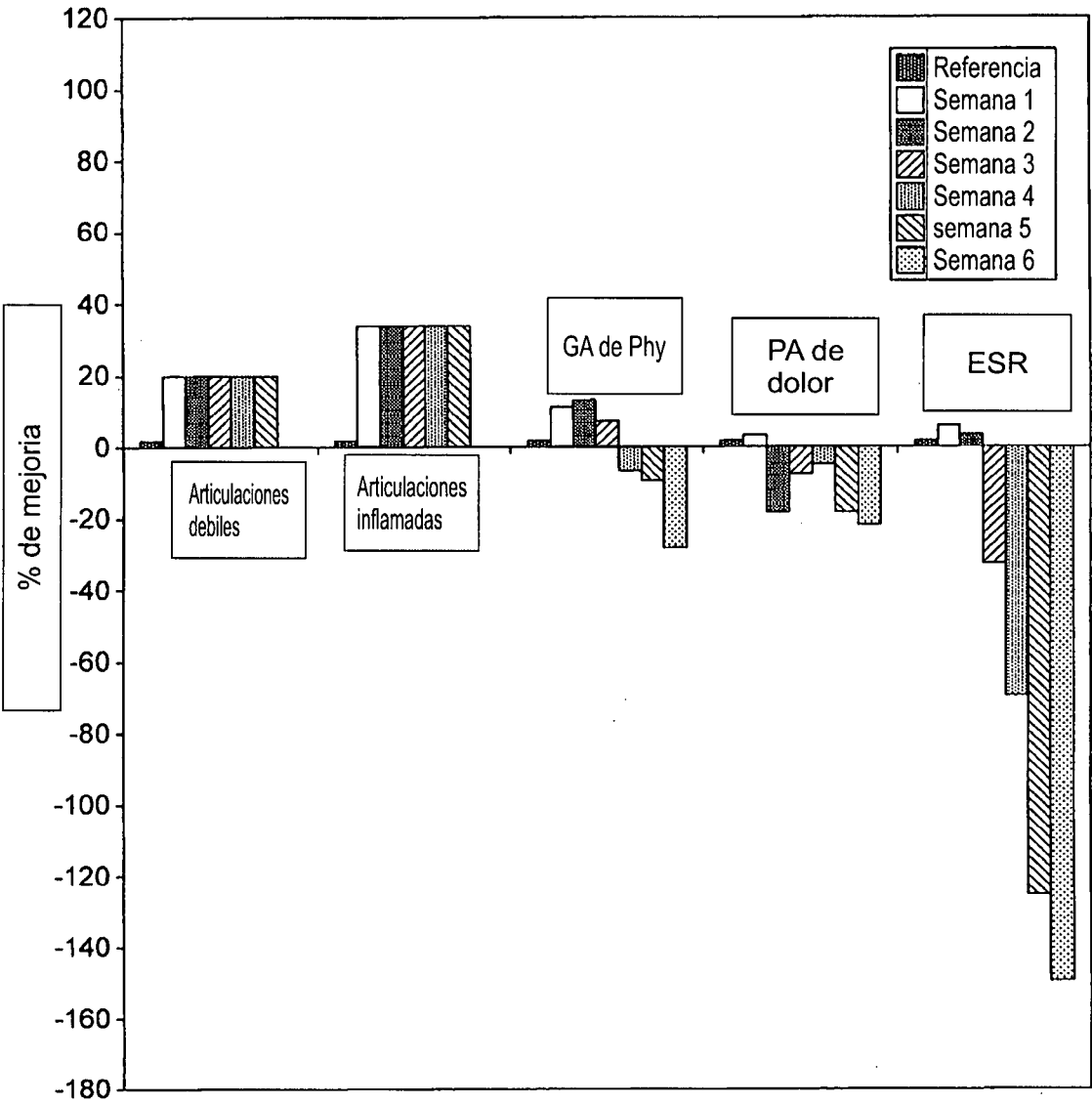


FIG. 17B

248

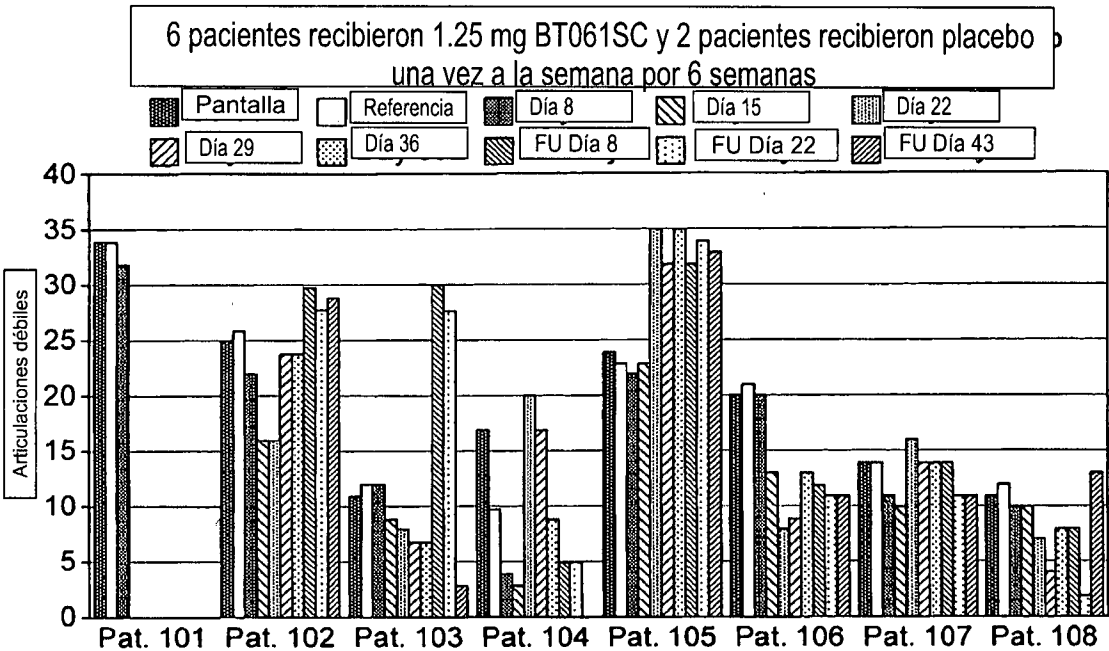


FIG. 18A

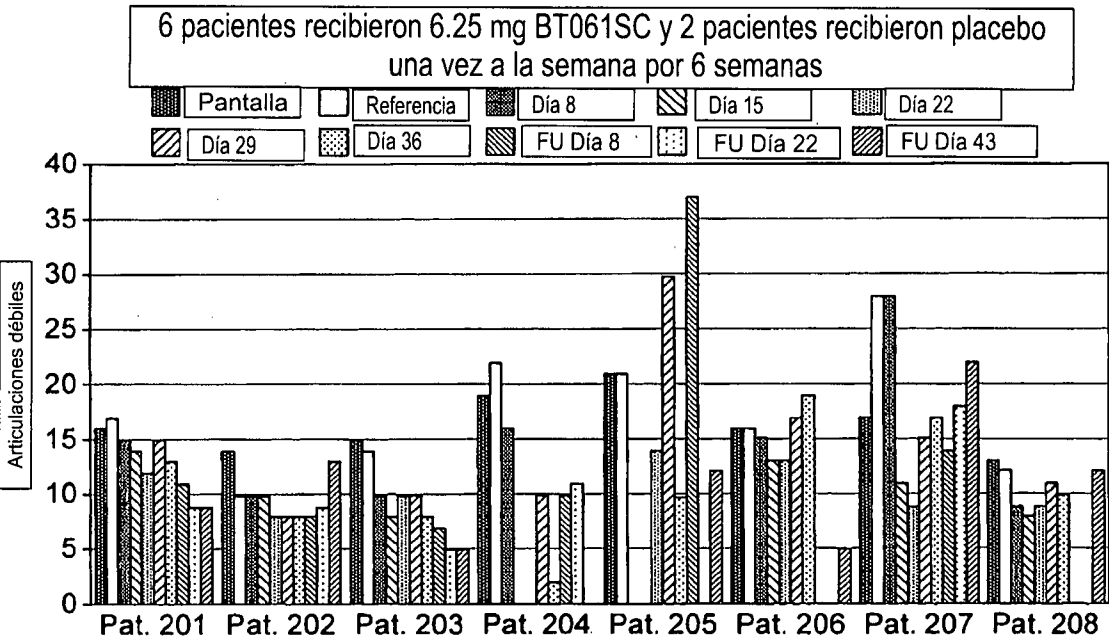
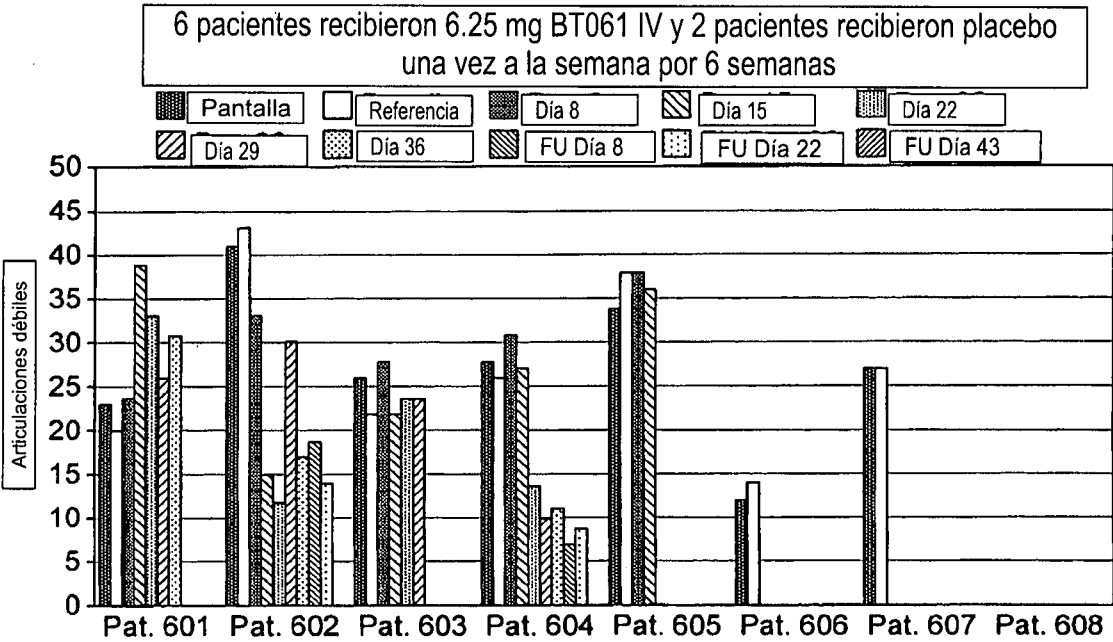
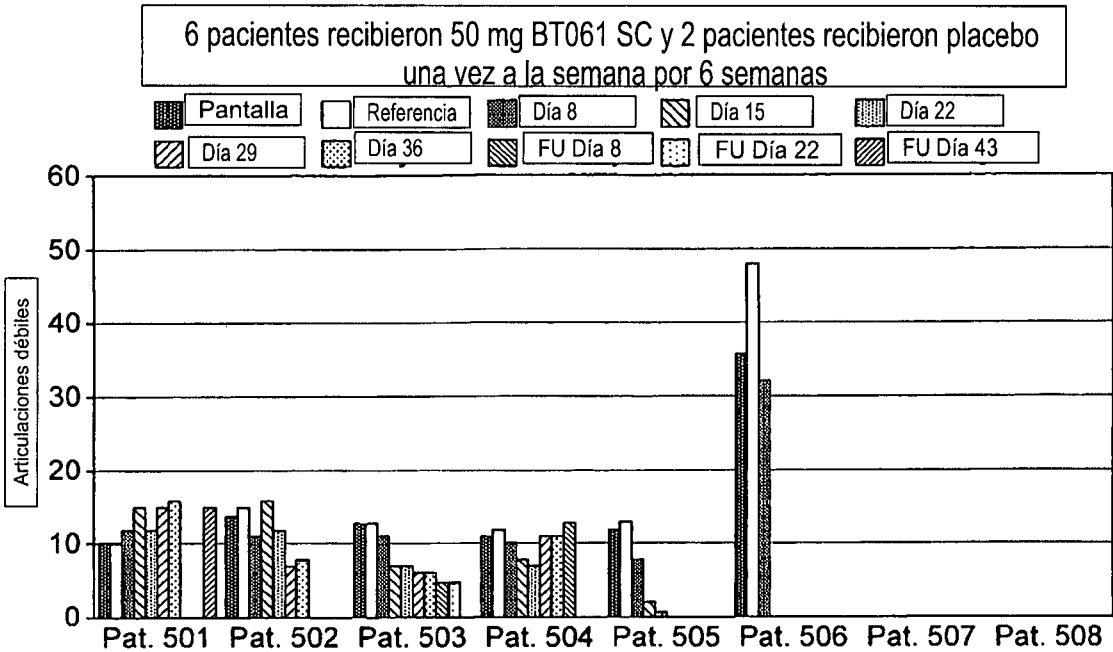


FIG. 18B



250

|          |                                                         |                  |                   |   |     |  |
|----------|---------------------------------------------------------|------------------|-------------------|---|-----|--|
|          | FR1                                                     |                  | CDR1              |   | FR2 |  |
|          | 1                                                       | 2                | 3                 | 4 |     |  |
|          | 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                 | 8 |     |  |
|          | 0123456 78901234567890123456789012345678                |                  |                   |   |     |  |
| mB-F5    | LASILES                                                 | GVPCRFSGSGSGTDF  | TLNIHPVEEEDAATYYC |   |     |  |
| hB-F5L4M | LASILES                                                 | GVPDFRFSGSGSGTDF | TLTISSLQAEDVAVYYC |   |     |  |
| hB-F5L4L | -----                                                   | -----            | -----             |   |     |  |
| FK-001   |                                                         | GVPDFRFSGSGSGTDF | TLTISSLQAEDVAVYYC |   |     |  |
|          |                                                         |                  |                   |   |     |  |
|          | CDR3                                                    |                  | FR4               |   |     |  |
|          | 9                                                       | 10               |                   |   |     |  |
|          | 901234567 8901234567                                    |                  |                   |   |     |  |
| mB-F5    | QHSRELPWT                                               | FGGGTKLEIK       |                   |   |     |  |
| hB-F5L4M | QHSRELPWT                                               | FGQGTKVEIK       |                   |   |     |  |
| hB-F5L4L | -----                                                   | -----            |                   |   |     |  |
| FK-001   |                                                         | FGQGTKVEIK       |                   |   |     |  |

FIG. 20

FIG. 21

215  
252

## LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; Biotest AG

&lt;120&gt; AGENTE PARA TRATAR ENFERMEDAD

5 &lt;130&gt; 314788.WO/JND/CJS

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 124

10 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; dominio V de cadena H de anticuerpo humanizado hB-F5H37L

&lt;400&gt; 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

216  
253

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 K 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

217  
254

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 ctcactcttc tgcccgtgct  
 gggcctccca 60  
 15 tggggtcagt gtcagggaga tgccgtattc acagcagcat tcacagactg  
 aggggtgttt 120  
 cactttgctg tttccttttg tctccagggtg tcctgtcaga ggaacagctt  
 gtggagtctg 180  
 ggggaggctt ggtgaaaccc ggagggtctc tgaggctctc 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  
 gggcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca  
 30 ggtaagaatg 540  
 gccaaagcttg

550

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 498

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

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

10 &lt;400&gt; 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 tcagttacatc

tggctacagt 240

tatatatatt ggtaccagca gaaaccagga cagcctccta agctgctcat

20 ttaccttgca 300

tccatcctag aatctgggggt ccctgaccga ttcagtggca gcgggtctgg

gacagatttc 360

actctcacca tcagcagcct gcaggctgaa gatgtggcag tttattactg

tcagcacagt 420

25 agggaaacttc cgtggacgtt cggccaaggg accaaggtgg aaatcaaacg

tgagtagaat 480

ttaaatttta agcttctt

498

30 &lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 372

219  
256

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 5

|    |             |            |             |            |            |
|----|-------------|------------|-------------|------------|------------|
|    | caggaatacc  | ttgtggagac | cgggggaggc  | ttggtgaggc | ctggaaattc |
| 5  | tctgaaactc  | 60         |             |            |            |
|    | tcctgtgtca  | cctcgggttt | cagtttcagt  | gactgccgga | tgtactggct |
|    | tcgccagcct  | 120        |             |            |            |
|    | ccaggggaagg | ggctggagtg | gattgggtgtg | atttcagtca | aatctgagaa |
|    | ttatggagca  | 180        |             |            |            |
| 10 | aattatgcag  | agtctgtgag | gggcagattc  | actatttcaa | gagatgattc |
|    | aaaaagcagt  | 240        |             |            |            |
|    | gtctatctgc  | agatgagcag | attgagagag  | gaagacactg | ccacttatta |
|    | ttgtagtgcc  | 300        |             |            |            |
|    | tcctattata  | ggtacgacgt | gggggcctgg  | tttgcttact | ggggccaagg |
| 15 | gactctggtc  | 360        |             |            |            |
|    | actgtctctg  |            |             |            | ca         |
|    | 372         |            |             |            |            |

&lt;210&gt; 6

20 &lt;211&gt; 383

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

|    |            |            |            |            |            |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|
|    | gacattgtgc | tgacacagtc | tccttcttcc | ttagttgtat | ctctggggca |
| 25 | gagggccacc | 60         |            |            |            |
|    | atctcatgca | gggccagcaa | aagtgtcagt | acatctggct | acagttatat |
|    | atattggtac | 120        |            |            |            |
|    | caacagatcc | caggacagcc | acccaaactc | ctcatctatc | ttgcatccat |
|    | cctagaatct | 180        |            |            |            |
| 30 | ggggtccttg | gcaggttcag | tggcagtggg | tctgggacag | acttcaccct |
|    | caacatccat | 240        |            |            |            |

229  
257

cctgtggagg    aggaggatgc    tgcaacctat    tactgtcagc    acagtaggga

acttccgtgg    300

acgttcggtg    gaggcaccaa    gctggagatc    aaacgggctg    atgctgcacc

aactgtatcc    360

5    atcttcccac    catccagtga    gca

383

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 124

10    &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 7

Gln Glu Tyr Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Asn

1                      5                      10                      15

15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys

20                      25                      30

Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

20                      35                      40                      45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu

50                      55                      60

25    Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65                      70                      75                      80

Val Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

85                      90                      95

30

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala

22  
258

100

105

110

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

115

120

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

10

&lt;400&gt; 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

222  
259

<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

223  
259

<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

224  
260

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 la 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  
30 35 40 45

2285  
261

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

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
5 65 70 75 80

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

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

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

15

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> dominio V de 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  
30 35 40 45

226  
262

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

5

65

70

75

80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85

90

95

10

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/052809

## 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

## 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 A1 (BIOTEST AG [DE])<br>22 September 2004 (2004-09-22)<br>cited in the application<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                 | 1-57                     |
| X         | RACADOT E ET AL: "IMMUNOLOGICAL FOLLOW-UP<br>OF 17 PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS<br>TREATED IN VIVO WITH AN ANTI-T CD4+<br>MONOCLONAL ANTIBODY (B-F5)"<br>CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY,<br>PACINI, PISA, IT,<br>vol. 10, no. 4,<br>1 January 1992 (1992-01-01), pages<br>365-374, XP008022443<br>ISSN: 0392-856X<br>the whole document | 1-13,<br>17-49,<br>51-57 |

☒ 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

8 July 2009

Date of mailing of the international search report

14/07/2009

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/EP2009/052809

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                                                         | 1-13,<br>17-49,<br>51-57 |
| 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                                                            | 1-13,<br>18-49,<br>52-57 |
| 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, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 1139-1146, XP002532991 cited in the application the whole document | 1-13,<br>17-49,<br>51-57 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/052809

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 1460088                                | A1                  | 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          |

16. Una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 15, 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.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 78,453  
FECHA : SEPTIEMBRE 20 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127114-00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:09:33  
Tra. 11 PATENTEIYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONALI  
Folios: 272

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 156798832 | 20/09/2010 | 42,239,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                       | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|--------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-03 | CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA |                |
|       |             | 12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES  | 114,000.00     |
|       |             | TOTAL :                        | \$ 114,000.00  |

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO:05099- 841-001-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

232  
268

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 78,455  
FECHA : SEPTIEMBRE 20 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127114-00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:09:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 272

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754397 | 156798832 | 20/09/2010 | 42,239,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                             | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|--------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                          |                |
|       |             | 92 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU | 155,000.00     |
|       |             | TOTAL :                              | \$ 155,000.00  |

SON: CIENTO CINCUENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO:05099-841-COL-8.

233  
269

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 80,848  
FECHA : SEPTIEMBRE 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
No. 10-127114- -00000-0000  
Fecha: 2010-10-13 12:09:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 272

\*\*\*\*\* 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 | 20,000.00      |
|       |             | TOTAL :                            | \$ 20,000.00   |

SDN: VEINTE 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: 05099-841-001-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,129  
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127114- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:09:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 272

\*\*\*\*\* 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 | *** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL | 26,000.00      |
|       |                         | TOTAL :                               | \$ 26,000.00   |

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO: 05099-84-001-8.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,194  
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127114- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:09:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 272

\*\*\*\*\* 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: 05099-841-001-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,211  
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-127114- -00000-0000

Fecha: 2010-10-13 12:09:33  
Tra. 11 PATENTEIYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONALI  
Folios: 272

\*\*\*\*\* 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<br>*** 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: 050099-841-001-8

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- |                                     |                                                                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Descripción de la invención                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/>   | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- |                                     |                                                                                                                         |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input type="checkbox"/>   | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- |                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño Industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- |                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |



Bogotá D.C.,  
2020

Doctor(a)  
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
BIOTEST AG

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 10 127114         |
|            | Solicitud internacional    | PCT/EP2009/052809 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 13/10/2010        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | <b>14367</b>      |

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.

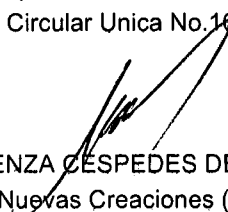
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 127114



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 CESPEDES DE VERGEL  
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha \_\_\_\_\_  
adpa11

05 NOV. 2010