Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

| | | | |
|---|---|---|---|
| Radicación | 13 286019 0000 0000 | 2013-12-05 16:11:35 | |
| Trámite | 11 | PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II | |
| Evento | 378 | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I | |
| Actuación | 411 | PRESENTACION | Folios: 88 |
| Dependencia | 2020 | DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES | |
| Pago #1 | 125812 | $ 475000 | |

# DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
# SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

| 1 | **Titulo de la Invención** (200 caractares o espacios máximos) |
|---|---|
| | INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA UTILIZANDO METOTREXATO |

| 2 | **Datos del Solicitante / Titular** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Nombre:** | GENZYME CORPORATION | **Dirección Electrónica:** | sic@castellanosyco.co |
| | **Dirección:** | 500 KENDALL STREET, CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02141, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA | **Domicilio/País de constitución:** | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - MASSACHUSETTS - CAMBRIDGE |

**Identificación:**

| | |
|---|---|
| ☐ CEDULA DE CIUDADANIA | ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA |
| ☒ EMPRESA EXTRANJERA | ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL |
| ☐ NIT | ☐ PASAPORTE |

**Número:** 2213541324-

| 3 | **Solicitantes** | | |
|---|---|---|---|
| | **Apellidos - Nombres o Razón Social** | **Tipo** | **Identificación** |
| 1. | GENZYME CORPORATION | EE | 2213541324 |

| 4 | **Datos del Inventor** |
|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Nombre:** | ALEXANDRA JOSEPH | **Dirección Electrónica:** | sic@castellanosyco.co |
| **Dirección:** | 2 BERWICK ROAD, LEXINGTON, MASSACHUSETTS 02420, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA | **Domicilio/País de constitución:** | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - MASSACHUSETTS - LEXINGTON |

**Identificación:**

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL
☐ NIT ☐ PASAPORTE
☒ No Aplica

**Número:** -

| **5** | **Inventor(es)** |
|---|---|

| | **Apellidos - Nombres** | **Domicilio** |
|---|---|---|
| 1. | JOSEPH ALEXANDRA | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA |
| 2. | RICHARDS SUSAN | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA |
| 3. | RUZEK MELANIE | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA |
| 4. | GARMAN RICHARD | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA |

| **6** | **Datos Inventor(es)** |
|---|---|

| | **País de Residencia** | **Departamento/Estado** | **Ciudad** | **Dirección** |
|---|---|---|---|---|
| 1. | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA | MASSACHUSETTS | LEXINGTON | 2 BERWICK ROAD, LEXINGTON, MASSACHUSETTS 02420, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2. | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA | MASSACHUSETTS | SUDBURY | 44 CODMAN DRIVE, SUDBURY, MASSACHUSETTS 01776, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |
| 3. | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA | MASSACHUSETTS | ACTON | 3 MADDY LANE, ACTON, MASSACHUSETTS 01720, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |
| 4. | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA | MASSACHUSETTS | NATICK | 1 JOSHUA PATH, NATICK, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |

| **7** | **Datos del Representante Legal / Apoderado** | | |
|---|---|---|---|
| **Nombre:** | MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO | **Dirección Electrónica:** | sic@castellanosyco.co |
| **Dirección:** | CALLE 94A No. 7A-09 | **Domicilio/País de constitución:** | COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C. |

**Identificación:**

☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL
☐ NIT ☐ PASAPORTE

**Número:** 39779654-

**Presentación de Poder**

| | |
|---|---|
| Año de Radicación | |
| Número de Radicación | |

| **8** | **Datos Solicitud: PCT / WO** | | |
|---|---|---|---|
| **Número Solicitud:** | PCT/US2012/036405 | **Fecha Solicitud:** | 03/05/2012 |
| **Número Publicacion:** | WO 2012/158362 A1 | **Fecha Publicacion:** | 22/11/2012 |

| **9** | **Declaraciones de prioridad** | ☒ SI ☐ NO |
|---|---|---|

| **(33) País de origen** | **Codigo del país** | **(31) No. Solicitud** | **(32) Fecha** _ |
|---|---|---|---|

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA | US | 61/486,697 | 16/05/2011 |

| **10** | **Reivindicaciones** | | |
|---|---|---|---|
| **Número reivindicaciones:** | 53 | **Pago Reivindicaciones:** | No |

**11 Reducción de tasas.**

*Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.*

☐ SI ☒ NO

**Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.**

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

**Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos**

**12 Documentos Anexos**

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☐ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional
☐ Listado de secuencias
☐ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos

## REIVINDICACIONES

1.- Un método para inducir tolerancia inmunológica en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo, induciendo con ello una tolerancia inmunológica hacia el producto terapéutico en el sujeto.

2.- Un método para inhibir las respuestas de anticuerpos a un producto terapéutico de proteínas en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo, inhibiendo con ello las respuestas de anticuerpos contra el producto terapéutico en el sujeto.

3.- Un método para aliviar una reacción de infusión contra un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aliviando con ello una reacción de infusión contra el producto terapéutico en el sujeto.

4.- Un método para reducir la autoinmunidad secundaria en un sujeto autoinmune que necesita tratamiento con un producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, reduciendo con ello la autoinmunidad secundaria en el sujeto.

5.- Un método para aumentar la eficacia de un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello la eficacia del producto terapéutico de proteínas en el sujeto.

6.- Un método para aumentar el porcentaje de células T reguladoras en la población de células T en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello dicho porcentaje en dicho sujeto.

7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de proteínas.

8.- Un método para aumentar el porcentaje de células B reguladoras en la

población de células B en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico de anticuerpos, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello dicho porcentaje en dicho sujeto.

9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

10.- Un método para prolongar la farmacocinética de un agente treapéutico en un sujeto, que comprende administrar metotrexato al sujeto, antes, durante o después de la administración del agente terapéutico, en una cantidad eficaz para prolongar la farmacocinética del agente terapéutico.

11.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el sujeto es un ser humano.

12.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de anticuerpos.

13.- El método de la reivindicación 12, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales.

14.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un agente de disminución de linfocitos.

15.- El método de la reivindicación 14, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es alemtuzumab.

16.- El método de la reivindicación 15, en el que el sujeto es un paciente con esclerosis múltiple.

17.- El método de la reivindicación 12, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos policlonales.

18.- El método de la reivindicación 17, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un anticuerpo de globulina anti-timocitos de conejo policlonal.

19.- El método de la reivindicación 18, en el que el sujeto es un paciente humano que necesita un transplante de órganos, tiene anemia aplásica y/o presenta o está en riesgo de presentar la enfermedad del injerto frente al receptor.

20.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el

producto terapéutico es una enzima.

21.- El método de la reivindicación 21, en el que la enzima es alfa-galactosidasa A humana.

22.- El método de la reivindicación 22, en el que la enzima es alfa-glucosidasa ácida humana.

23.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que la cantidad eficaz es de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg.

24.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el único ciclo de metotrexato consiste en 1 día de administración de metotrexato, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 días consecutivos de administración de metotrexato.

25.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el único ciclo de metotrexato se administra entre 48 horas antes y 48 horas después del inicio del tratamiento terapéutico.

26.- Un método para disminuir el número de linfocitos en un paciente humano que lo necesite, que comprende:

tratar al paciente con un agente de disminución de linfocitos, y

administrar metotrexato al paciente, antes, durante o después del tratamiento con el agente de disminución de linfocitos, en una cantidad eficaz para inducir una tolerancia inmunológica en el paciente hacia el agente de disminución de linfocitos.

27.- El método de la reivindicación 26, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

28.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, en el que el agente de disminución de linfocitos es un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales.

29.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, en el que el agente de disminución de linfocitos es un producto terapéutico de anticuerpos policlonales.

30.- El método de la reivindicación 28, en el que el producto terapéutico de

anticuerpos monoclonales es alemtuzumab.

31.- El método de la reivindicación 28, en el que el producto terapéutico de anticuerpos monoclonales es rituximab.

32.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-31, en el que el paciente es un paciente con esclerosis múltiple.

33.- El método de la reivindicación 32, en el que el paciente tiene esclerosis múltiple en remisión-recaída.

34.- El método de la reivindicación 29, en el que el producto terapéutico de anticuerpos policlonales es un anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos.

35.- Un método para inducir tolerancia inmunológica en un sujeto que necesita un transplante de tejidos, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, induciendo con ello una tolerancia inmunológica hacia el tejido transplantado en el sujeto.

36.- El método de la reivindicación 35, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

37.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 o 36, en el que el tejido transplantado es tejido renal o tejido cardíaco.

38.- El método de la reivindicación 37, en el que el sujeto también recibe un agente para la inmunomodulación.

39.- El método de la reivindicación 38, en el que el agente para la inmunomodulación es un inmunosupresor.

40.- El método de la reivindicación 38, en el que el agente para la inmunomodulación es un anticuerpo de globulina anti-timocitos policlonal.

41.- Un método para inhibir las respuestas de células T en un sujeto que necesita un producto terapéutico o un transplante de tejidos, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato antes, al mismo tiempo o después de tratar al sujeto con el producto terapéutico o del transplante de tejidos, inhibiendo con ello las respuestas de células T en el sujeto.

42.- El método de la reivindicación 41, en el que la cantidad eficaz de metotrexato

se administra en un único ciclo.

43.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 o 42, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de proteínas.

44.- El método de la reivindicación 43, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de anticuerpos.

45.- El método de la reivindicación 44, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales.

46.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 44 o 45, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un agente de disminución de linfocitos.

47.- El método de la reivindicación 46, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es alemtuzumab.

48.- El método de la reivindicación 47, en el que el sujeto es un paciente con esclerosis múltiple.

49.- El método de la reivindicación 44, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos policlonales.

50.- El método de la reivindicación 49, en el que el producto terapéutico de anticuerpos policlonales es un anticuerpo de globulina anti-timocitos de conejo policlonal.

51.- El método de la reivindicación 43, en el que el tejido transplantado es tejido renal o tejido cardíaco.

52.- El método de la reivindicación 51, en el que el sujeto también recibe otro agente para la inmunomodulación.

53.- El método de la reivindicación 52, en el que el agente para la inmunomodulación es un inmunosupresor.

FIG. 1A

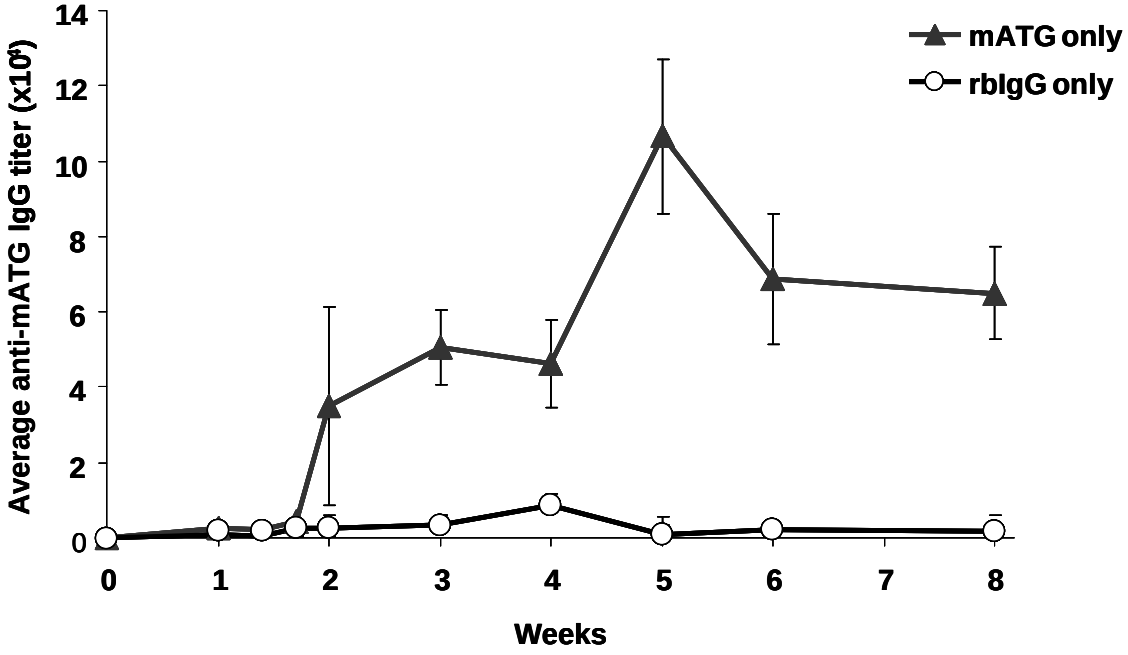

mATG only
rbIgG only
Average anti-mATG IgG titer (x10⁴)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Weeks

FIG. 1B

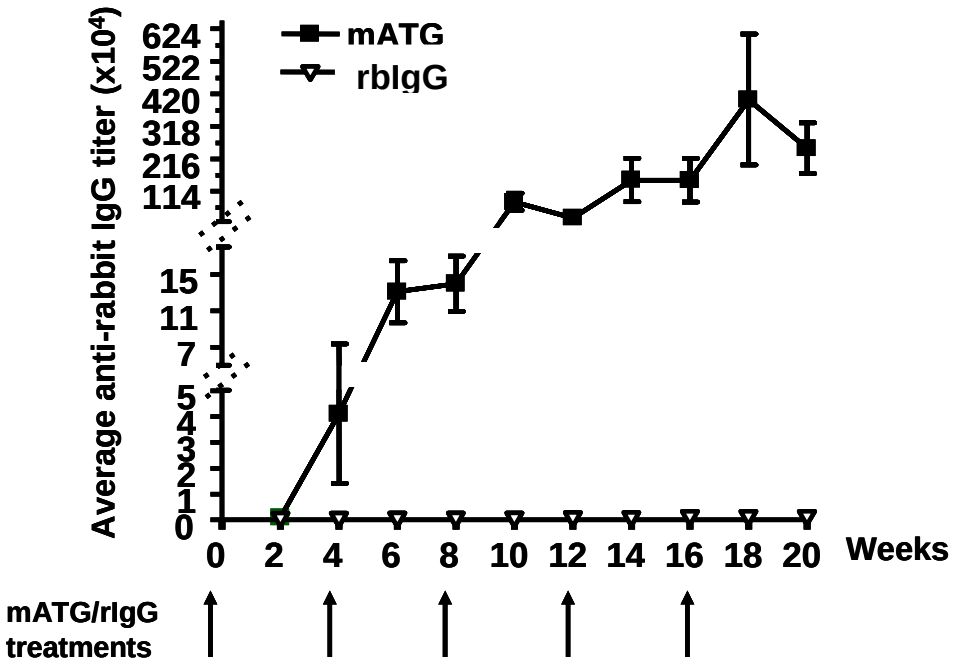

mATG
rbIgG
Average anti-rabbit IgG titer (x10⁴)
624
522
420
318
216
114
15
11
7
5
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Weeks
mATG/rIgG
treatments

FIG. 2

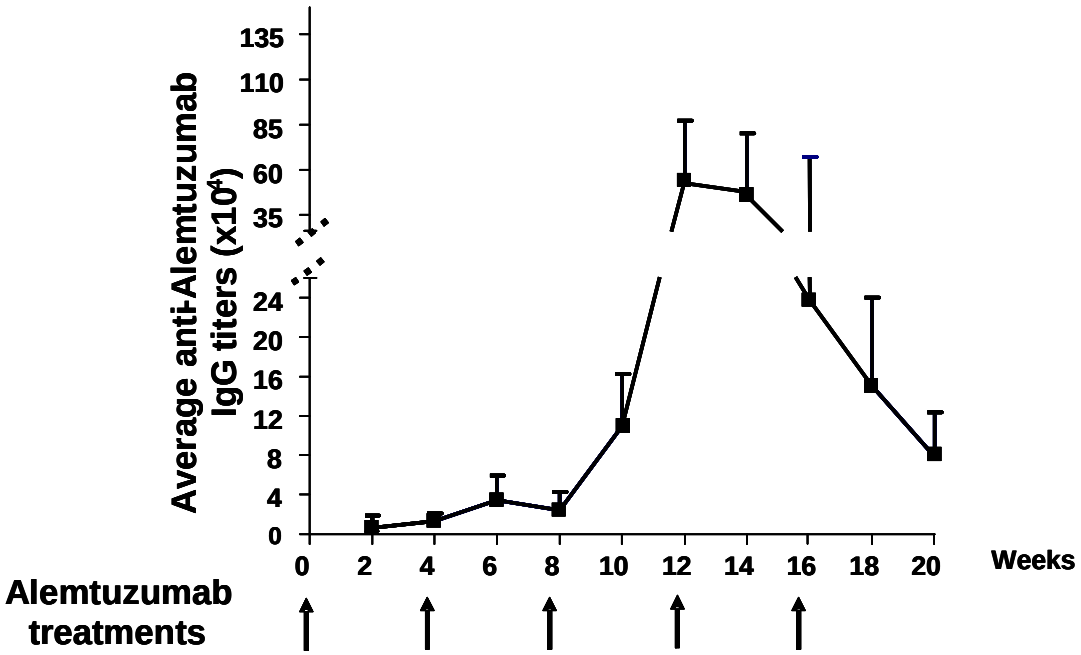

Average anti-Alemtuzumab IgG titers (x10⁴)
135
110
85
60
35
24
20
16
12
8
4
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Weeks
Alemtuzumab treatments

**FIG 3**

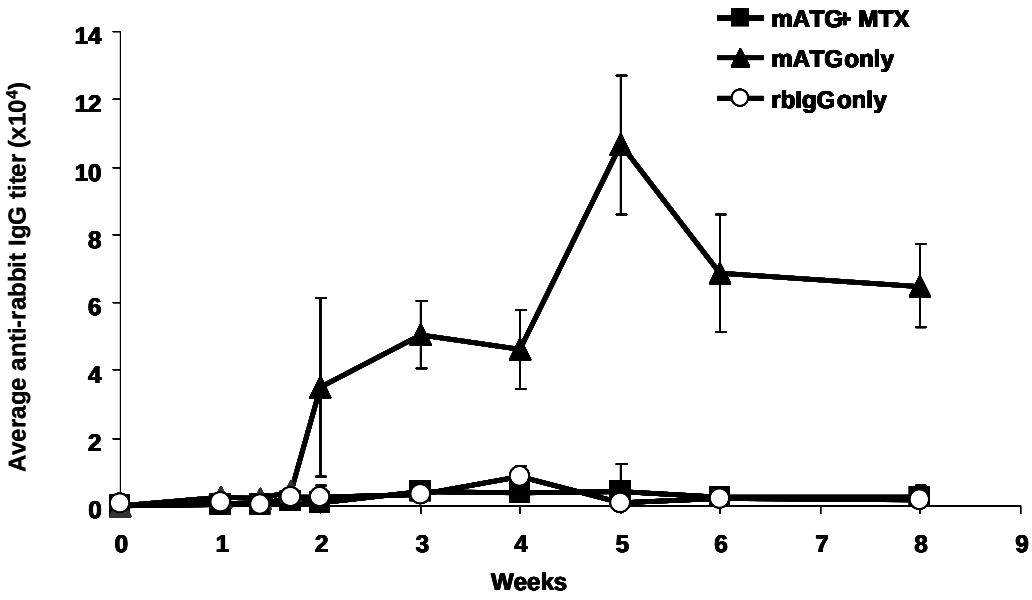

mATG+ MTX
mATGonly
rbIgGonly
Average anti-rabbit IgG titer (x10⁴)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Weeks

FIG. 4A

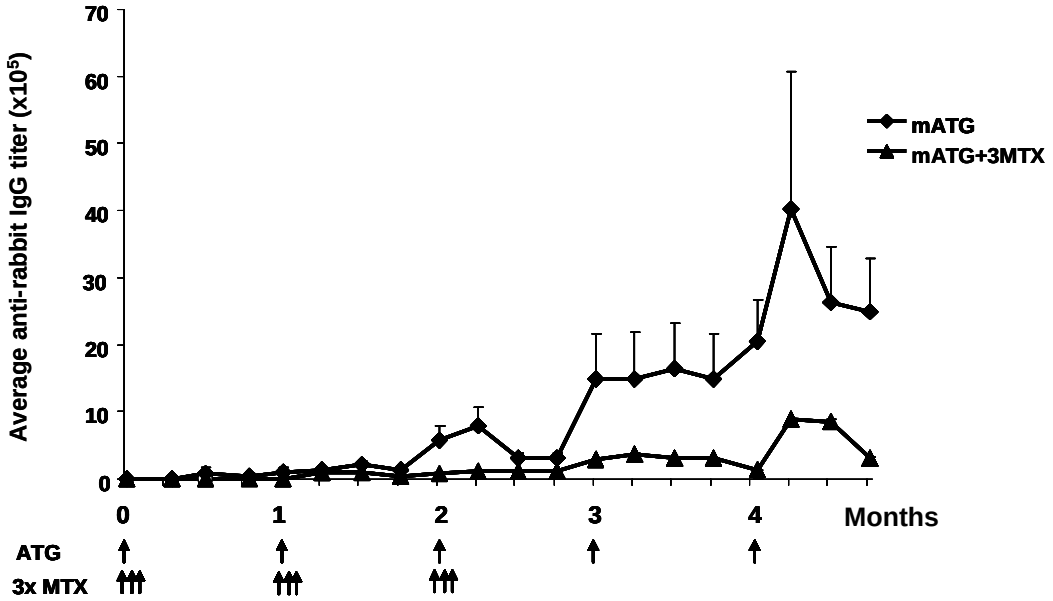

Average anti-rabbit IgG titer (x10$^5$)
70
60
50
40
30
20
10
0
mATG
mATG+3MTX
0
1
2
3
4
Months
ATG
3x MTX

FIG. 4B

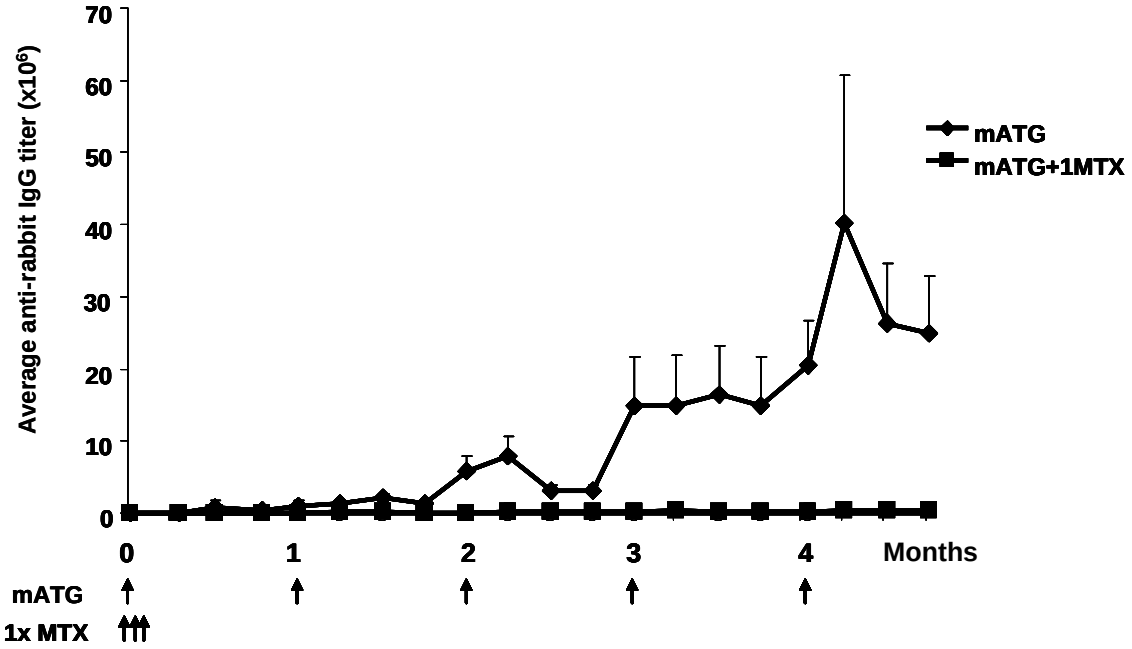

Average anti-rabbit IgG titer (x10$^6$)
70
60
50
40
30
20
10
0
mATG
mATG+1MTX
0
1
2
3
4
Months
mATG
1x MTX

**FIG. 4C**

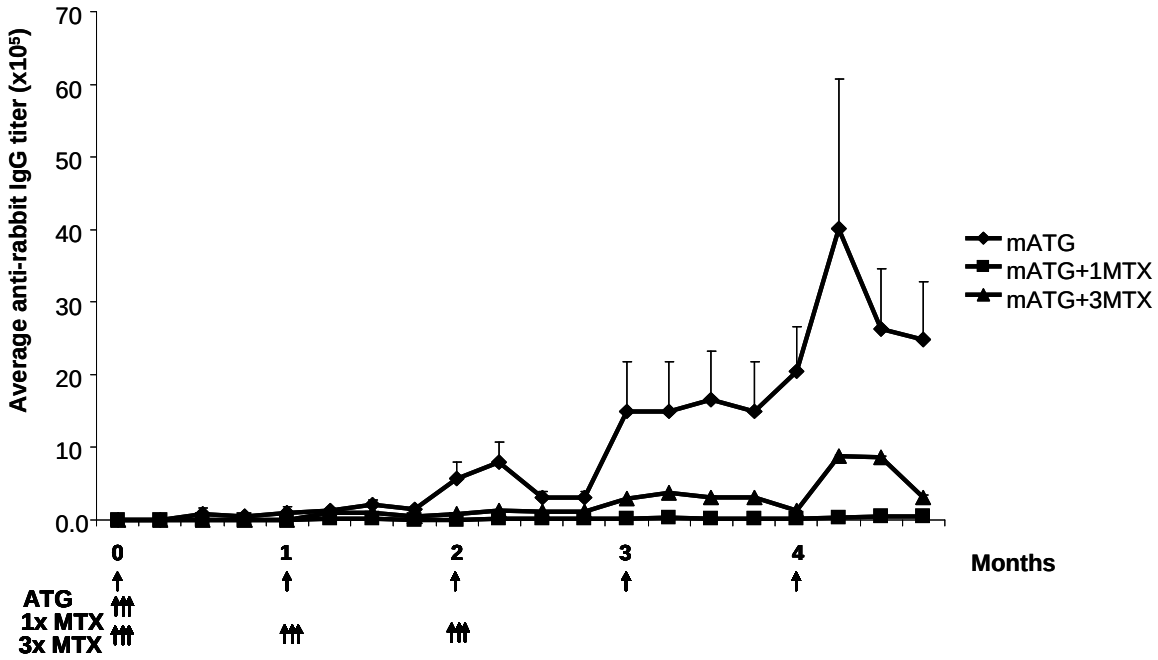

Average anti-rabbit IgG titer (x10⁵)
70
60
50
40
30
20
10
0.0
0
1
2
3
4
Months
ATG
1x MTX
3x MTX
mATG
mATG+1MTX
mATG+3MTX

**FIG. 5**

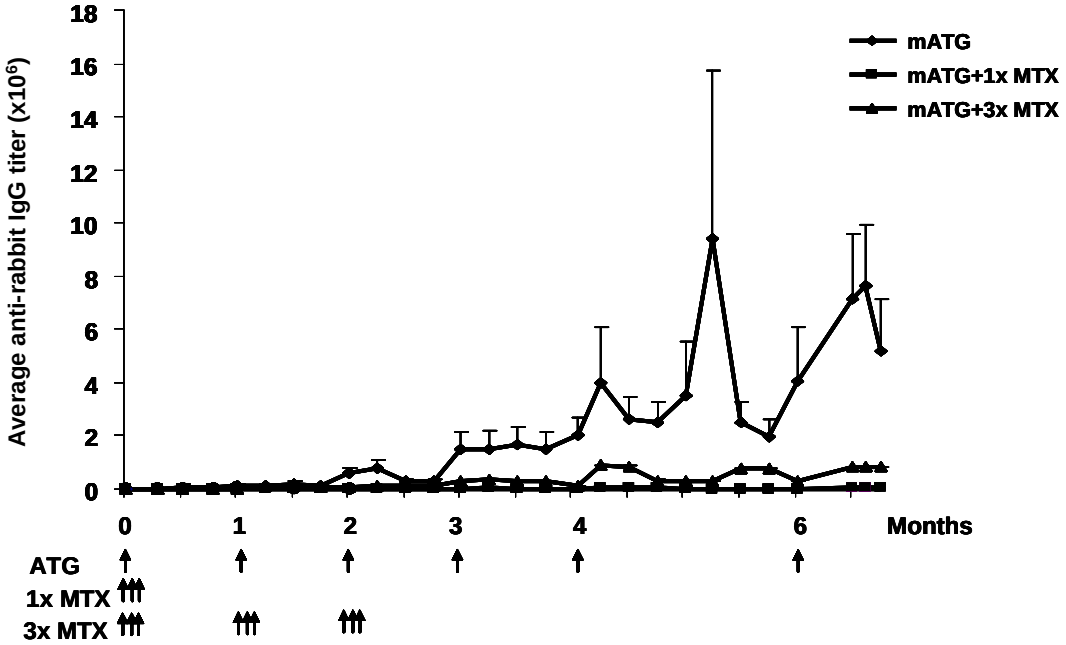

Average anti-rabbit IgG titer (x10⁶)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
mATG
mATG+1x MTX
mATG+3x MTX
0
1
2
3
4
6
Months
ATG
1x MTX
3x MTX

**FIG. 6**

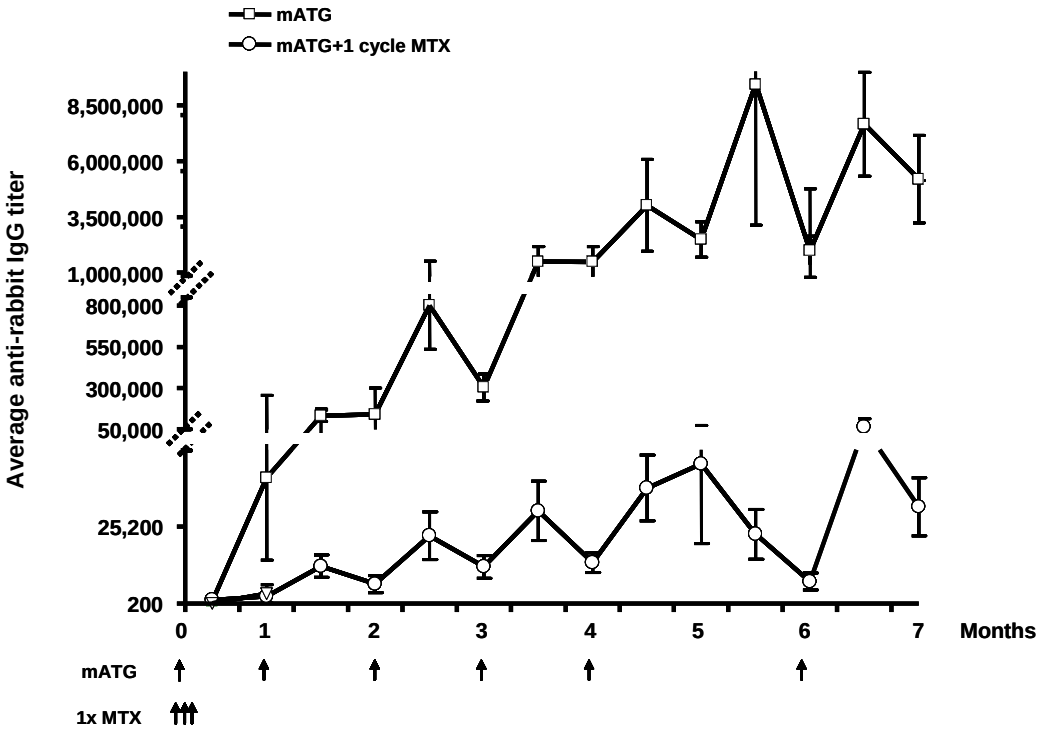

mATG
mATG+1 cycle MTX
Average anti-rabbit IgG titer
8,500,000
6,000,000
3,500,000
1,000,000
800,000
550,000
300,000
50,000
25,200
200
0
1
2
3
4
5
6
7
Months
mATG
1x MTX

FIG. 7A

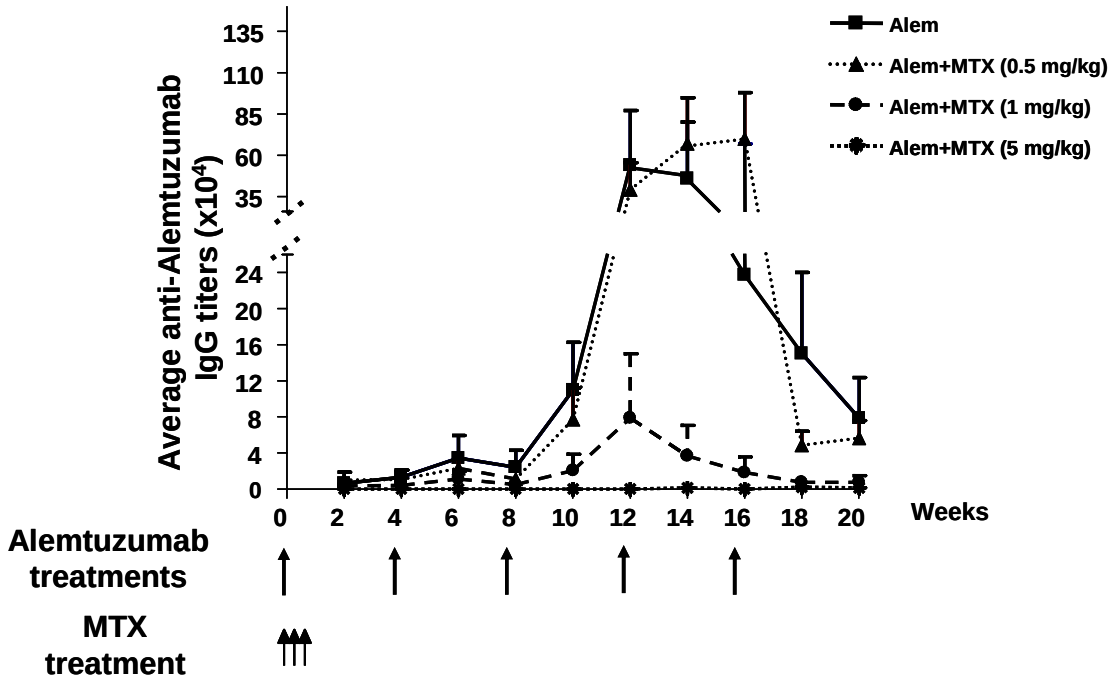



FIG. 7B

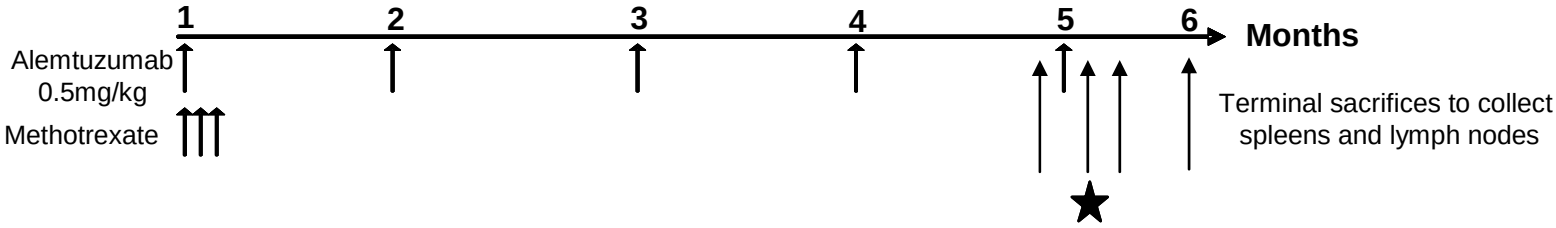



FIG. 7C

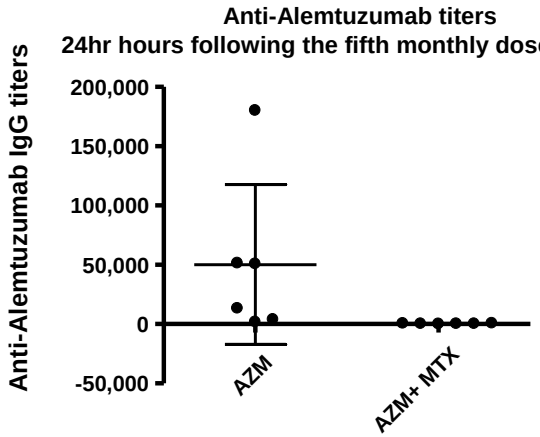


FIG. 8A.

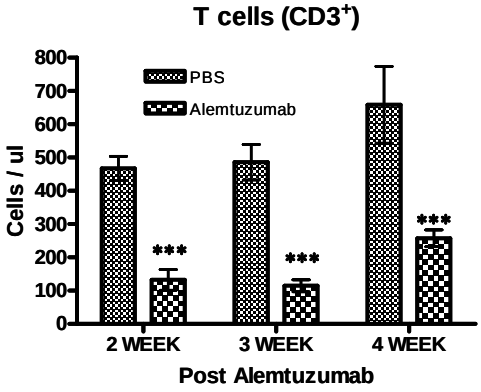



FIG. 8B.

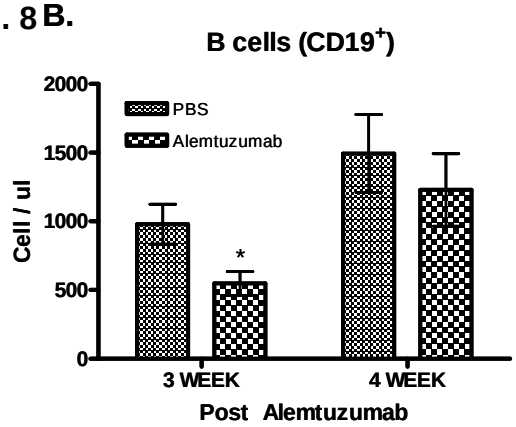



FIG. 8C.

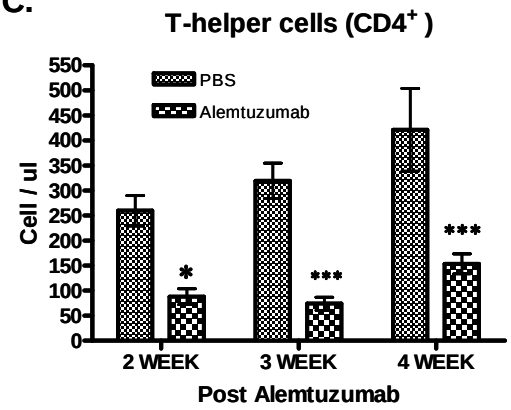



FIG. 8D.

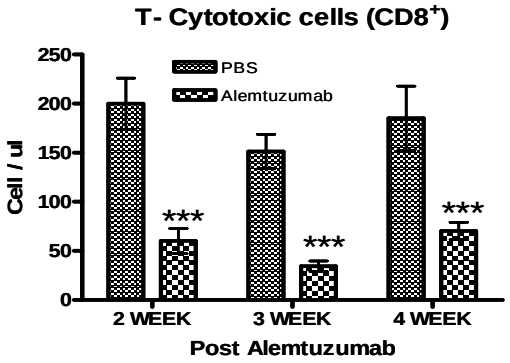


**FIG. 9** A.

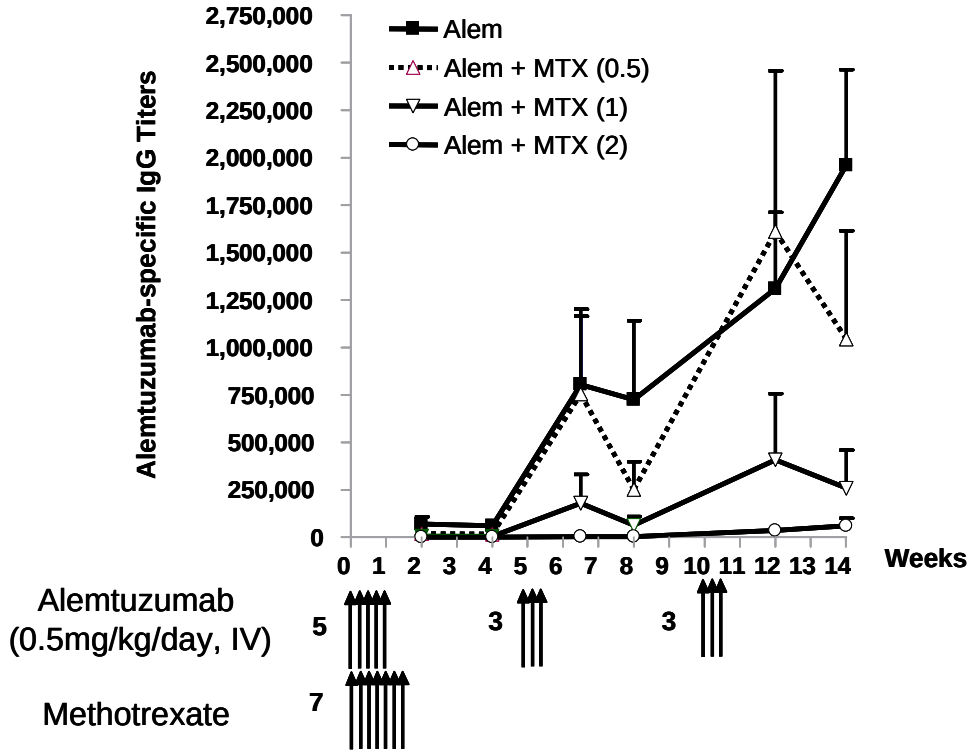

Alemtuzumab-specific IgG Titers
2,750,000
2,500,000
2,250,000
2,000,000
1,750,000
1,500,000
1,250,000
1,000,000
750,000
500,000
250,000
0
Alem
Alem + MTX (0.5)
Alem + MTX (1)
Alem + MTX (2)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Weeks
Alemtuzumab
(0.5mg/kg/day, IV)
5
3
3
Methotrexate
7

**FIG. 9** B.

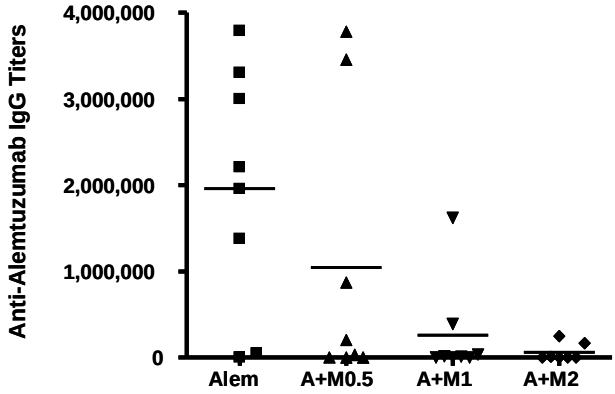

Anti-Alemtuzumab IgG Titers
4,000,000
3,000,000
2,000,000
1,000,000
0
Alem
A+M0.5
A+M1
A+M2

**FIG. 10**

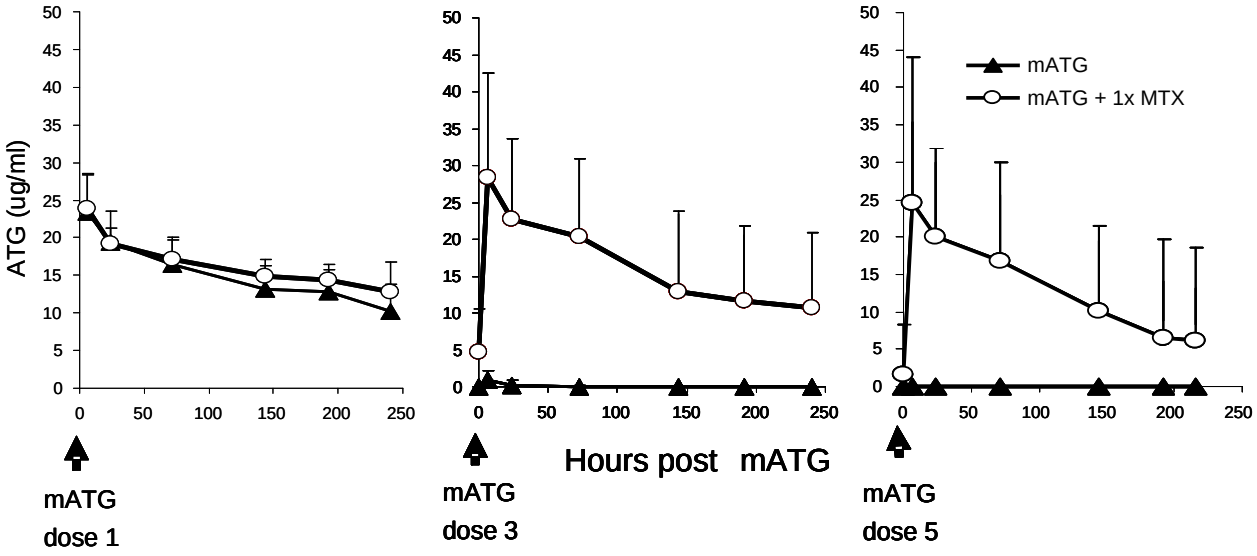

ATG (ug/ml)
mATG
mATG + 1x MTX
Hours post mATG
mATG dose 1
mATG dose 3
mATG dose 5

**FIG. 11**

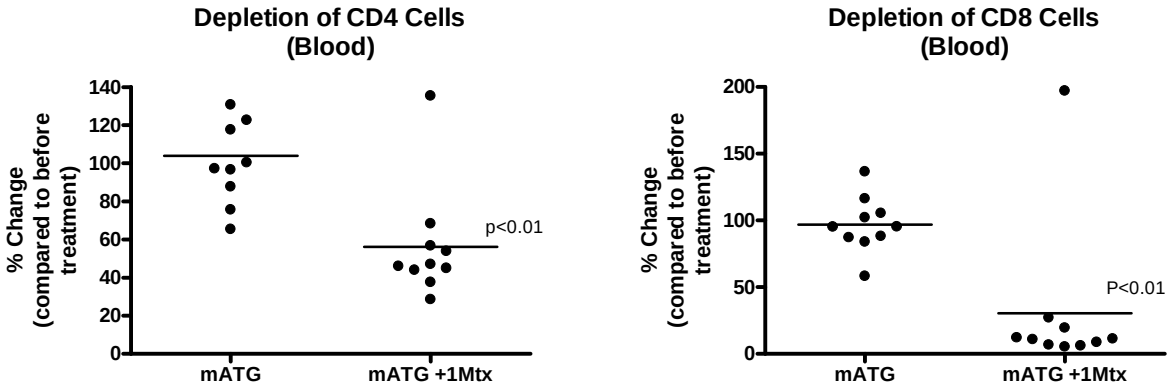

Depletion of CD4 Cells
(Blood)
% Change
(compared to before
treatment)
140
120
100
80
60
40
20
0
p<0.01
mATG
mATG +1Mtx
Depletion of CD8 Cells
(Blood)
% Change
(compared to before
treatment)
200
150
100
50
0
P<0.01
mATG
mATG +1Mtx

FIG. 12A

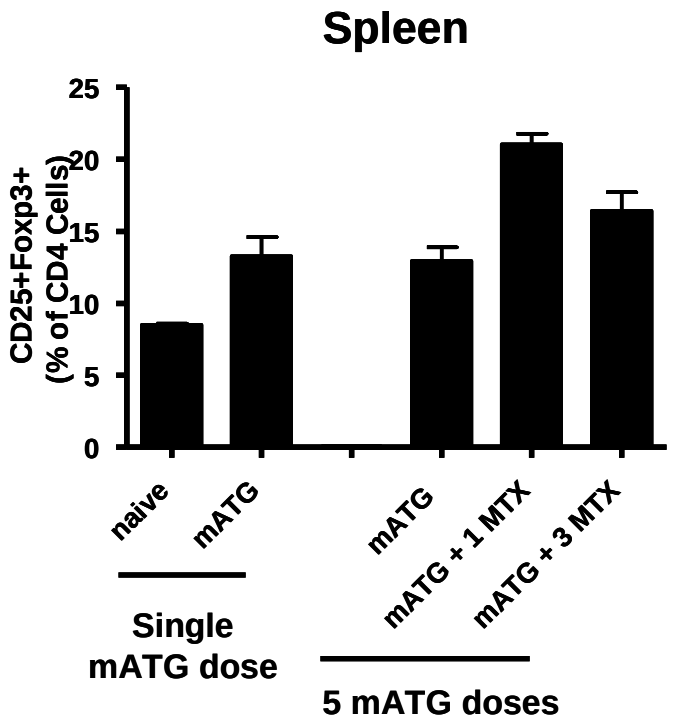



FIG. 12B

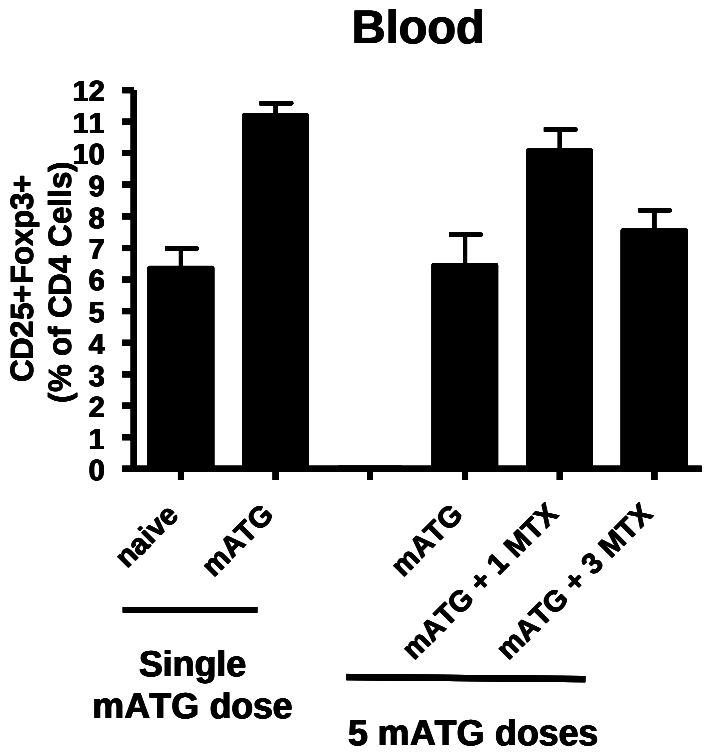


FIG. 13A

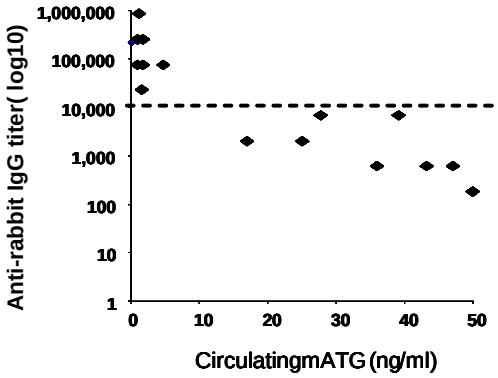



FIG. 13B

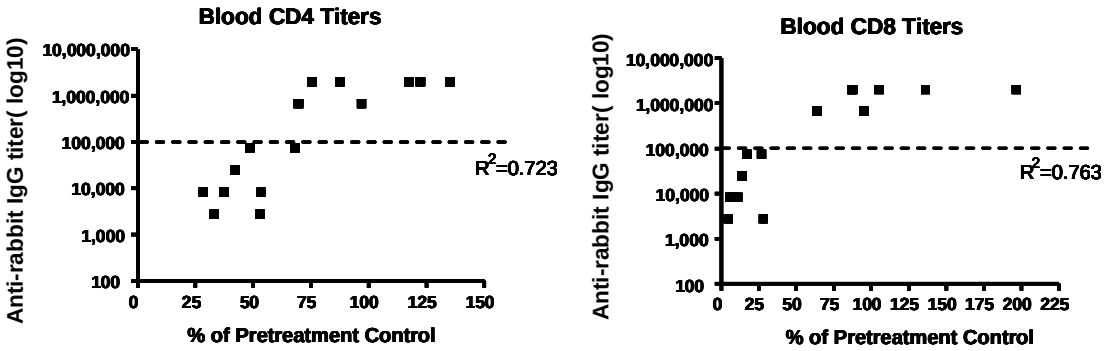


FIG. 14

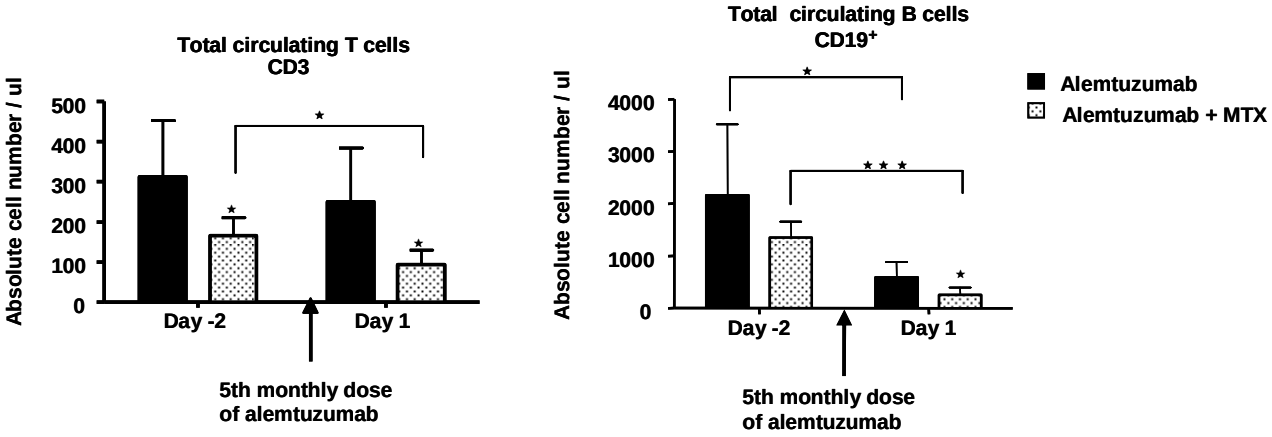

Total circulating T cells
CD3
Absolute cell number / ul
500
400
300
200
100
0
Day -2
Day 1
5th monthly dose
of alemtuzumab
Total circulating B cells
CD19+
Absolute cell number / ul
4000
3000
2000
1000
0
Day -2
Day 1
5th monthly dose
of alemtuzumab
Alemtuzumab
Alemtuzumab + MTX

**FIG. 15A**

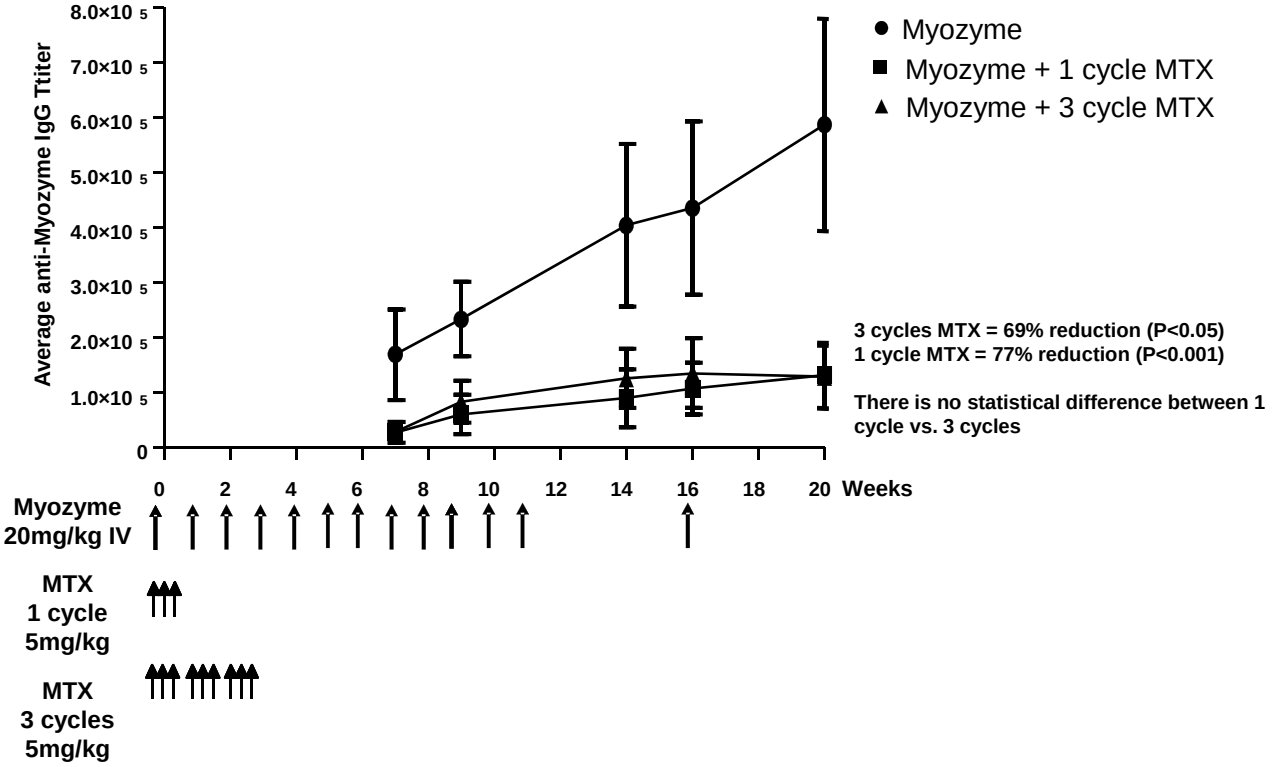



**FIG. 15B**

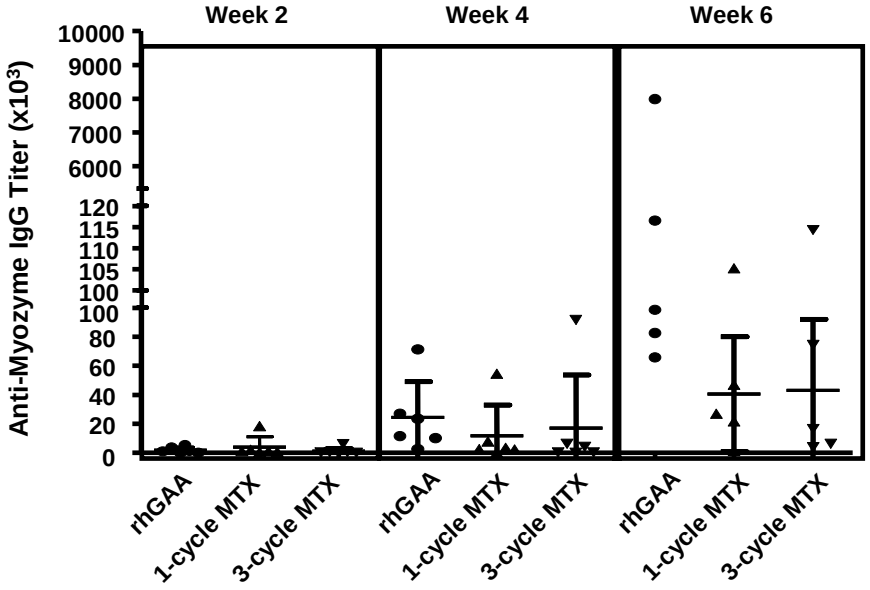


**FIG. 15C**

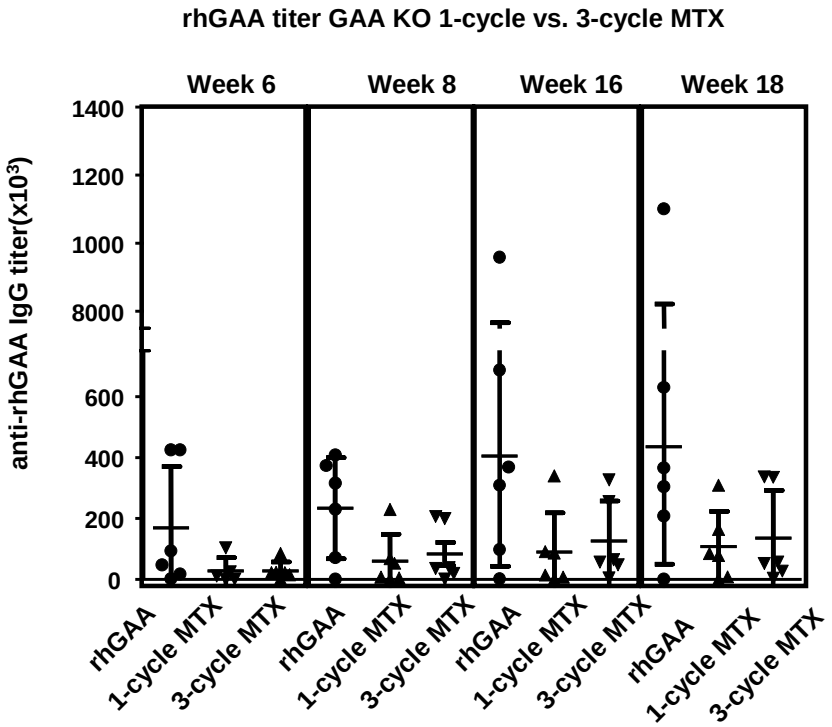

rhGAA titer GAA KO 1-cycle vs. 3-cycle MTX
Week 6
Week 8
Week 16
Week 18
anti-rhGAA IgG titer(x10³)
1400
1200
1000
8000
600
400
200
0
rhGAA
1-cycle MTX
3-cycle MTX

FIG. 16A

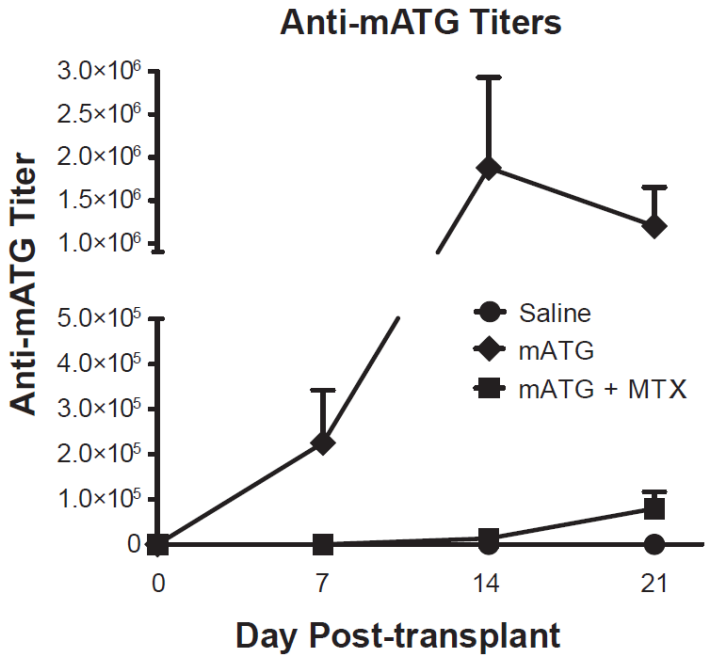



FIG. 16B

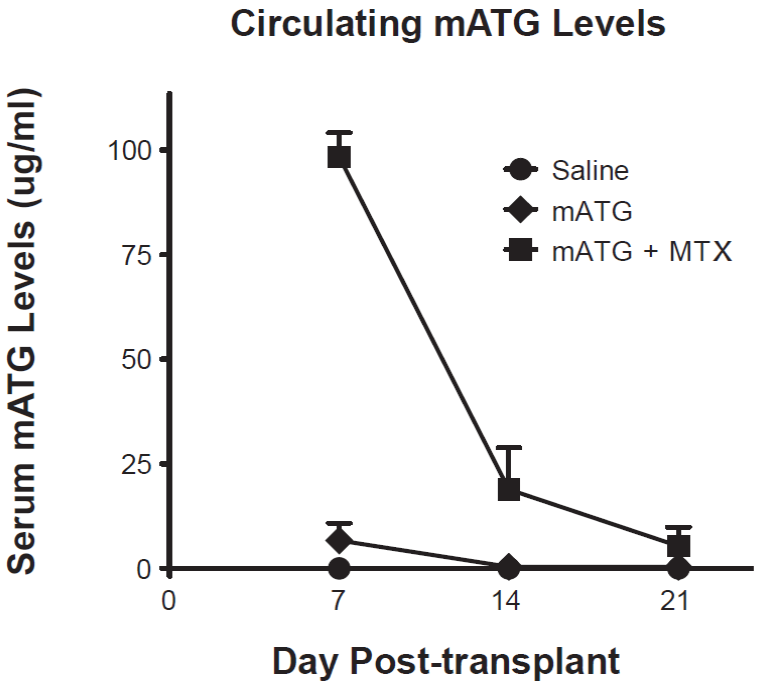


**FIG. 17**

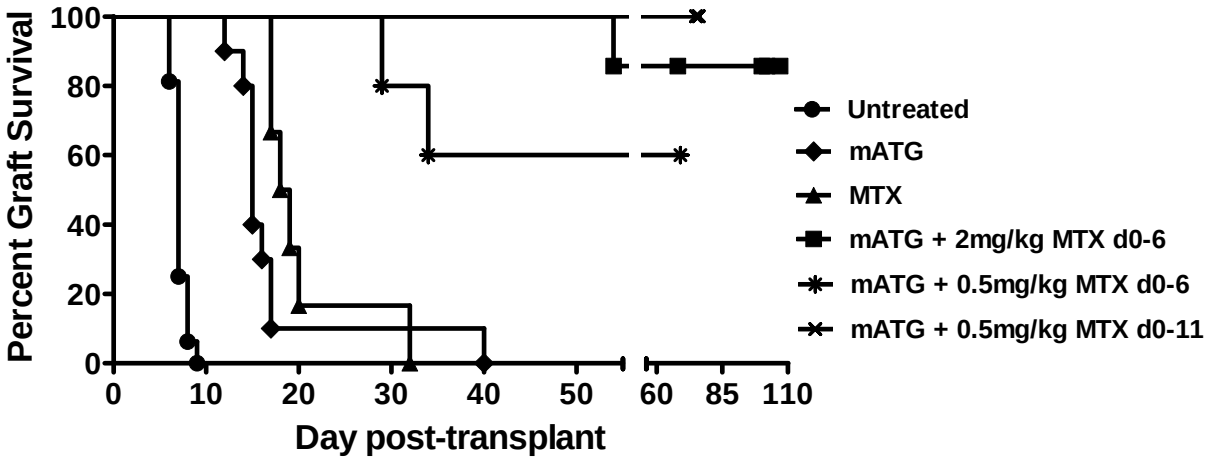

Percent Graft Survival
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
85
110
Day post-transplant
Untreated
mATG
MTX
mATG + 2mg/kg MTX d0-6
mATG + 0.5mg/kg MTX d0-6
mATG + 0.5mg/kg MTX d0-11

**FIG. 18A**

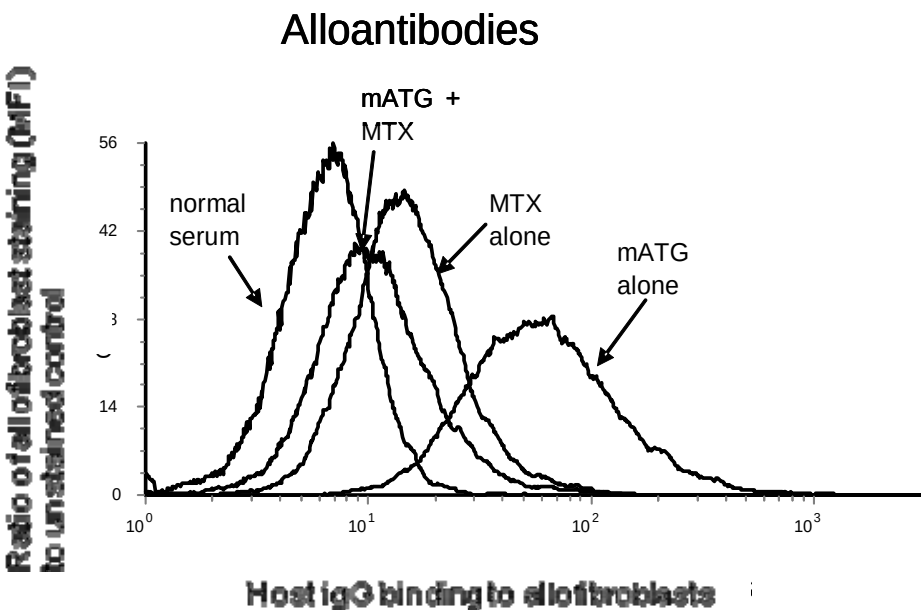



**FIG. 18B**

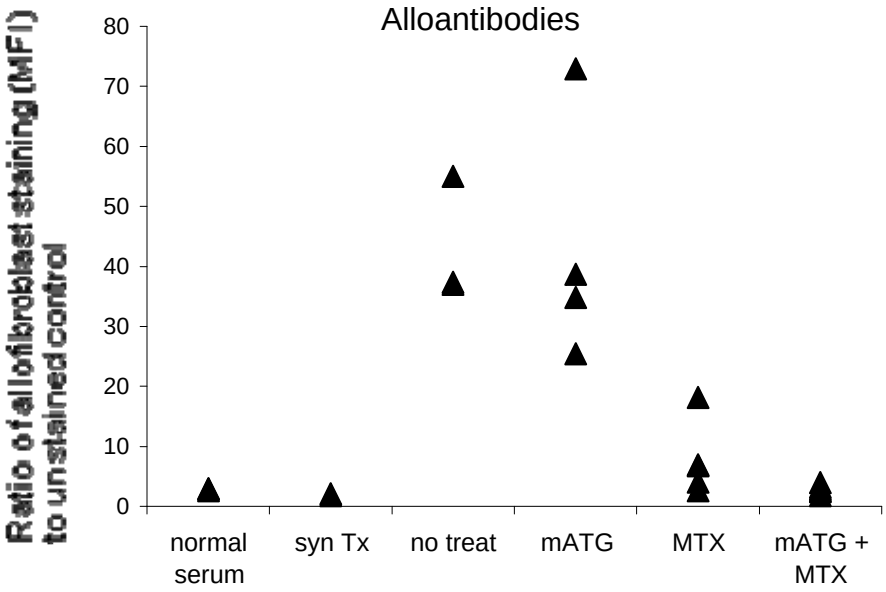


**FIG. 18C**

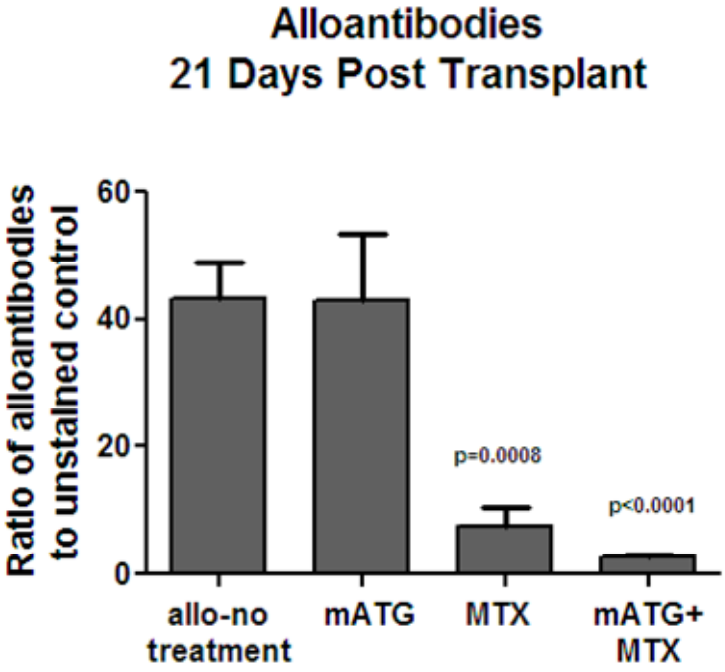

Alloantibodies
21 Days Post Transplant
Ratio of alloantibodies to unstained control
60
40
20
0
p=0.0008
p<0.0001
allo-no treatment
mATG
MTX
mATG+ MTX

**FIG. 19**

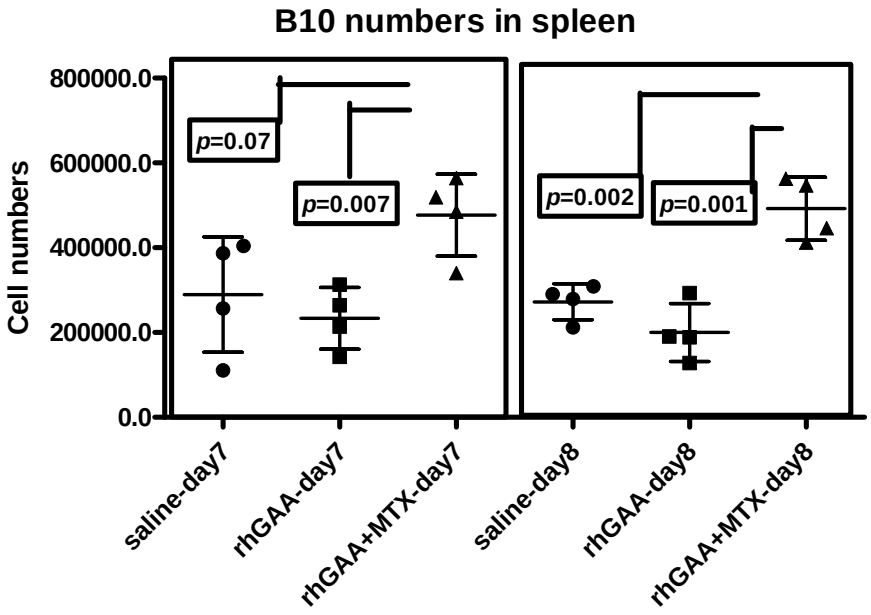

B10 numbers in spleen
Cell numbers
800000.0
600000.0
400000.0
200000.0
0.0
p=0.07
p=0.007
p=0.002
p=0.001
saline-day7
rhGAA-day7
rhGAA+MTX-day7
saline-day8
rhGAA-day8
rhGAA+MTX-day8

**FIG. 20**

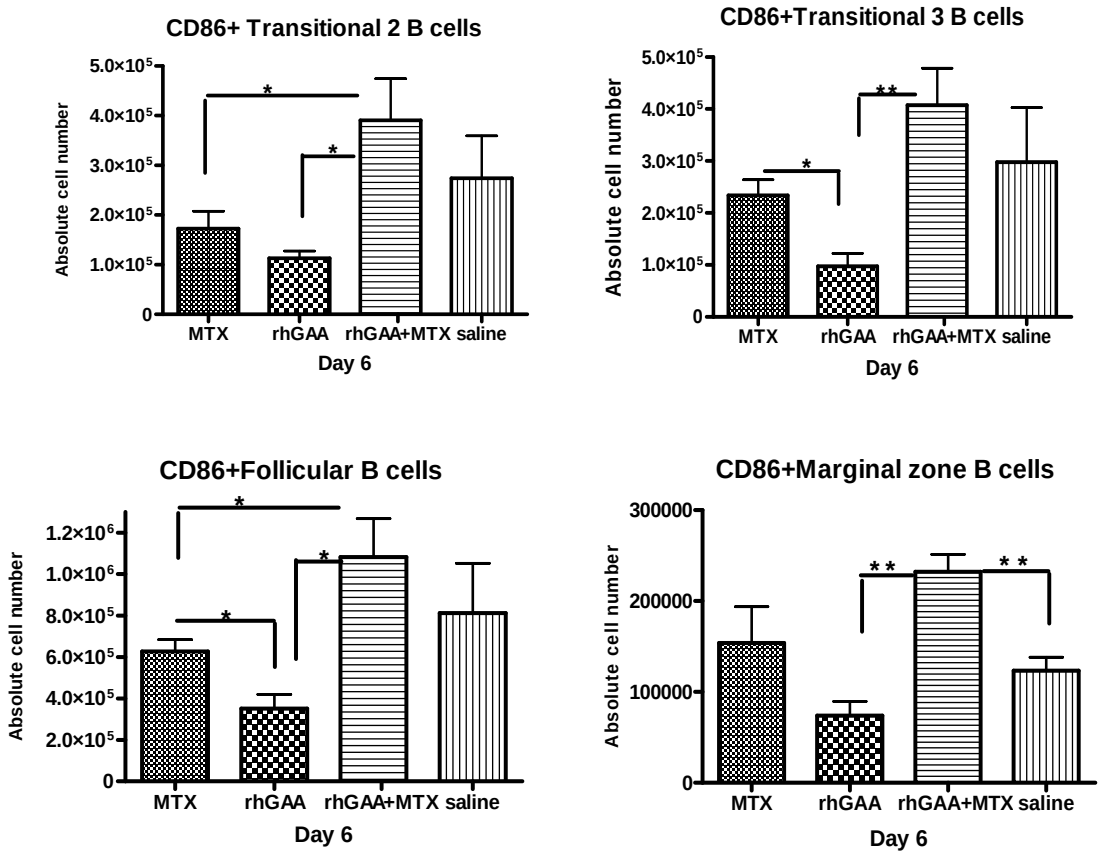

CD86+ Transitional 2 B cells
Absolute cell number
5.0×10^5
4.0×10^5
3.0×10^5
2.0×10^5
1.0×10^5
0
MTX
rhGAA
rhGAA+MTX
saline
Day 6
CD86+Transitional 3 B cells
CD86+Follicular B cells
1.2×10^6
1.0×10^6
8.0×10^5
6.0×10^5
4.0×10^5
2.0×10^5
CD86+Marginal zone B cells
300000
200000
100000

**FIG. 21**

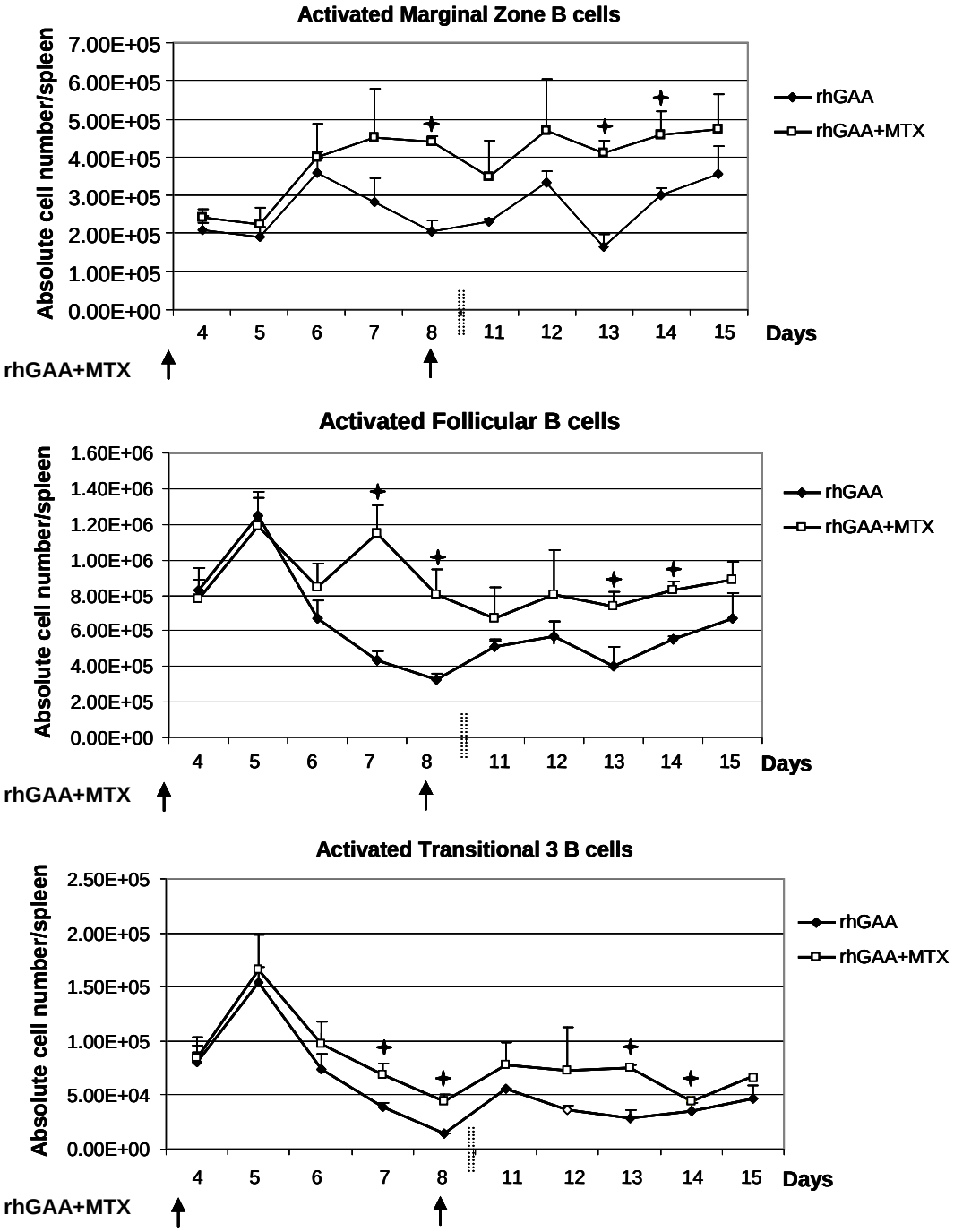

Activated Marginal Zone B cells
Absolute cell number/spleen
7.00E+05
6.00E+05
5.00E+05
4.00E+05
3.00E+05
2.00E+05
1.00E+05
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Days
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Activated Follicular B cells
Absolute cell number/spleen
1.60E+06
1.40E+06
1.20E+06
1.00E+06
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Days
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Activated Transitional 3 B cells
Absolute cell number/spleen
2.50E+05
2.00E+05
1.50E+05
1.00E+05
5.00E+04
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Days
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX

**FIG. 22**

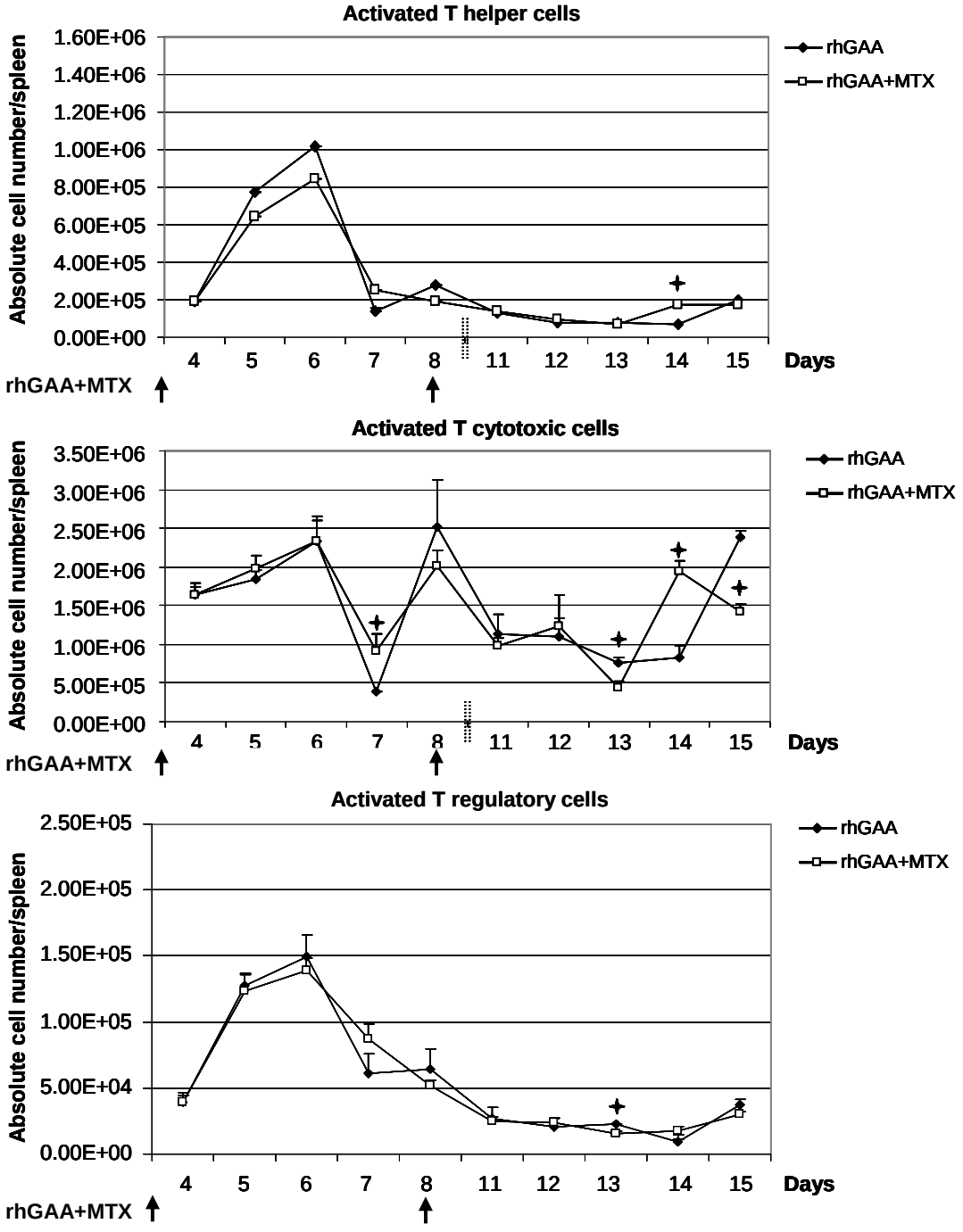

Activated T helper cells
Absolute cell number/spleen
1.60E+06
1.40E+06
1.20E+06
1.00E+06
8.00E+05
6.00E+05
4.00E+05
2.00E+05
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Days
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Activated T cytotoxic cells
Absolute cell number/spleen
3.50E+06
3.00E+06
2.50E+06
2.00E+06
1.50E+06
1.00E+06
5.00E+05
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Days
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Activated T regulatory cells
Absolute cell number/spleen
2.50E+05
2.00E+05
1.50E+05
1.00E+05
5.00E+04
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Days
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX

**FIG. 23**

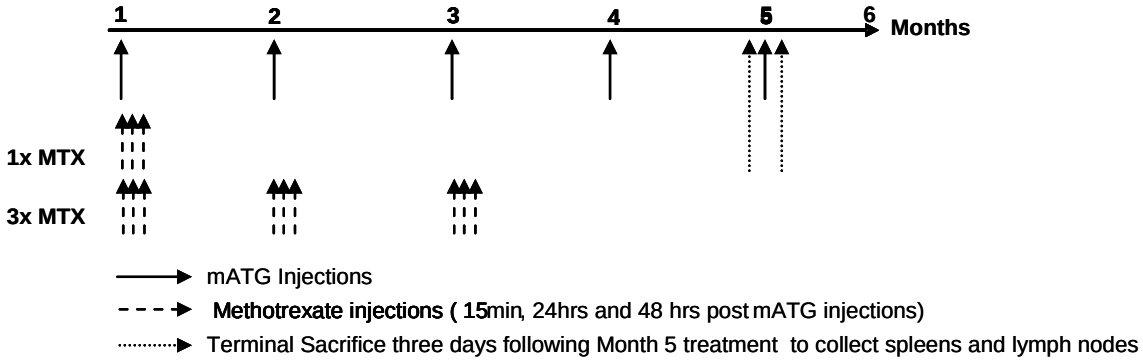

1
2
3
4
5
6
Months
1x MTX
3x MTX
mATG Injections
Methotrexate injections ( 15min, 24hrs and 48 hrs post mATG injections)
Terminal Sacrifice three days following Month 5 treatment to collect spleens and lymph nodes

**FIG. 24A**

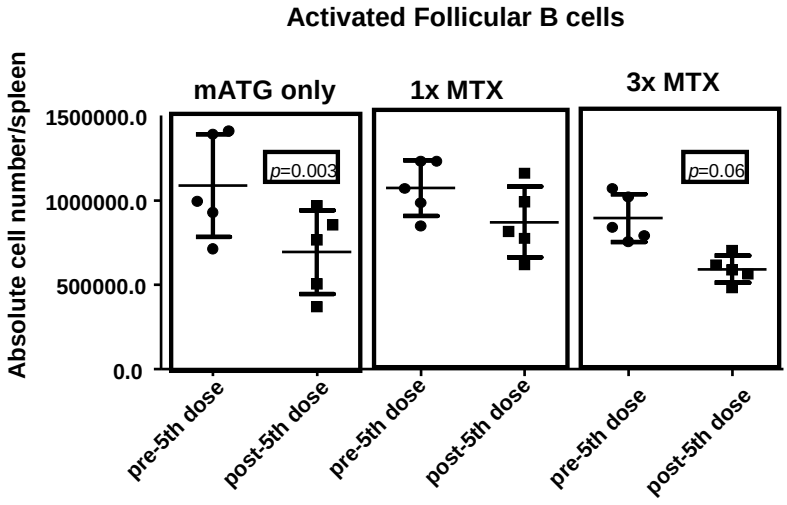



**FIG. 24B**

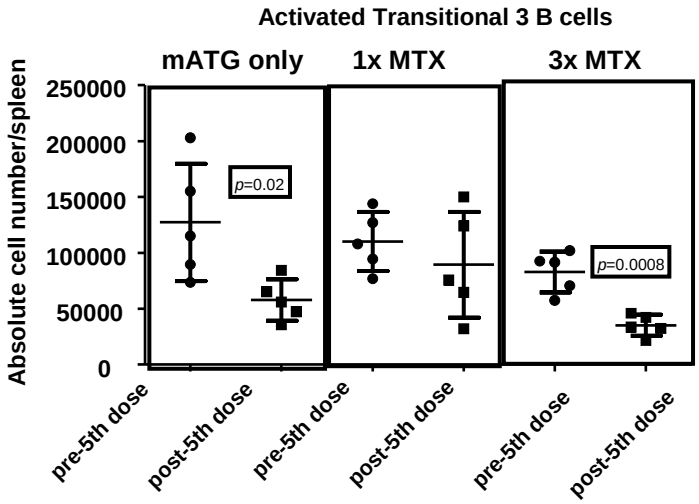


FIG. 25A

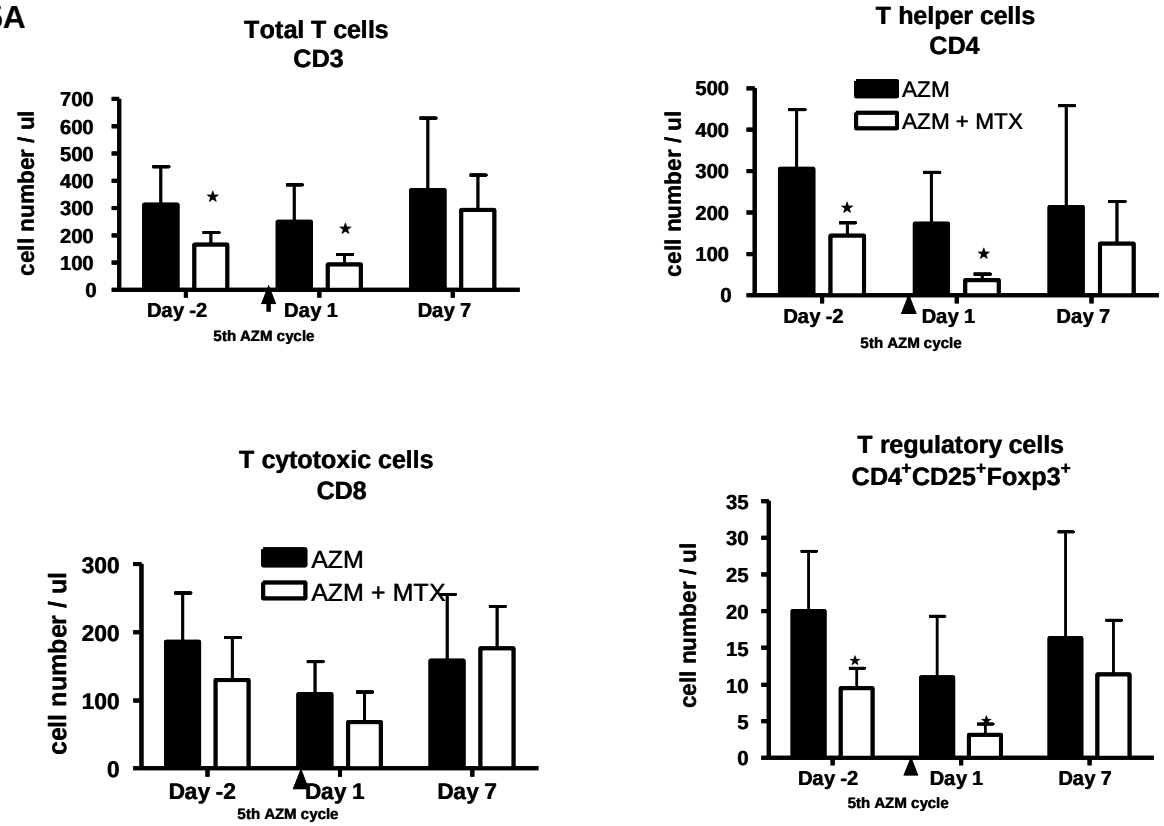



FIG. 25B

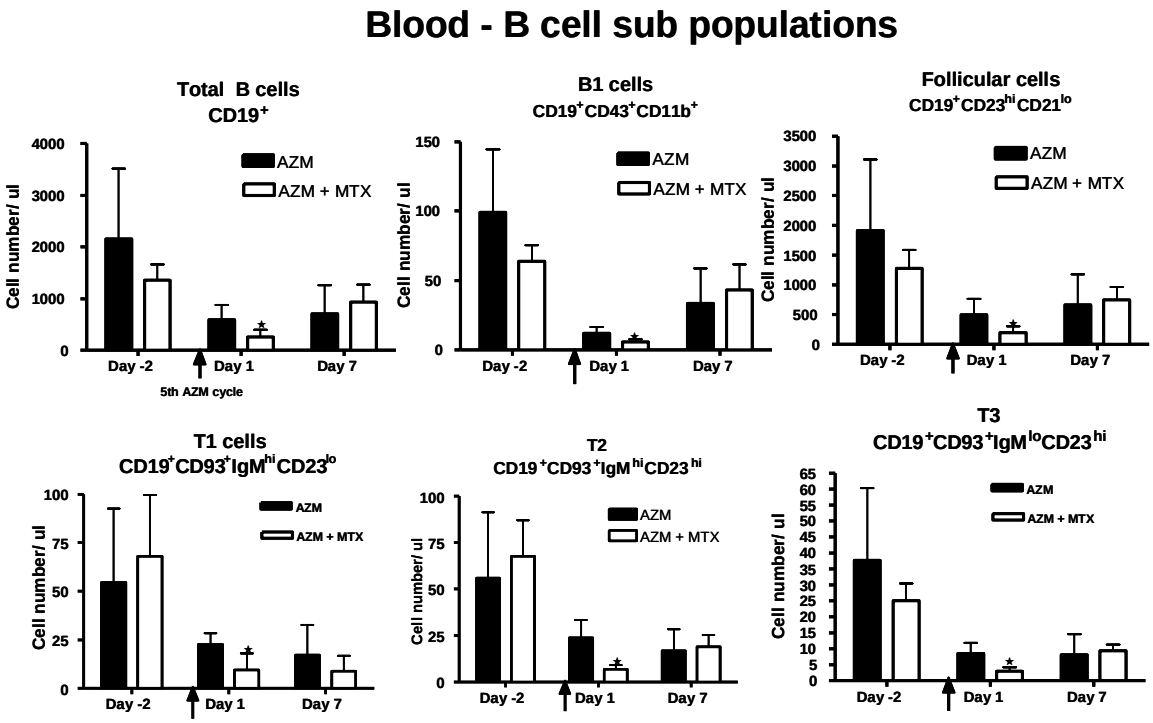
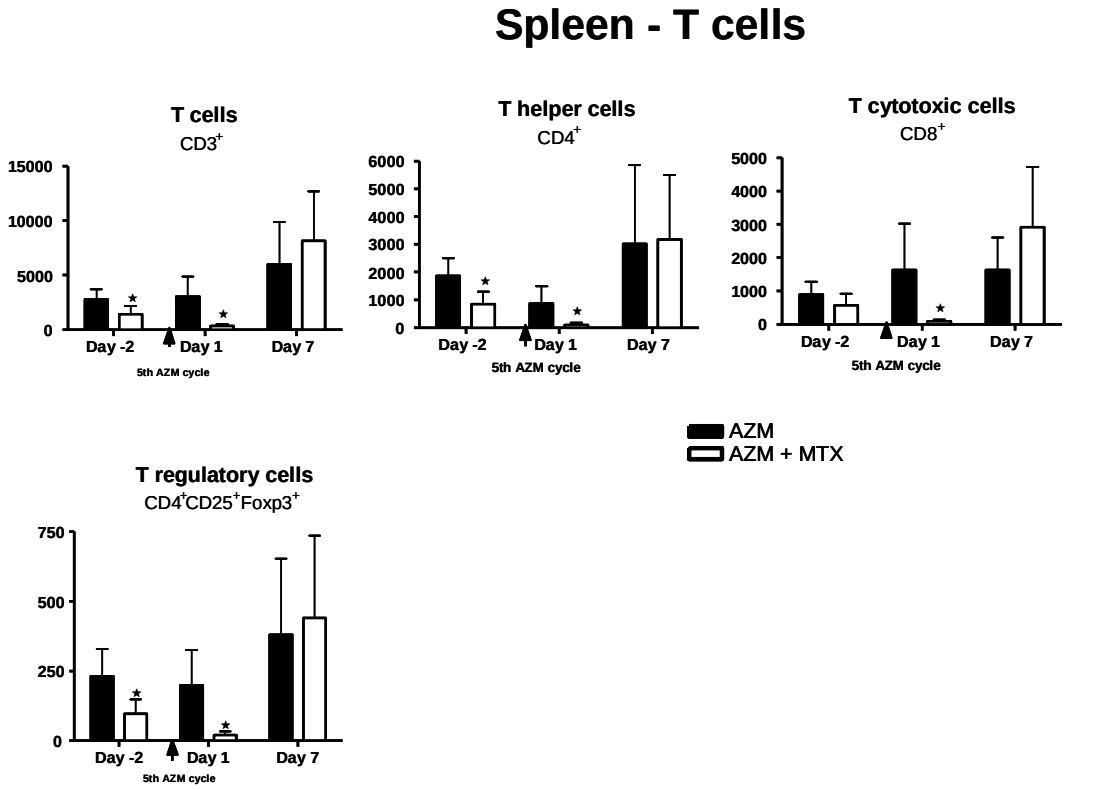


**FIG. 26**


Spleen - T cells
T cells
CD3+
T helper cells
CD4+
T cytotoxic cells
CD8+
T regulatory cells
CD4+CD25+Foxp3+
AZM
AZM + MTX
Day -2
Day 1
Day 7
5th AZM cycle

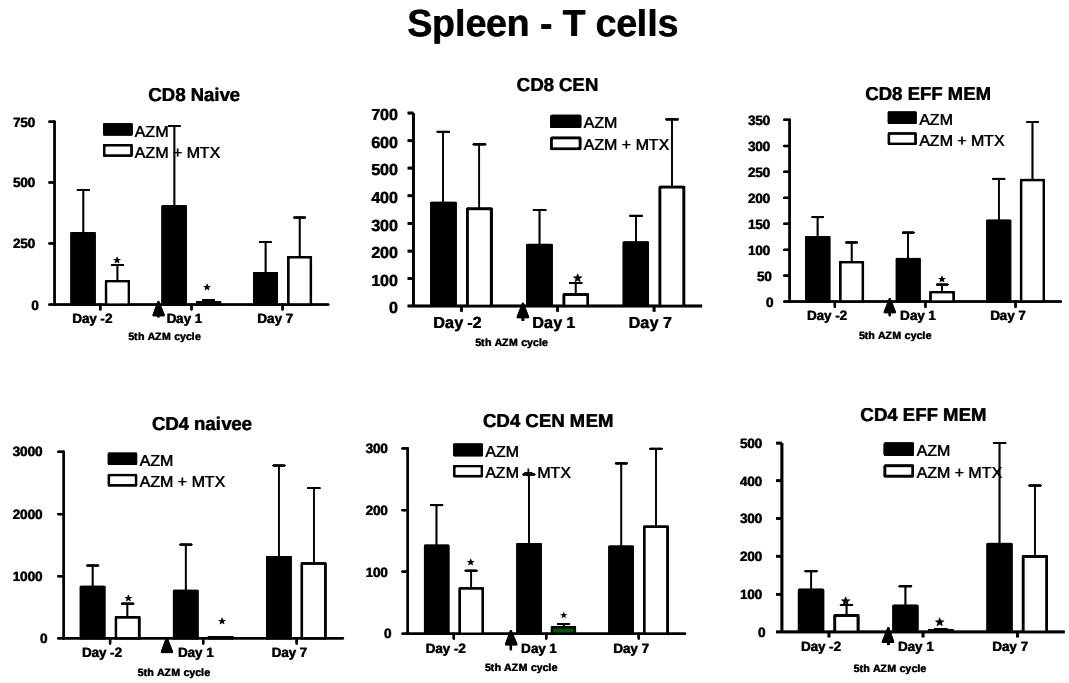

Spleen - T cells
CD8 Naive
CD8 CEN
CD8 EFF MEM
CD4 naivee
CD4 CEN MEM
CD4 EFF MEM
AZM
AZM + MTX
Day -2
Day 1
Day 7
5th AZM cycle

FIG. 27A

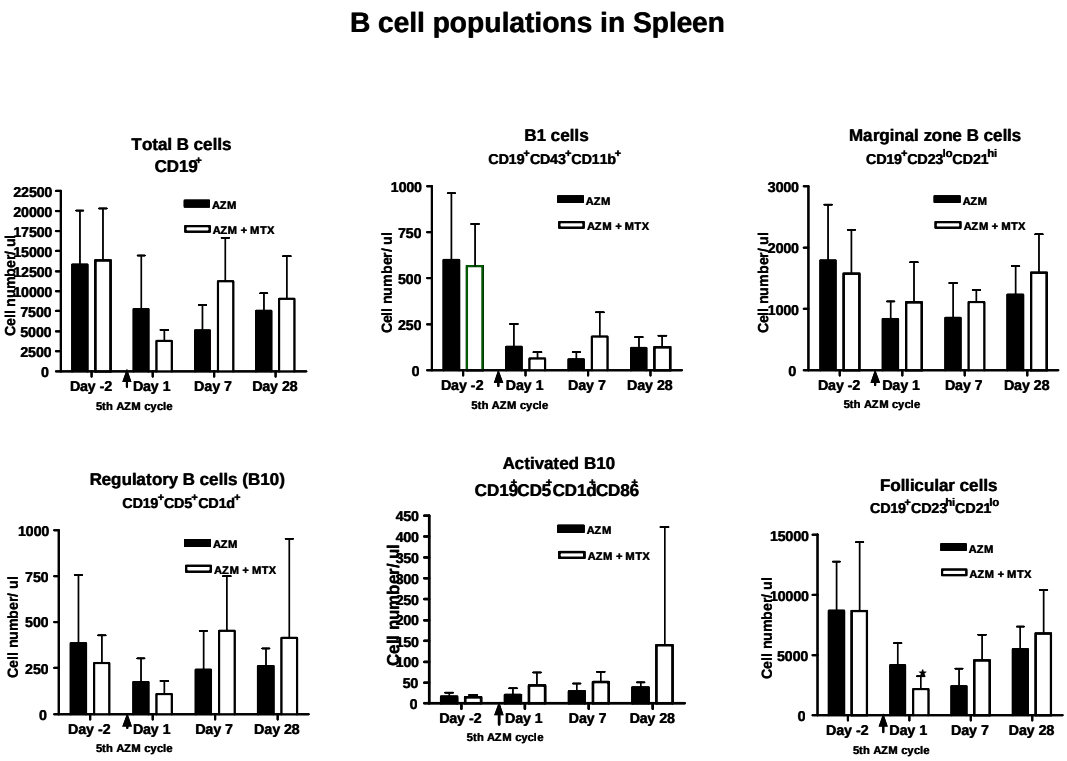



FIG. 27B

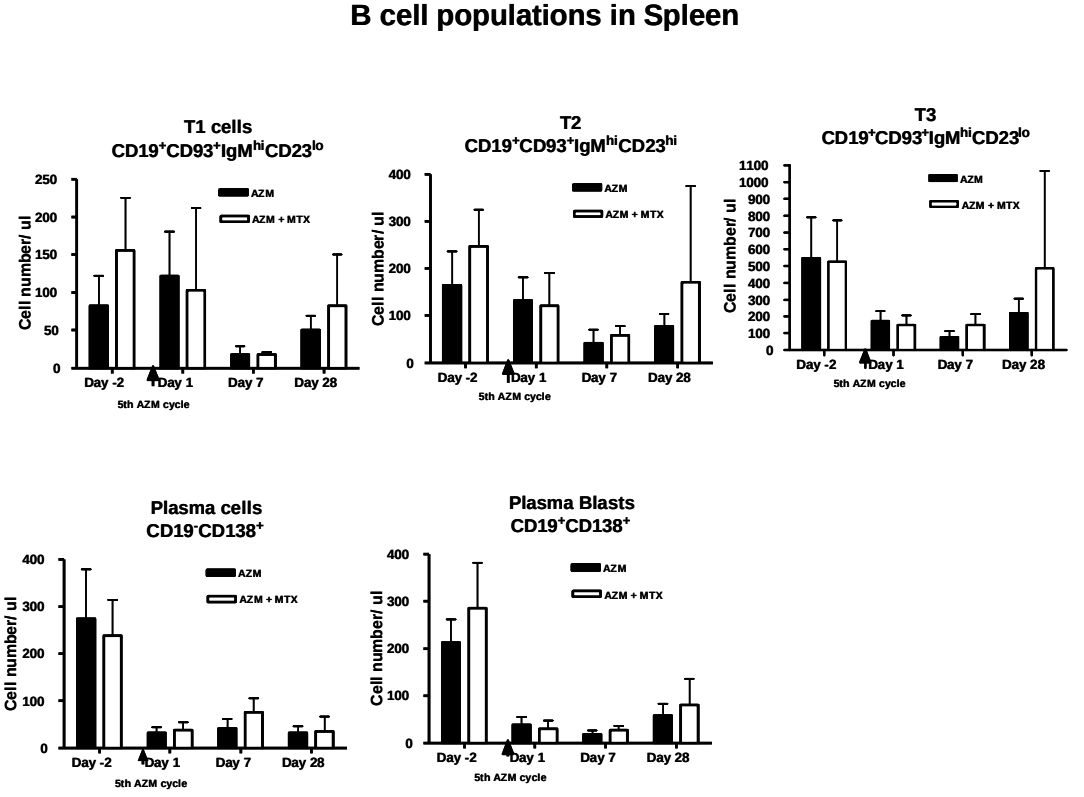


**FIG. 28A**

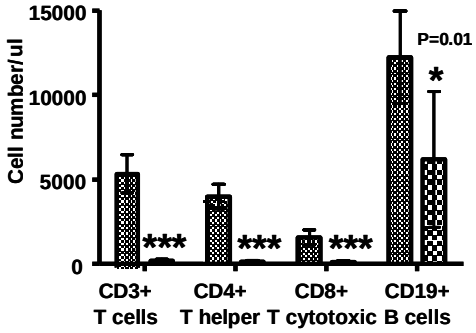



**FIG. 28B**

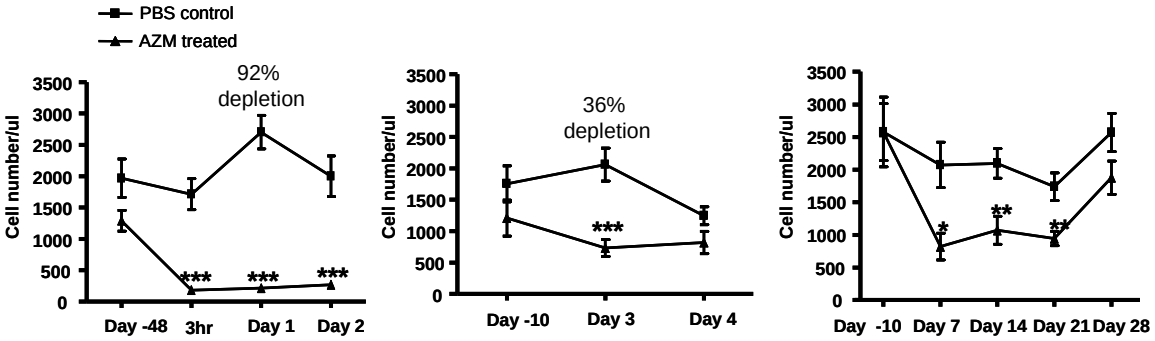


**FIG. 29A**

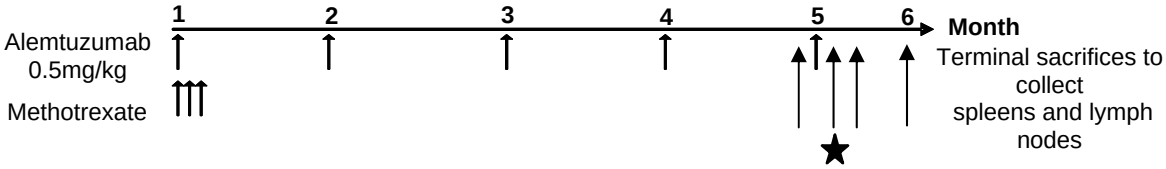



**FIG. 29B**

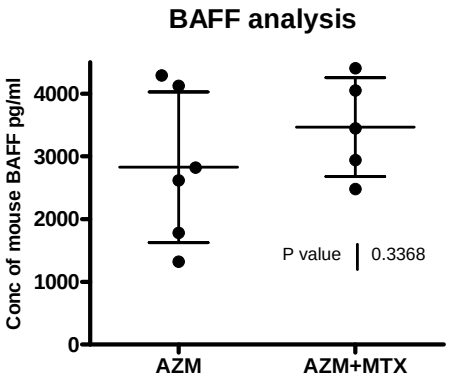


**FIG. 30A**

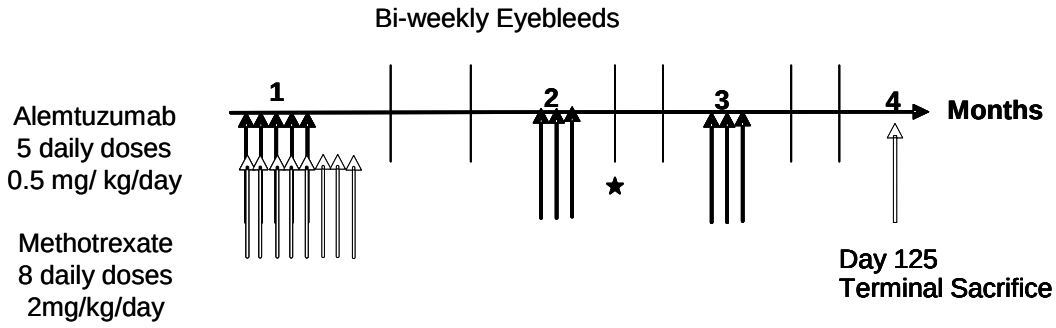

Bi-weekly Eyebleeds
Alemtuzumab
5 daily doses
0.5 mg/ kg/day
Methotrexate
8 daily doses
2mg/kg/day
1
2
3
4
Months
Day 125
Terminal Sacrifice

**FIG. 30B**

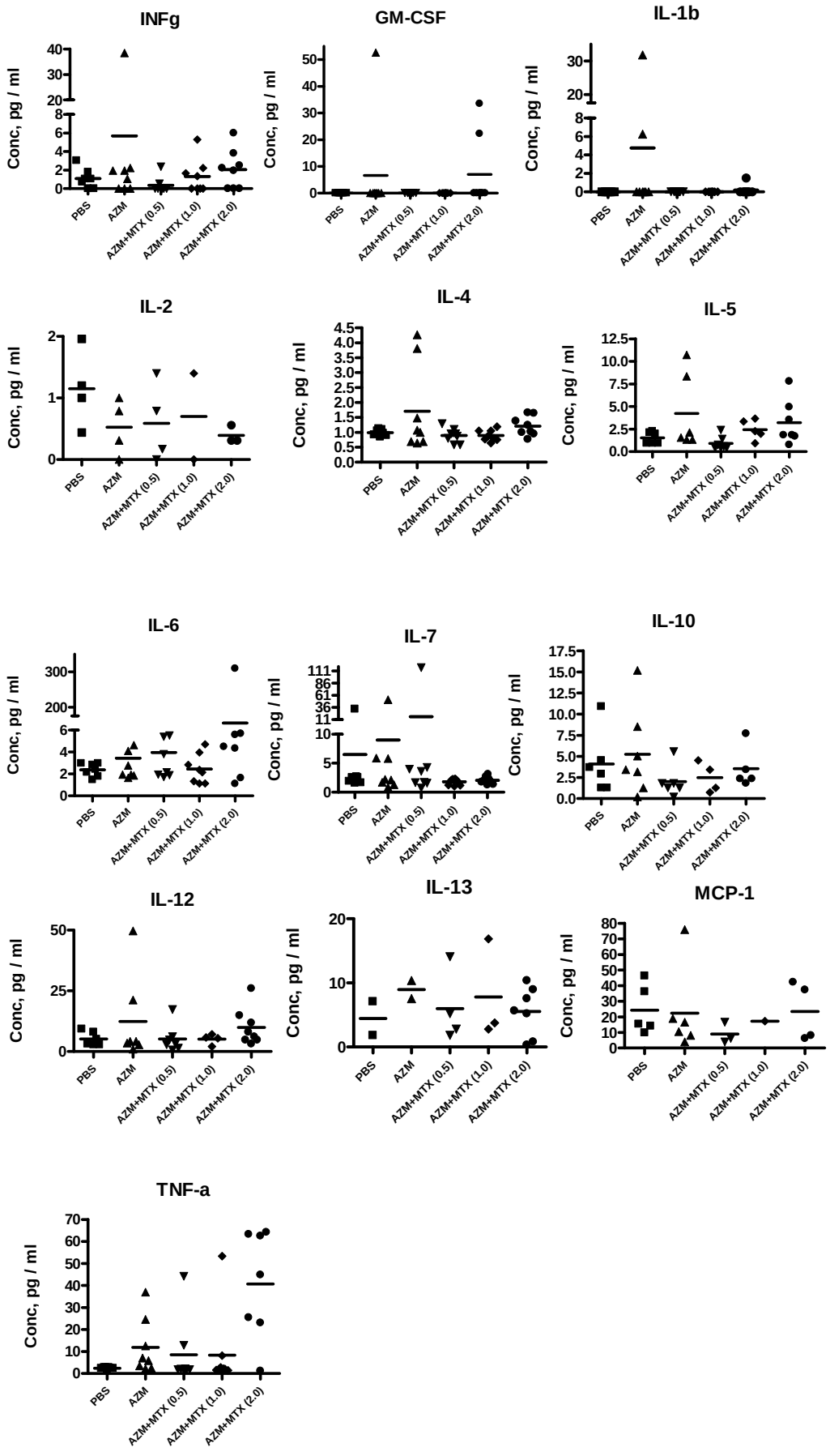

INFg
GM-CSF
IL-1b
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-7
IL-10
IL-12
IL-13
MCP-1
TNF-a
Conc, pg / ml
PBS
AZM
AZM+MTX (0.5)
AZM+MTX (1.0)
AZM+MTX (2.0)

**FIG. 31**

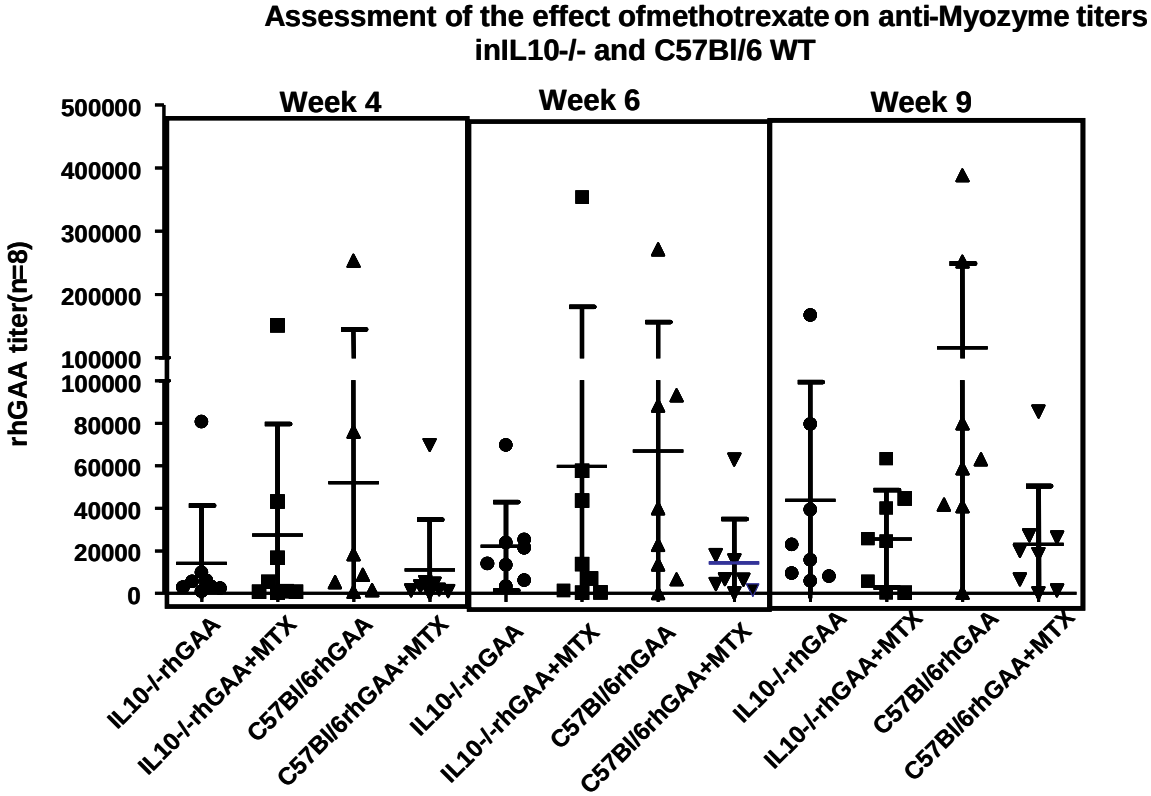

Assessment of the effect ofmethotrexate on anti-Myozyme titers inIL10-/- and C57Bl/6 WT
Week 4
Week 6
Week 9
rhGAA titer(n=8)
500000
400000
300000
200000
100000
100000
80000
60000
40000
20000
0
IL10-/-rhGAA
IL10-/-rhGAA+MTX
C57Bl/6rhGAA
C57Bl/6rhGAA+MTX
IL10-/-rhGAA
IL10-/-rhGAA+MTX
C57Bl/6rhGAA
C57Bl/6rhGAA+MTX
IL10-/-rhGAA
IL10-/-rhGAA+MTX
C57Bl/6rhGAA
C57Bl/6rhGAA+MTX

**FIG. 32**

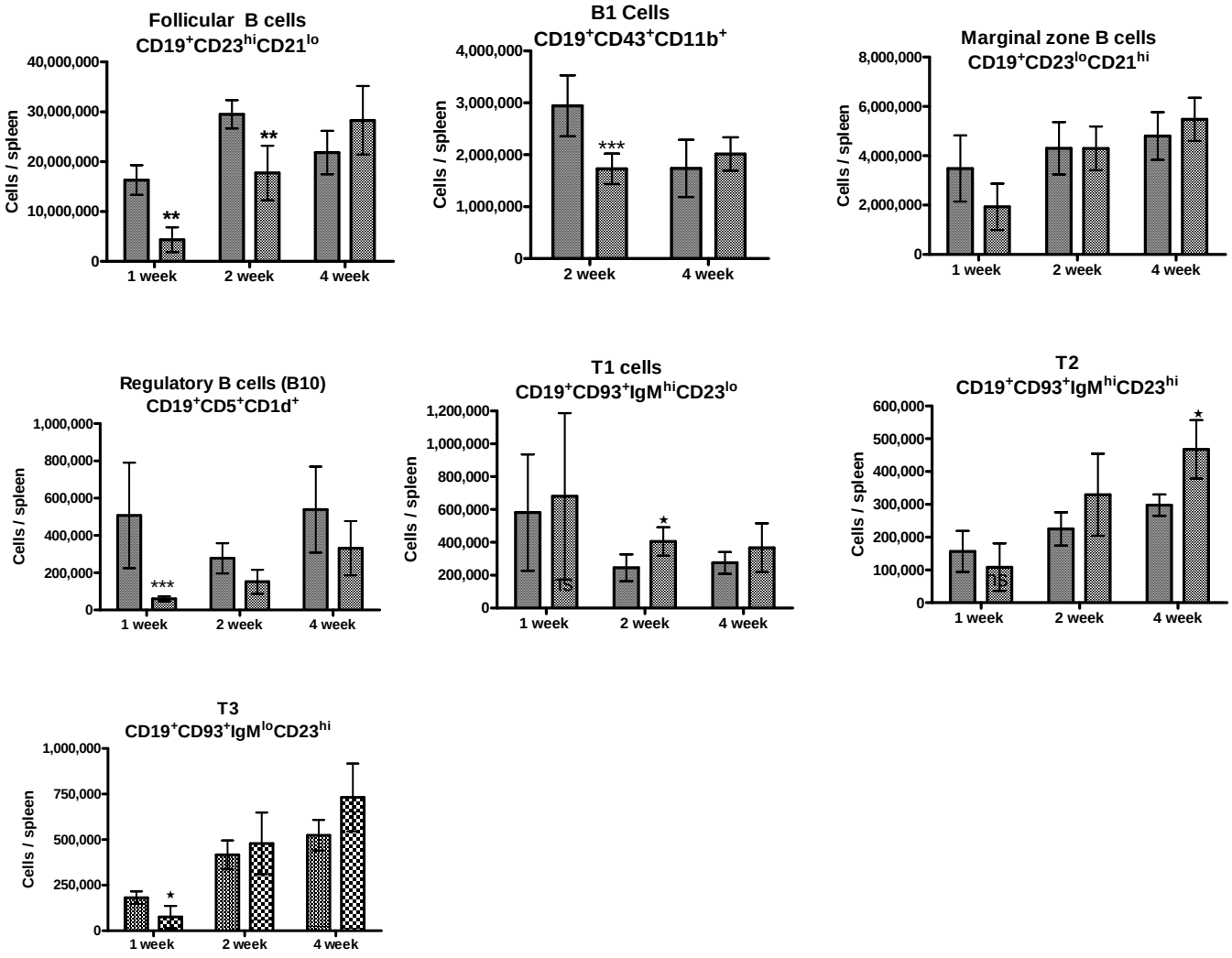

Follicular B cells
CD19+CD23hiCD21lo
Cells / spleen
40,000,000
30,000,000
20,000,000
10,000,000
0
1 week
2 week
4 week
**
**
B1 Cells
CD19+CD43+CD11b+
Cells / spleen
4,000,000
3,000,000
2,000,000
1,000,000
0
2 week
4 week
***
Marginal zone B cells
CD19+CD23loCD21hi
Cells / spleen
8,000,000
6,000,000
4,000,000
2,000,000
0
1 week
2 week
4 week
Regulatory B cells (B10)
CD19+CD5+CD1d+
Cells / spleen
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
1 week
2 week
4 week
***
T1 cells
CD19+CD93+IgMhiCD23lo
Cells / spleen
1,200,000
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
1 week
2 week
4 week
*
T2
CD19+CD93+IgMhiCD23hi
Cells / spleen
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
1 week
2 week
4 week
*
T3
CD19+CD93+IgMloCD23hi
Cells / spleen
1,000,000
750,000
500,000
250,000
0
1 week
2 week
4 week
*

**FIG. 33**

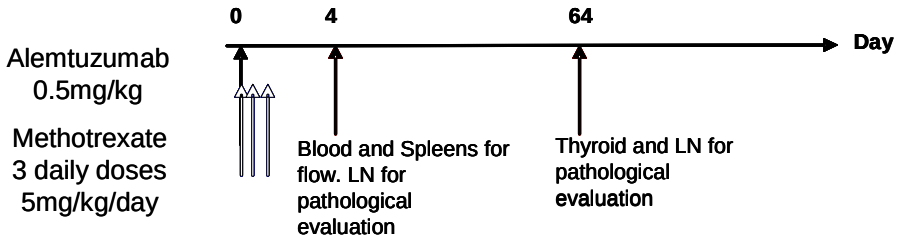

0
4
64
Day
Alemtuzumab
0.5mg/kg
Methotrexate
3 daily doses
5mg/kg/day
Blood and Spleens for flow. LN for pathological evaluation
Thyroid and LN for pathological evaluation

FIG. 34

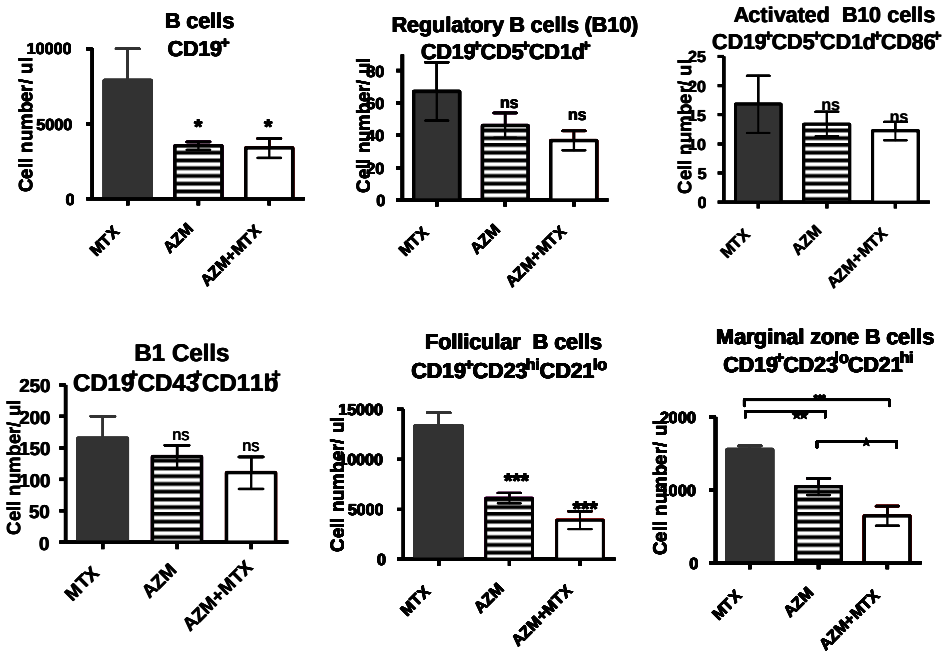

B cells
CD19+
Cell number/ ul
10000
5000
0
*
*
MTX
AZM
AZM+MTX
Regulatory B cells (B10)
CD19+CD5+CD1d+
Cell number/ ul
ns
ns
MTX
AZM
AZM+MTX
Activated B10 cells
CD19+CD5+CD1d+CD86+
Cell number/ ul
25
20
15
10
5
0
ns
ns
MTX
AZM
AZM+MTX
B1 Cells
CD19+CD43+CD11b+
Cell number/ ul
250
200
150
100
50
0
ns
ns
MTX
AZM
AZM+MTX
Follicular B cells
CD19+CD23hiCD21lo
Cell number/ ul
15000
10000
5000
0
***
***
MTX
AZM
AZM+MTX
Marginal zone B cells
CD19+CD23loCD21hi
Cell number/ ul
2000
1000
0
**
**
*
MTX
AZM
AZM+MTX

**FIG. 35**

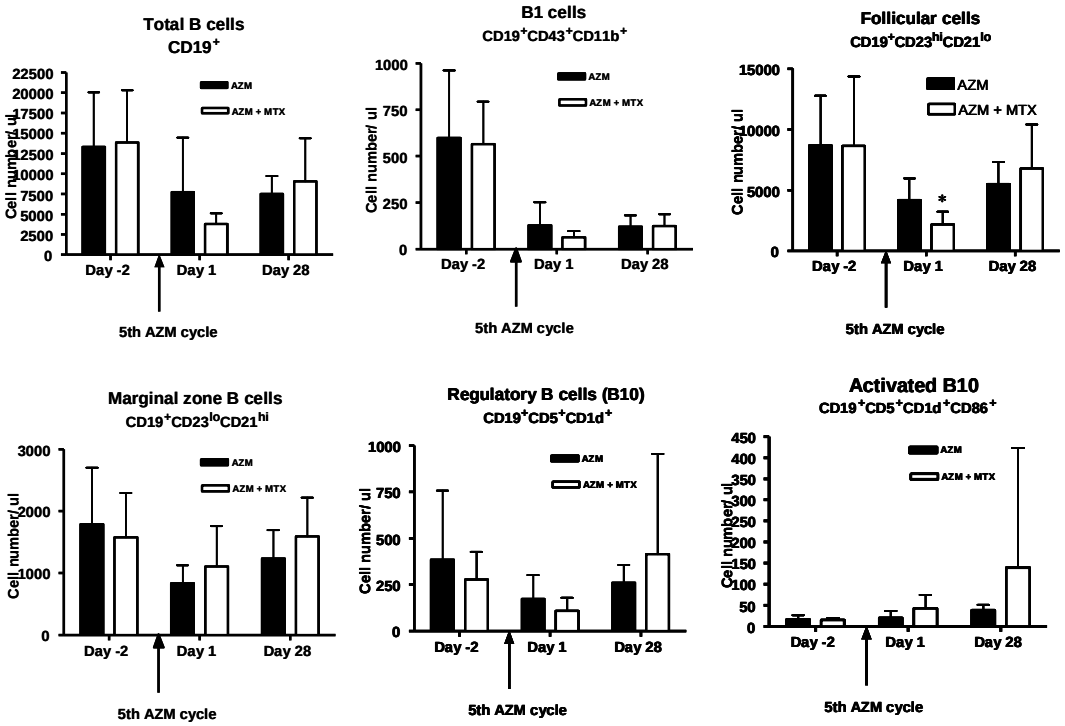

Total B cells
CD19+
Cell number/ ul
AZM
AZM + MTX
Day -2
Day 1
Day 28
5th AZM cycle
B1 cells
CD19+CD43+CD11b+
Follicular cells
CD19+CD23hiCD21lo
*
Marginal zone B cells
CD19+CD23loCD21hi
Regulatory B cells (B10)
CD19+CD5+CD1d+
Activated B10
CD19+CD5+CD1d+CD86+

FIG. 36

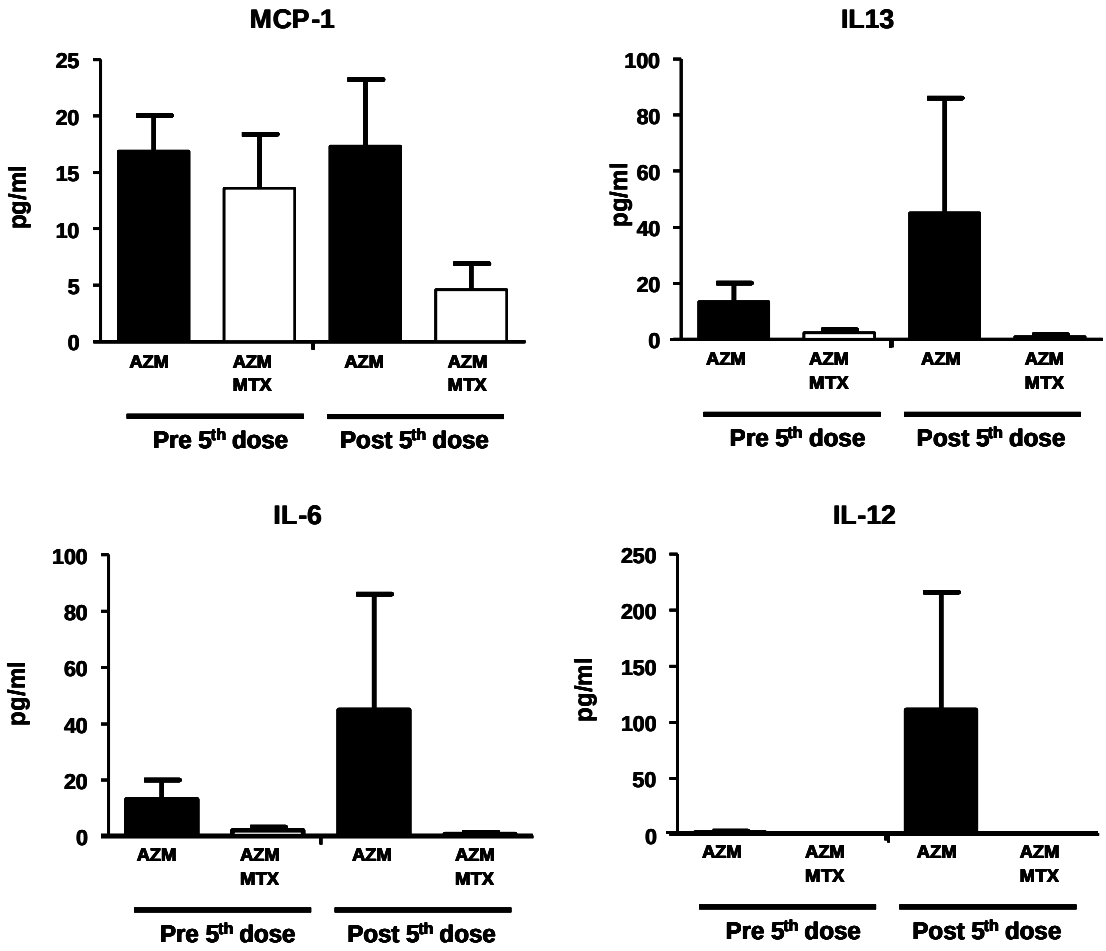

MCP-1
pg/ml
25
20
15
10
5
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5th dose
Post 5th dose
IL13
pg/ml
100
80
60
40
20
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5th dose
Post 5th dose
IL-6
pg/ml
100
80
60
40
20
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5th dose
Post 5th dose
IL-12
pg/ml
250
200
150
100
50
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5th dose
Post 5th dose

**FIG. 37A**

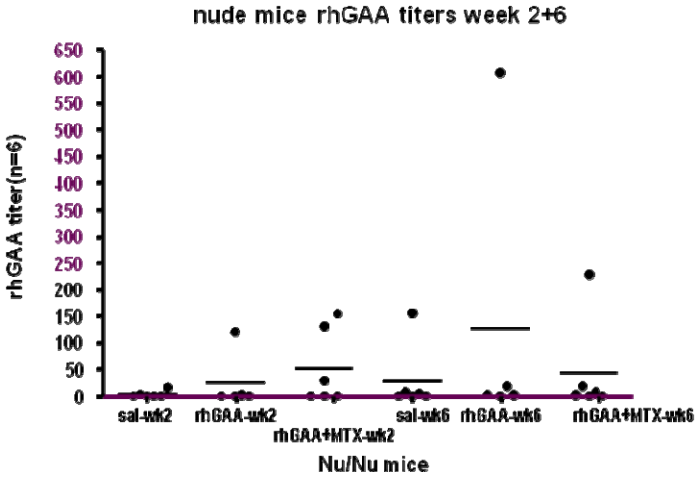



**FIG. 37B**

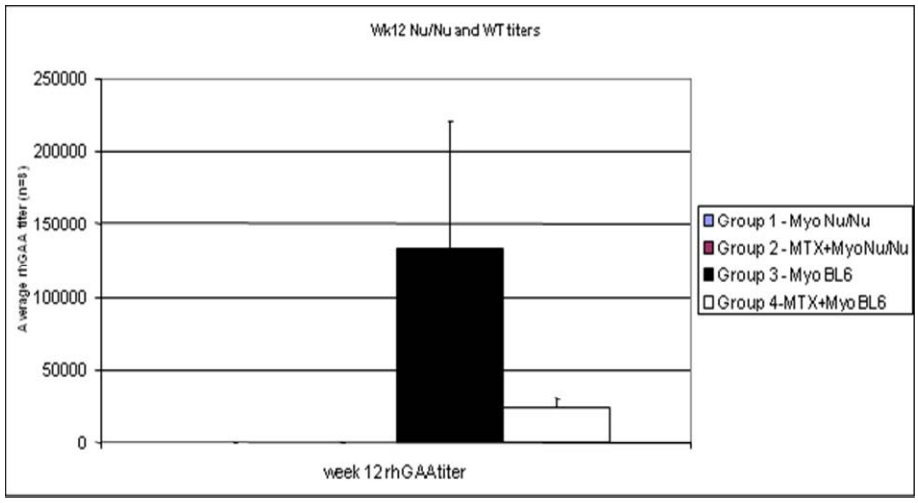
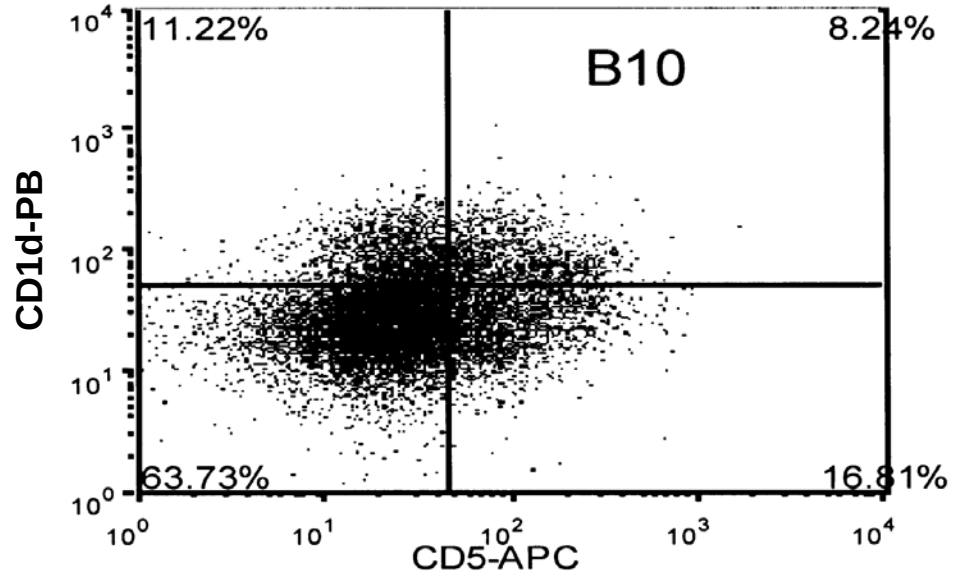


**Figure 38A**


11.22%
B10
8.24%
63.73%
16.81%
CD1d-PB
CD5-APC
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$

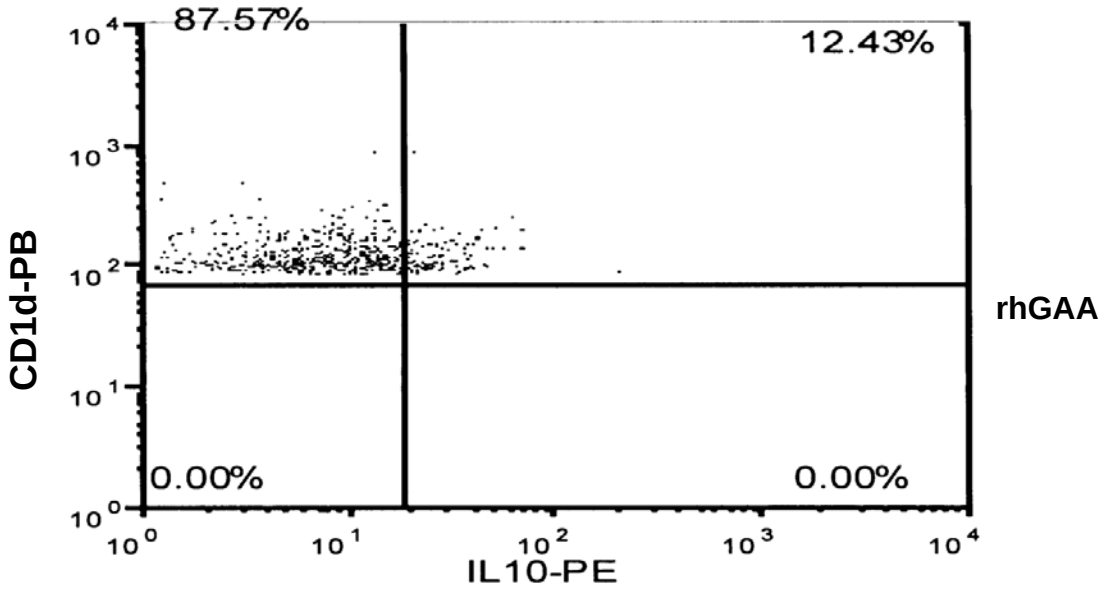

87.57%
12.43%
0.00%
0.00%
CD1d-PB
IL10-PE
rhGAA
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$

**Figure 38A, cont'd**

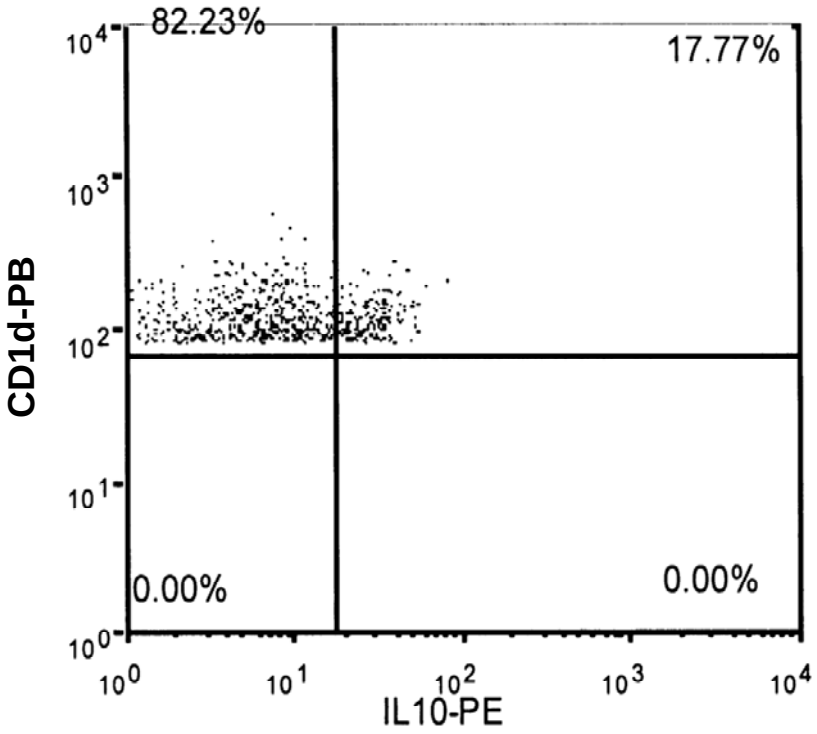



**Figure 38B**

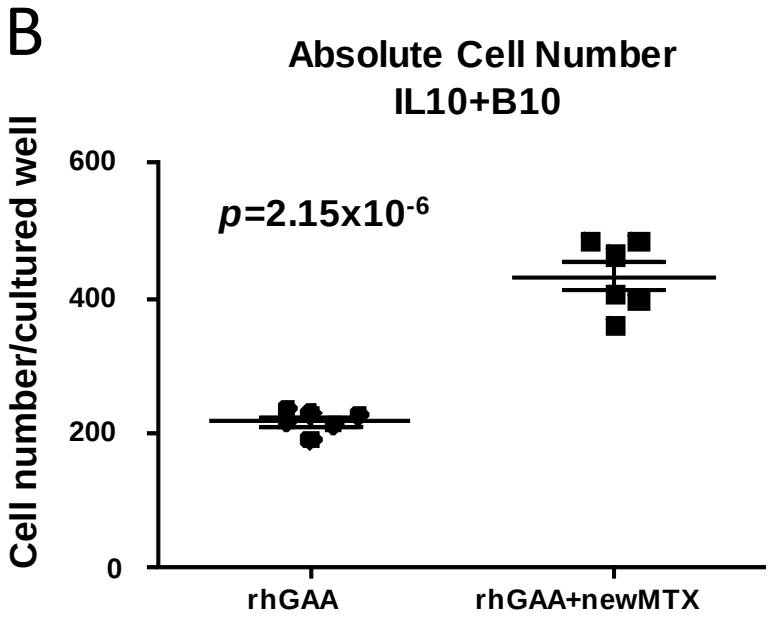


**Figure 39A**

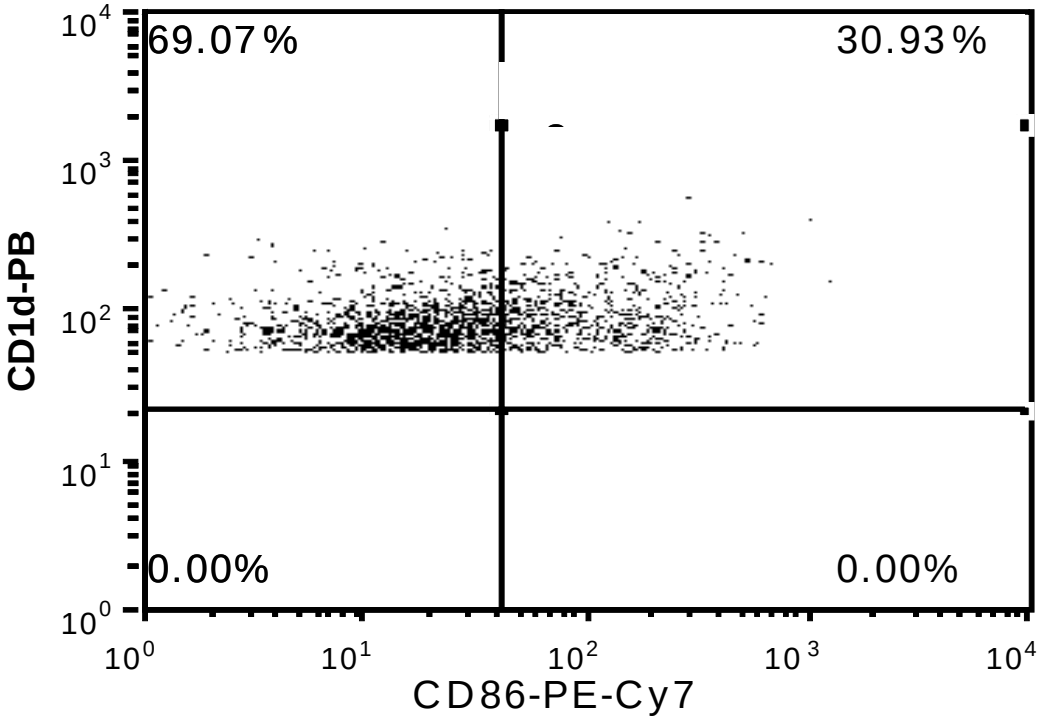



**Figure 39B**

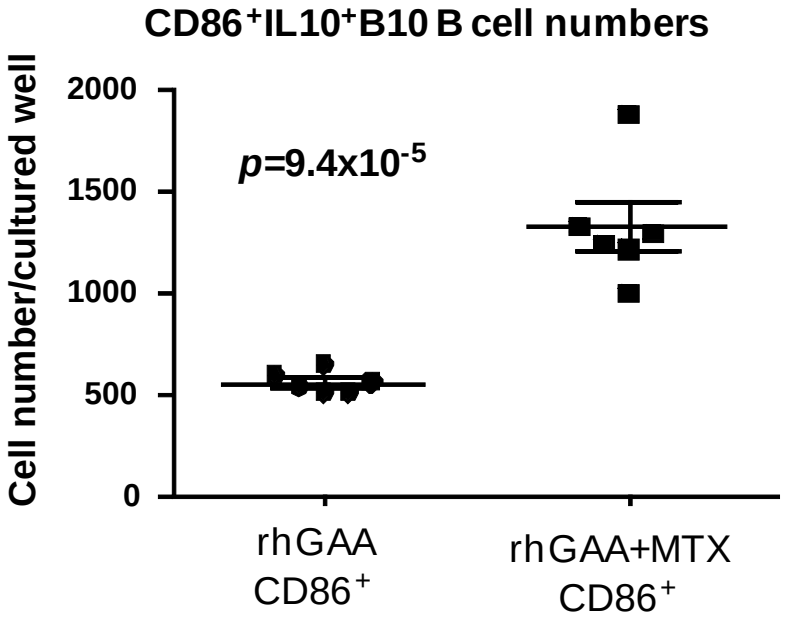


**Figure 39B, cont'd**

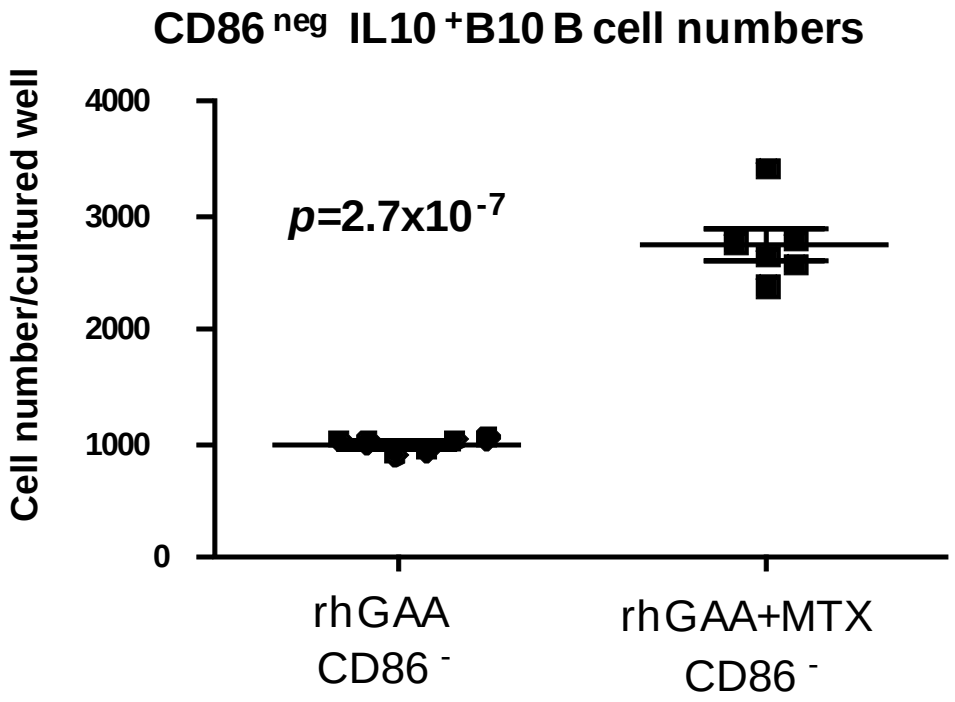
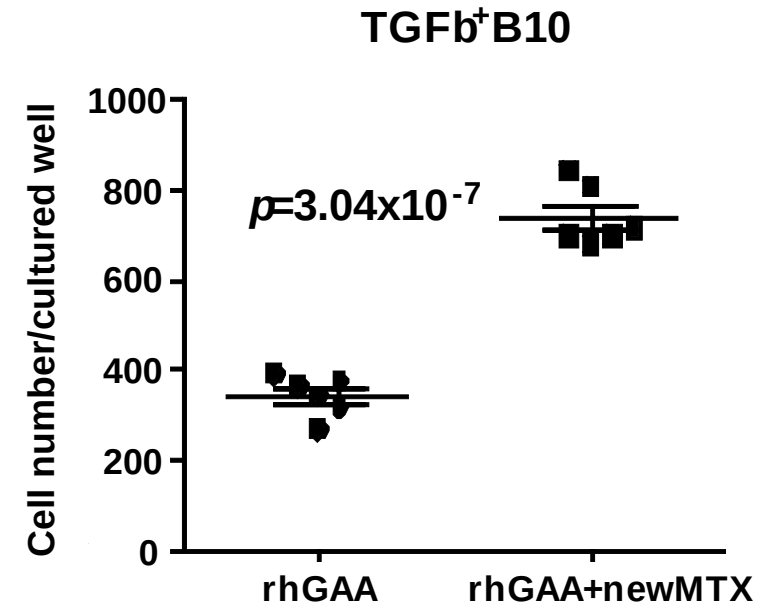


**Figure 40A**


TGFb+B10
Cell number/cultured well
1000
800
600
400
200
0
p=3.04x10-7
rhGAA
rhGAA+newMTX

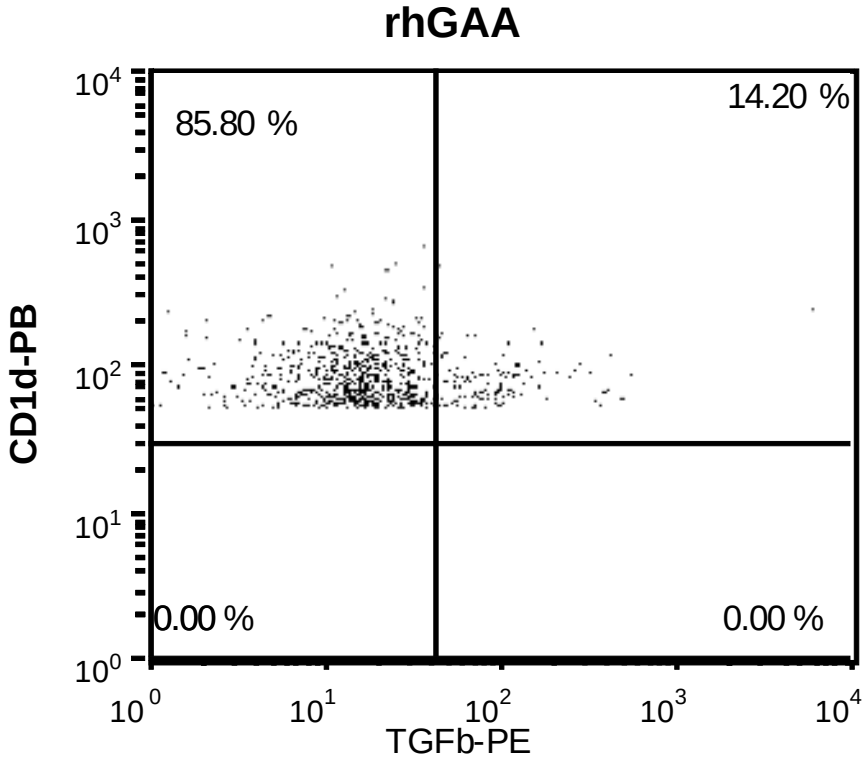

rhGAA
CD1d-PB
TGFb-PE
85.80 %
14.20 %
0.00 %
0.00 %
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

**Figure 40A, cont'd**

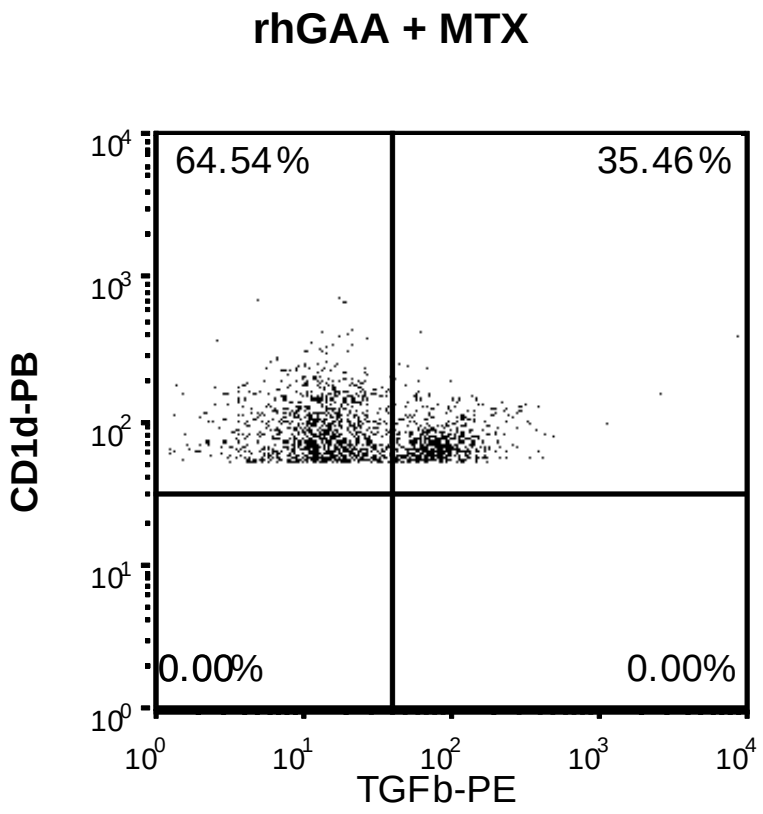


**Figure 40B**

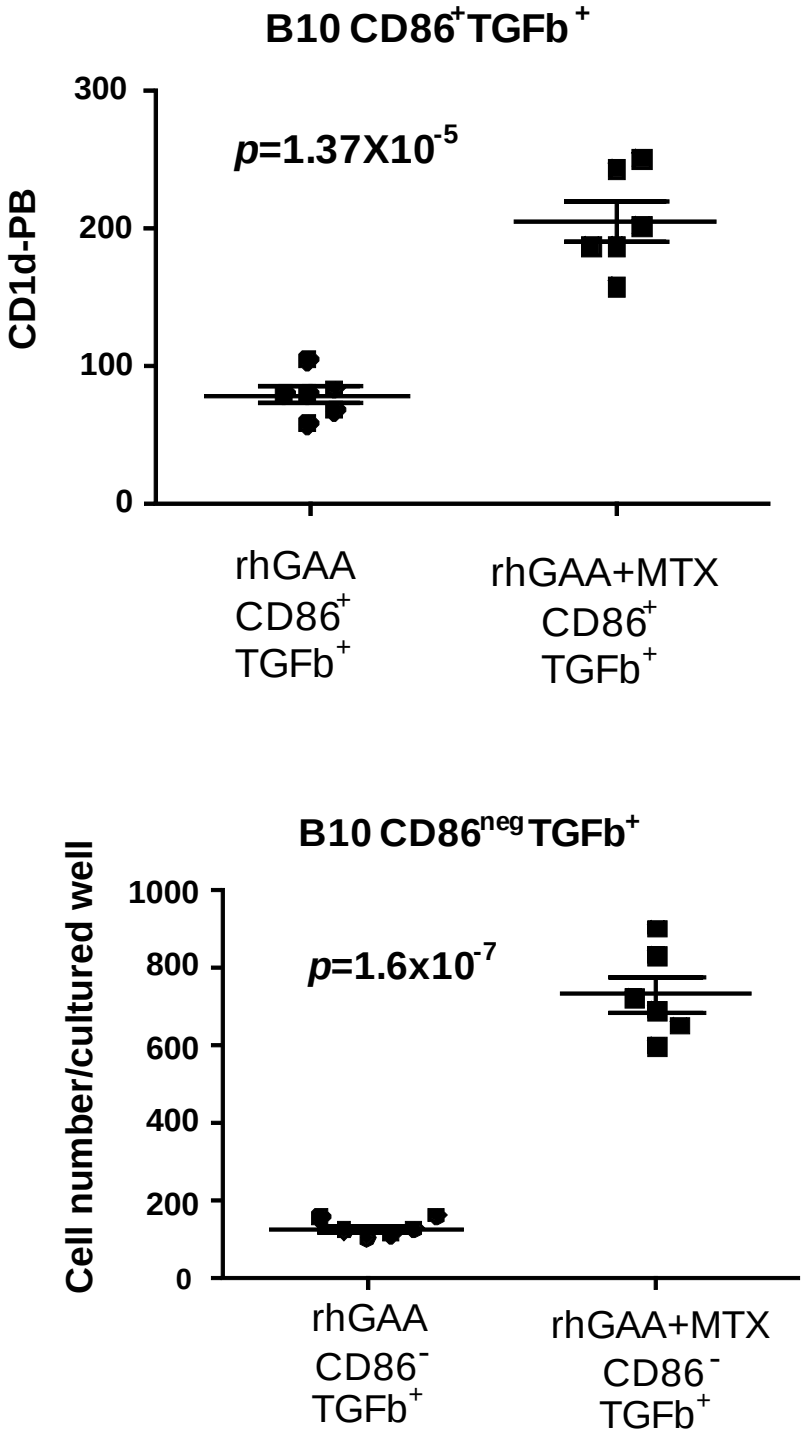

B10 CD86+TGFb+
CD1d-PB
300
200
100
0
p=1.37X10-5
rhGAA
CD86+
TGFb+
rhGAA+MTX
CD86+
TGFb+
B10 CD86negTGFb+
Cell number/cultured well
1000
800
600
400
200
0
p=1.6x10-7
rhGAA
CD86-
TGFb+
rhGAA+MTX
CD86-
TGFb+

**Figure 41A**

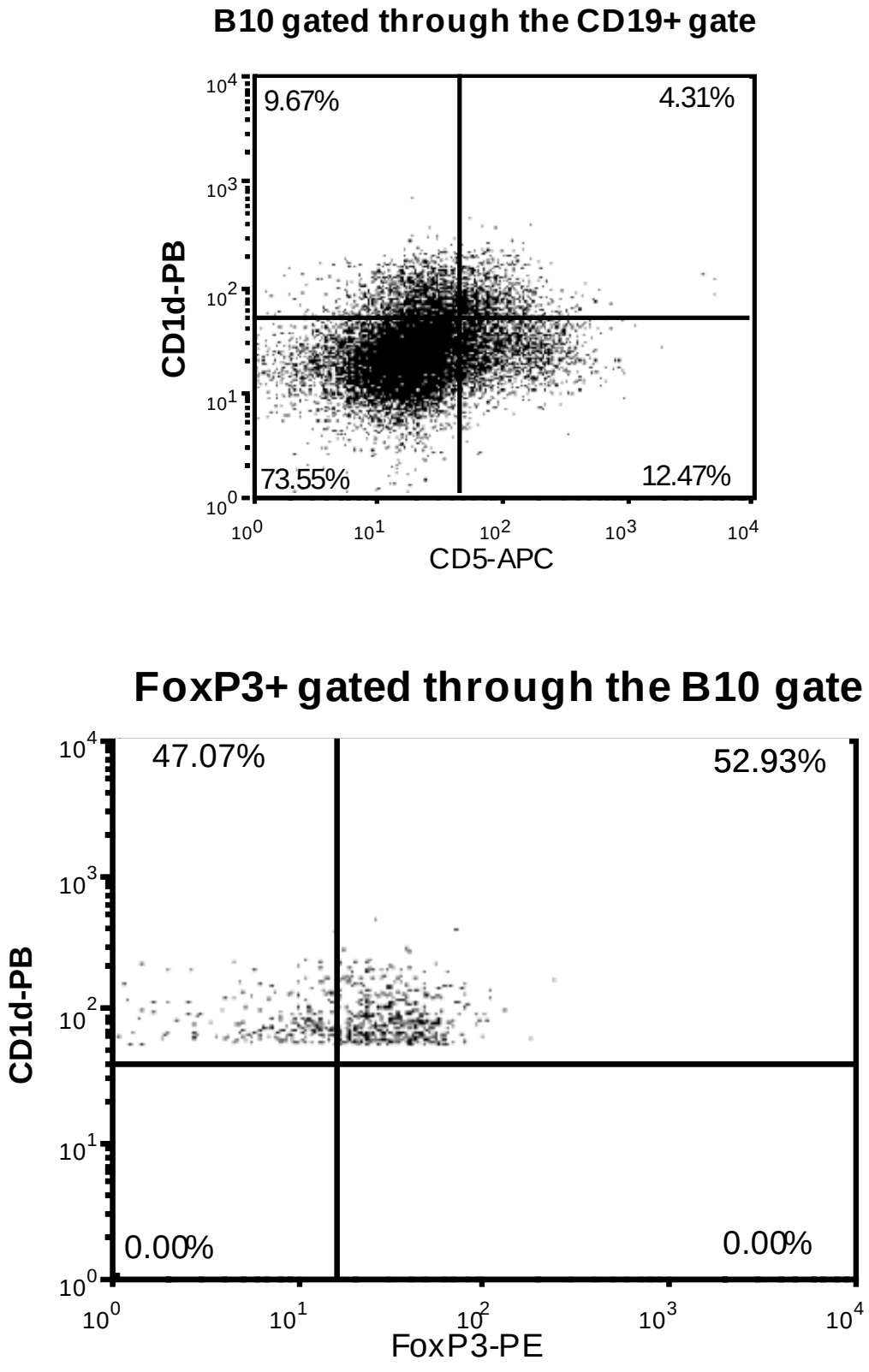

B10 gated through the CD19+ gate
9.67%
4.31%
73.55%
12.47%
CD1d-PB
CD5-APC
FoxP3+ gated through the B10 gate
47.07%
52.93%
0.00%
0.00%
CD1d-PB
FoxP3-PE

**Figure 41A, cont'd**

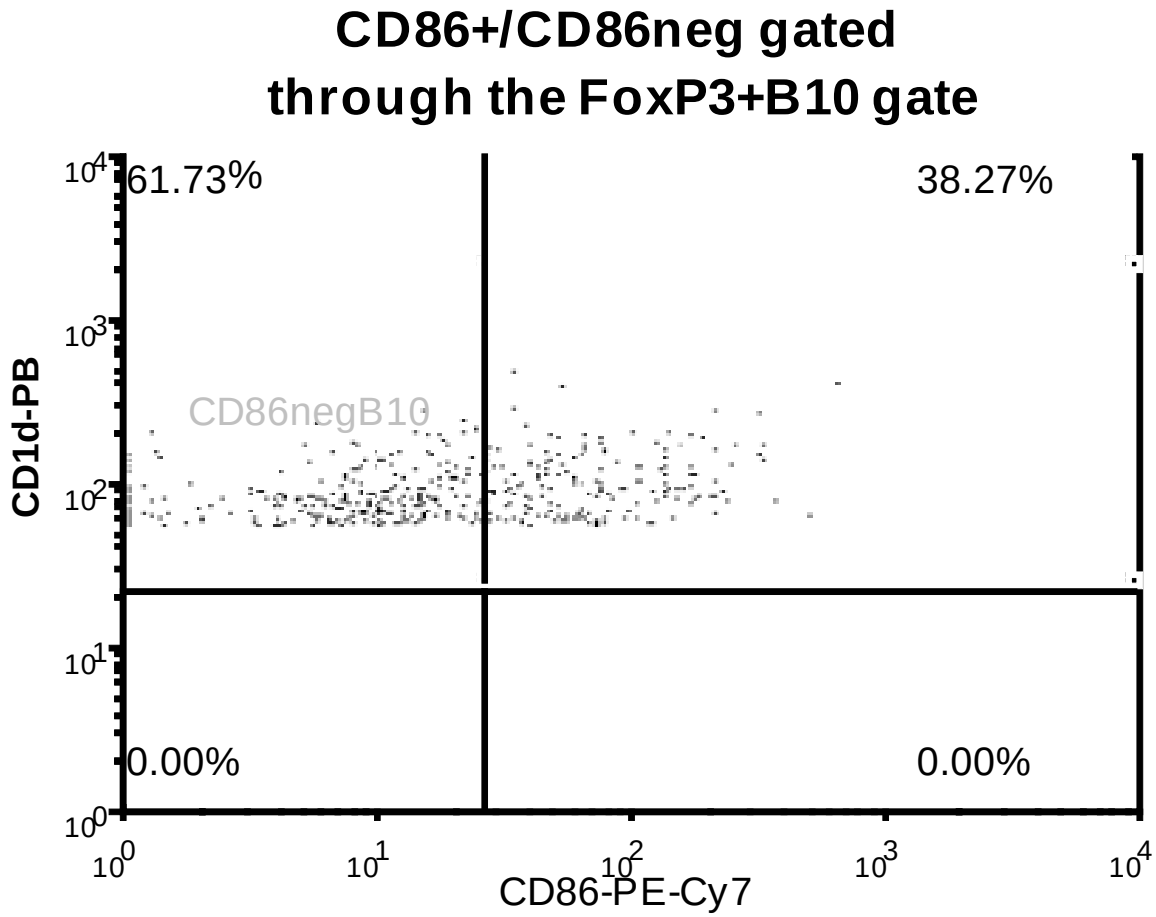


**Figure 41B**

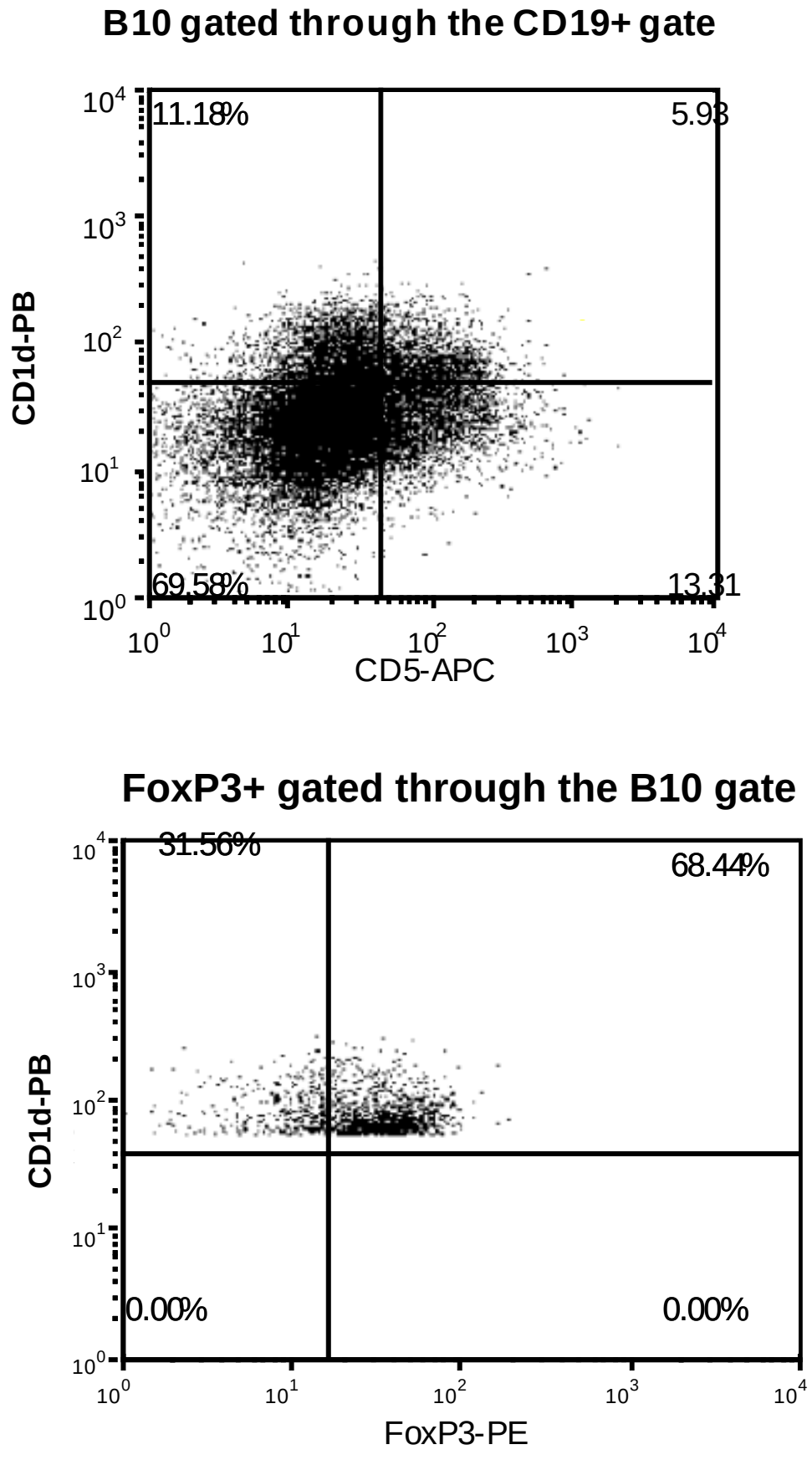

B10 gated through the CD19+ gate
11.18%
5.93
69.58%
13.31
CD1d-PB
CD5-APC
FoxP3+ gated through the B10 gate
31.56%
68.44%
0.00%
0.00%
CD1d-PB
FoxP3-PE

**Figure 41B, cont'd**

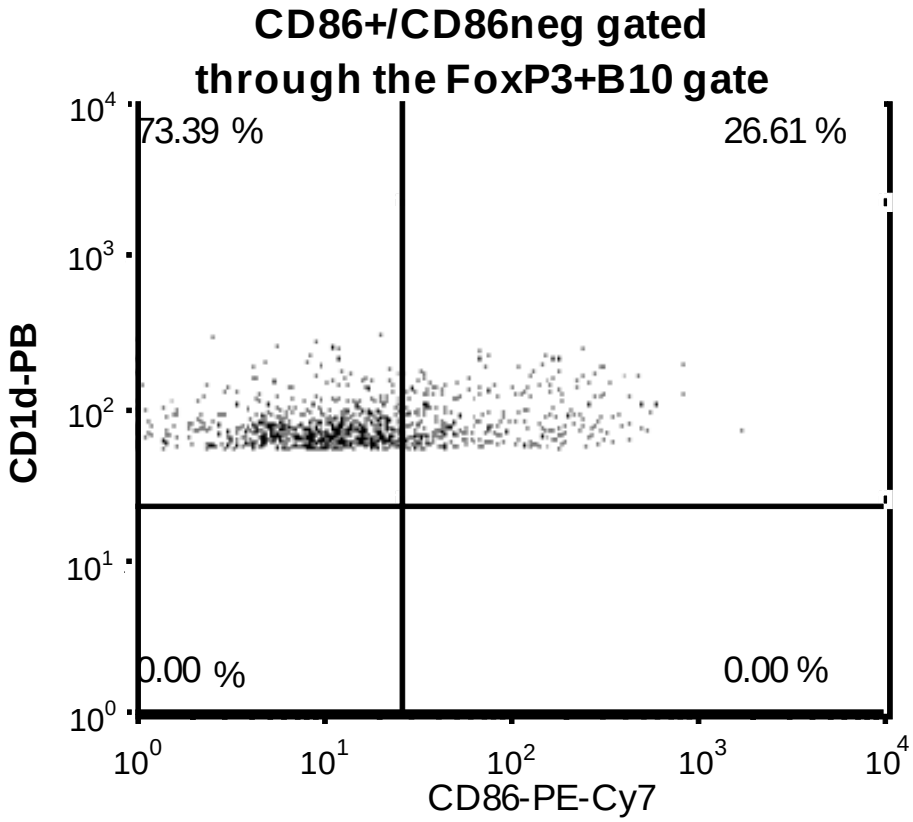


**Figure 41C**

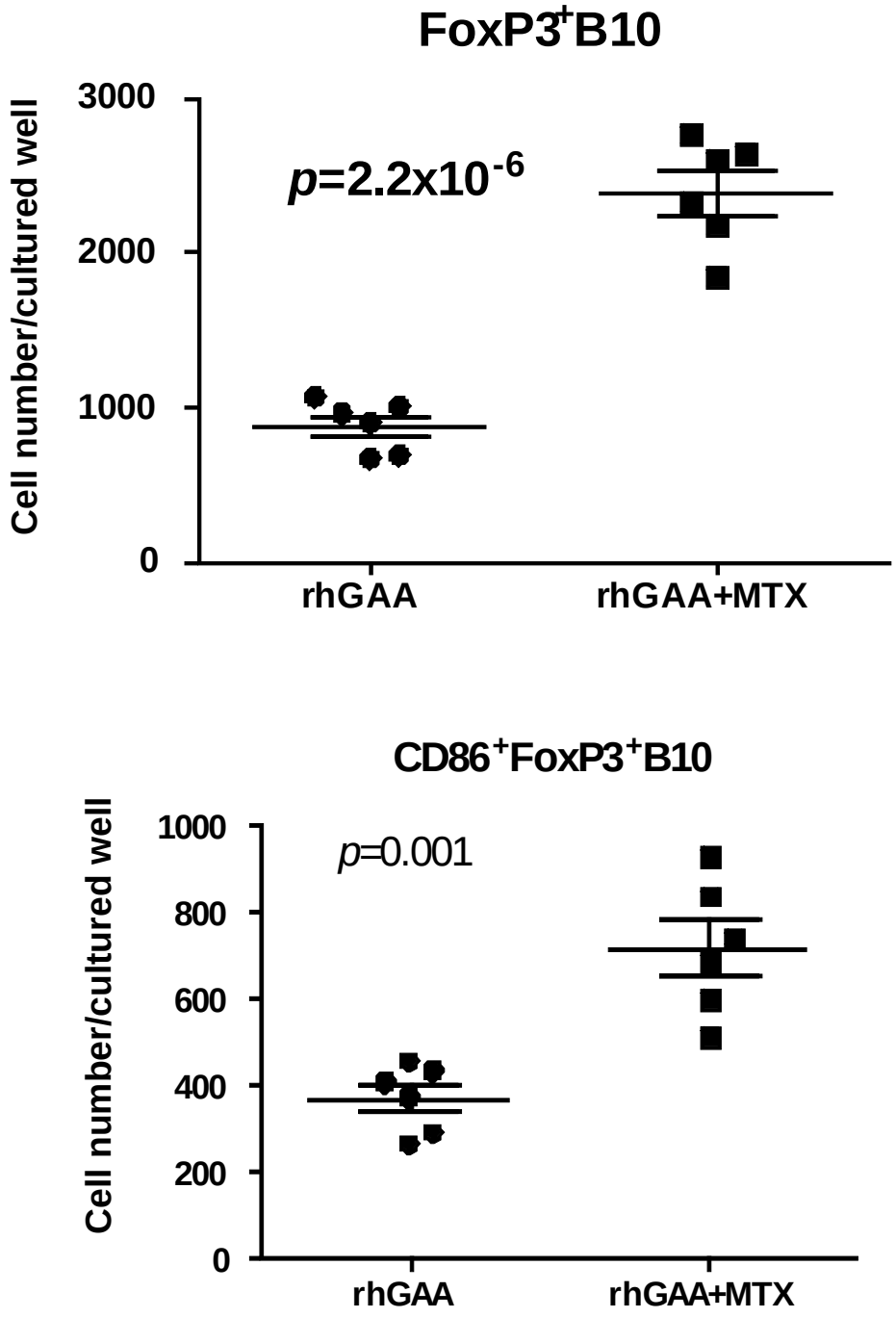

FoxP3+B10
Cell number/cultured well
3000
2000
1000
0
p=2.2x10-6
rhGAA
rhGAA+MTX
CD86+FoxP3+B10
Cell number/cultured well
1000
800
600
400
200
0
p=0.001
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figure 41C, cont'd**

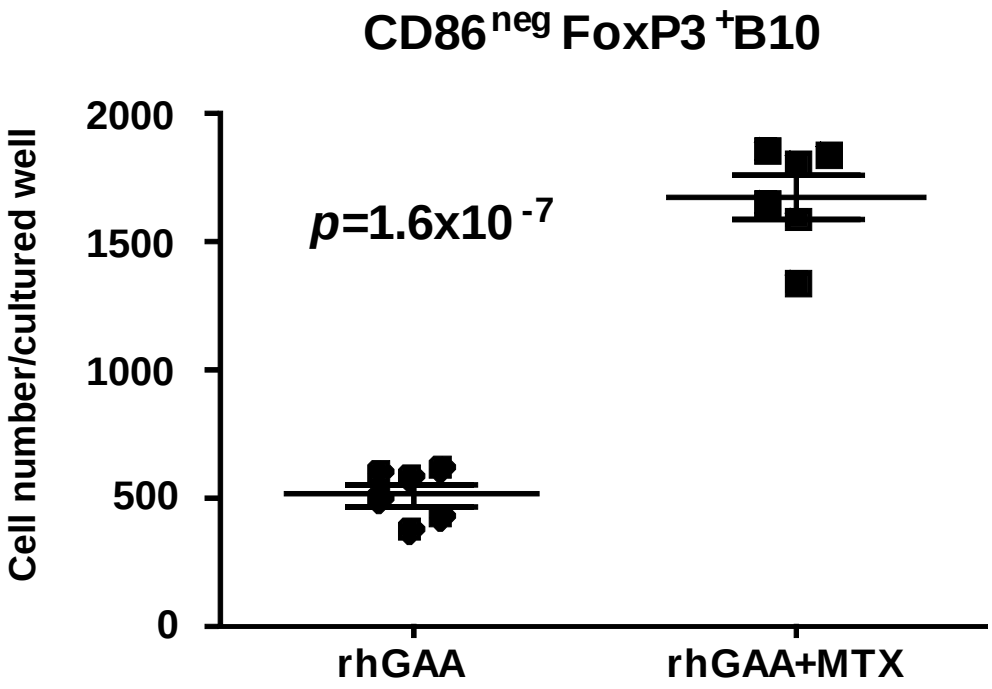


**Figure 42A**

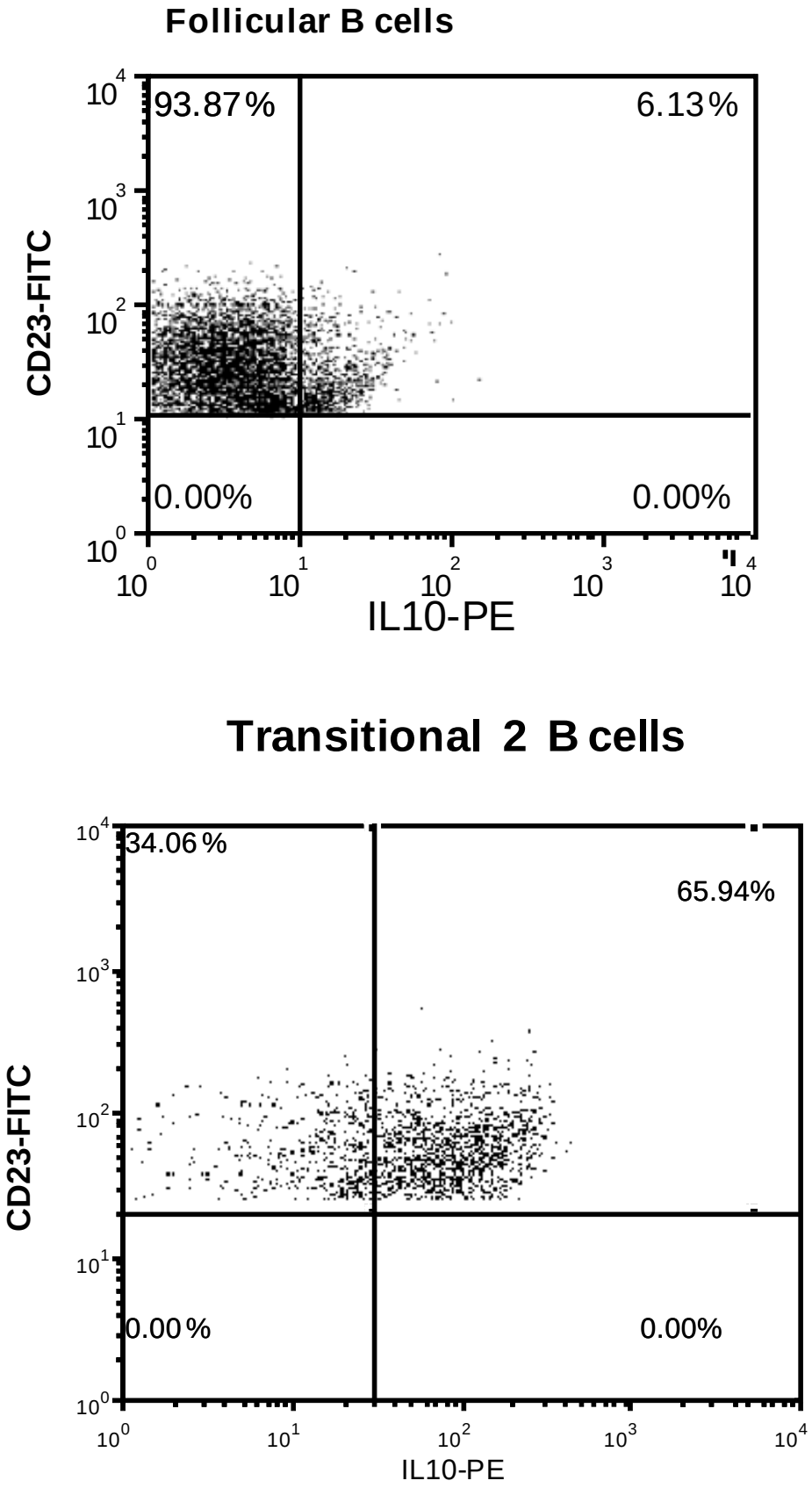

Follicular B cells
93.87%
6.13%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
IL10-PE
Transitional 2 B cells
34.06%
65.94%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
IL10-PE

**Figure 42A, cont'd**

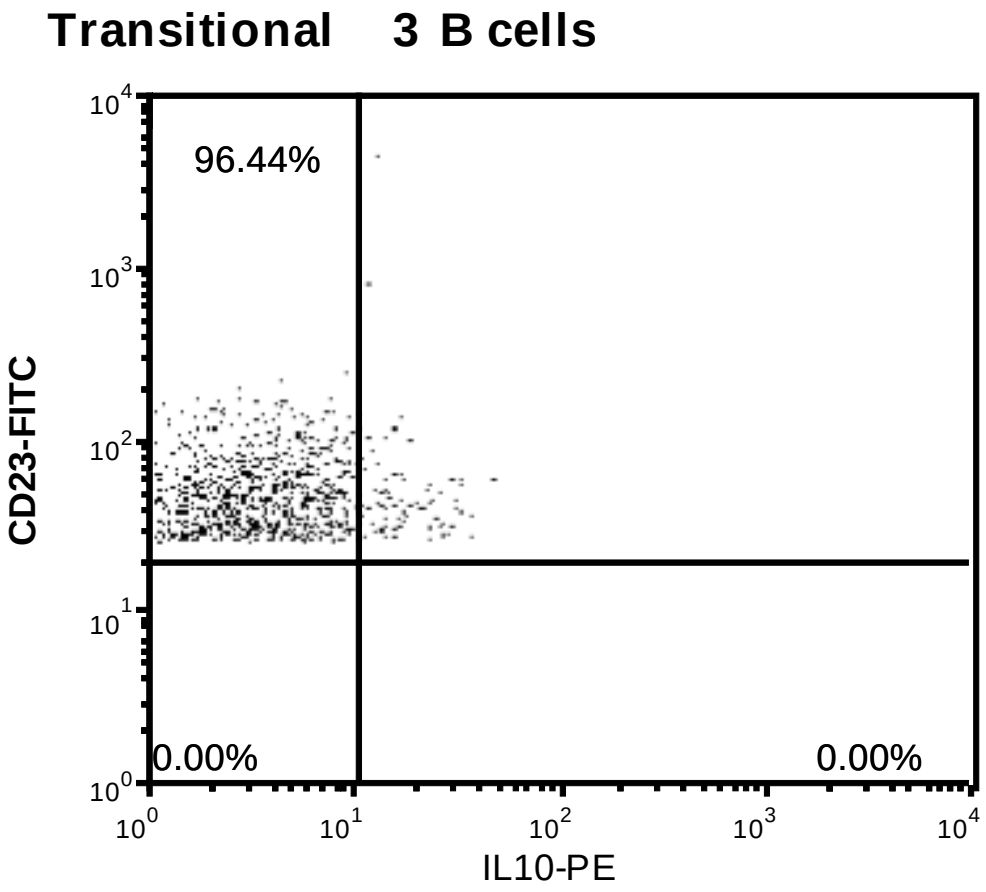


**Figure 42B**

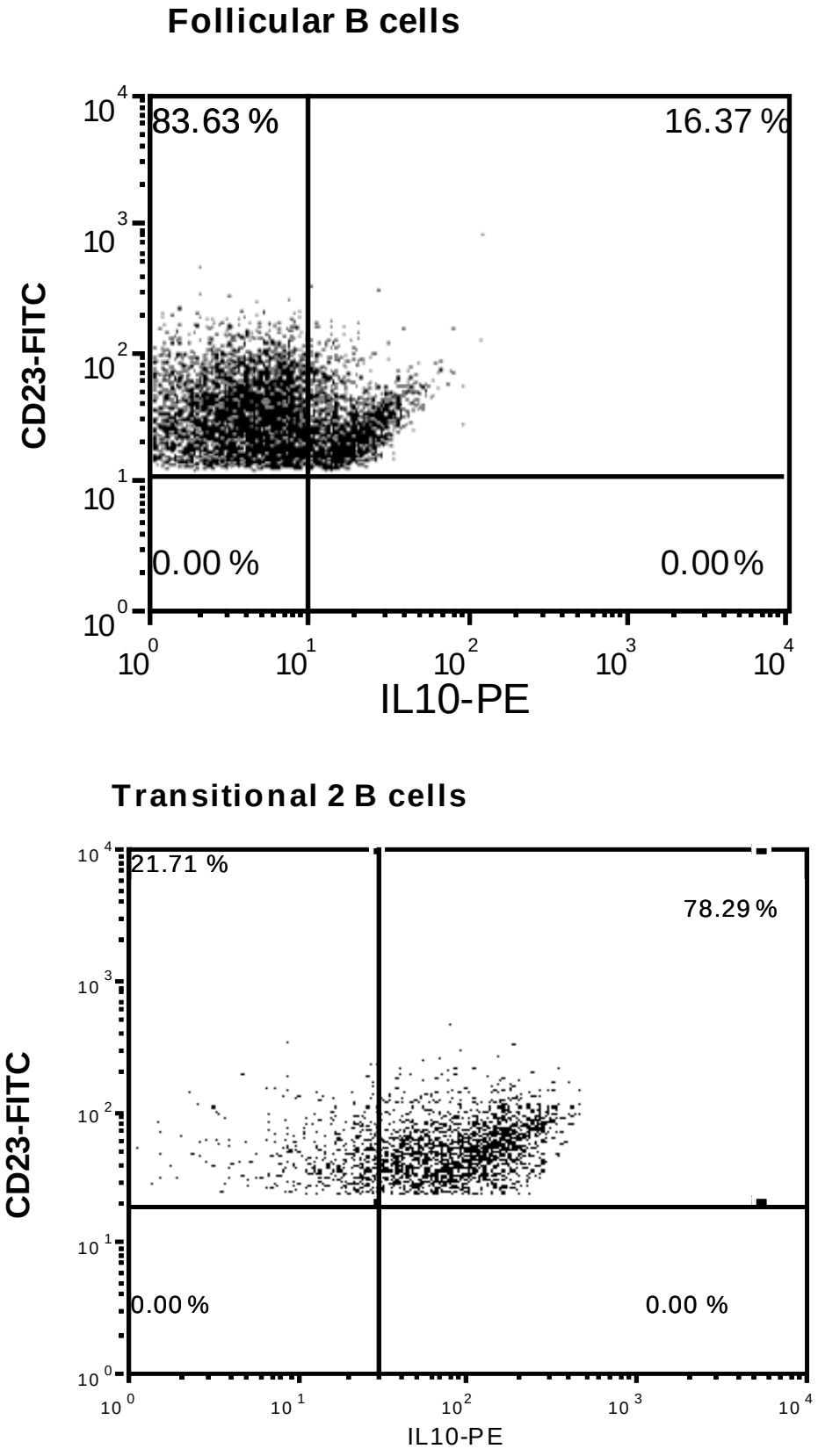

Follicular B cells
83.63 %
16.37 %
0.00 %
0.00 %
CD23-FITC
IL10-PE
Transitional 2 B cells
21.71 %
78.29 %
0.00 %
0.00 %
CD23-FITC
IL10-PE

**Figure 42B, cont'd**

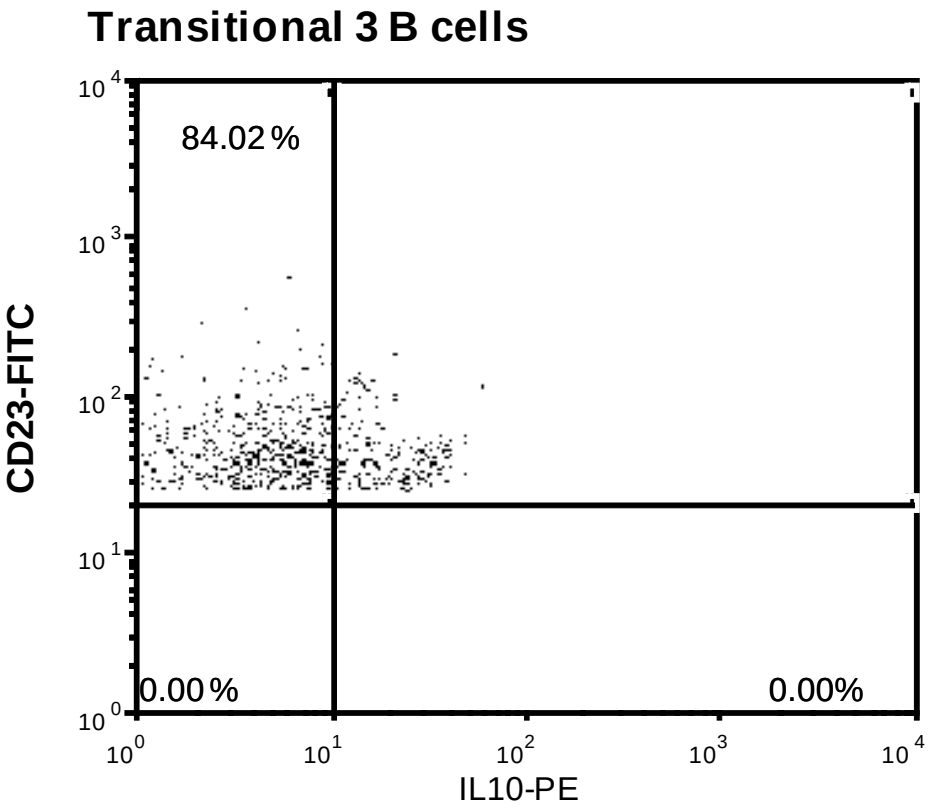


**Figure 42C**

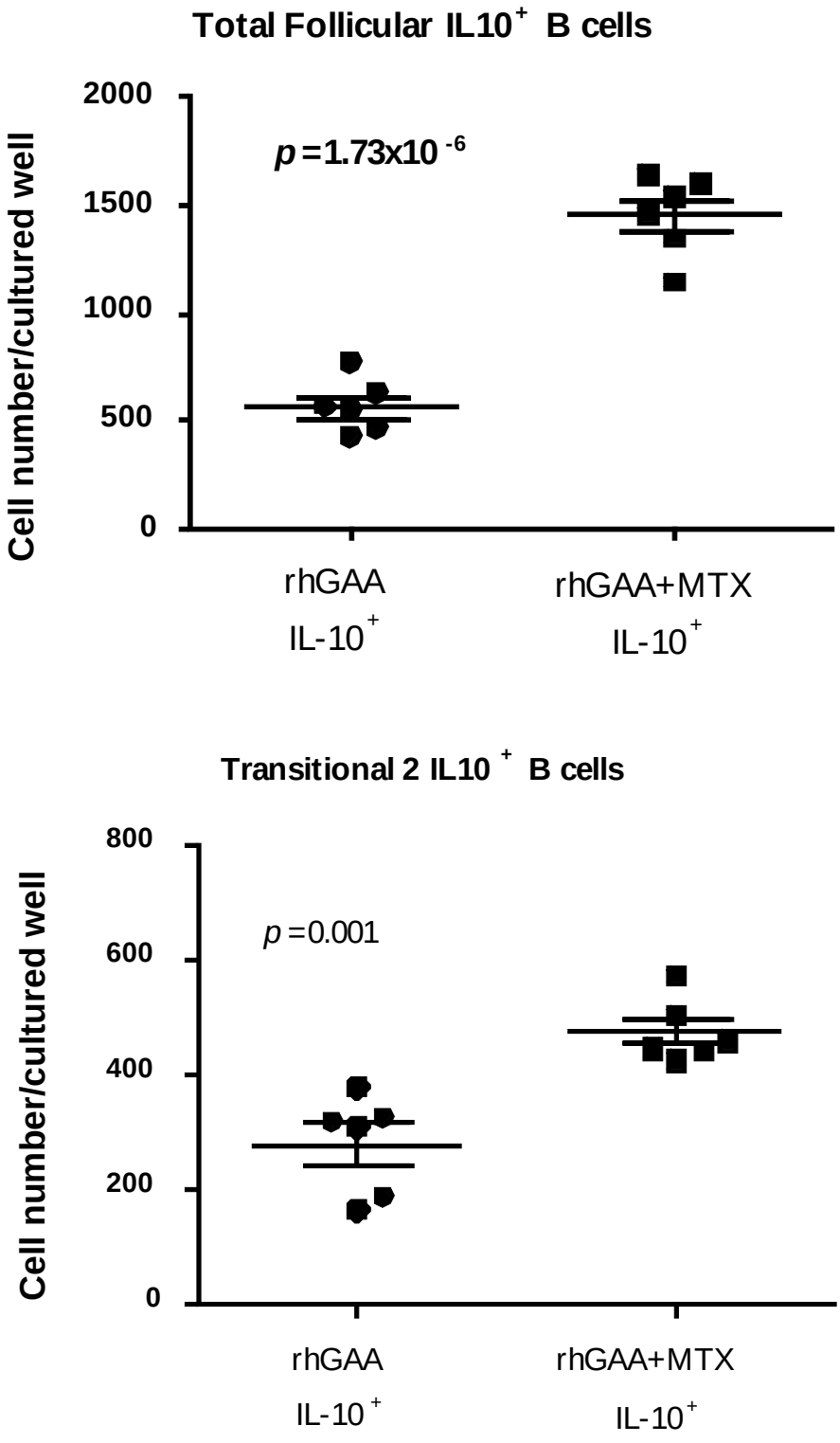

Total Follicular IL10+ B cells
Cell number/cultured well
2000
1500
1000
500
0
p =1.73x10 -6
rhGAA
IL-10+
rhGAA+MTX
IL-10+
Transitional 2 IL10 + B cells
Cell number/cultured well
800
600
400
200
0
p =0.001
rhGAA
IL-10+
rhGAA+MTX
IL-10+

**Figure 42C, cont'd**

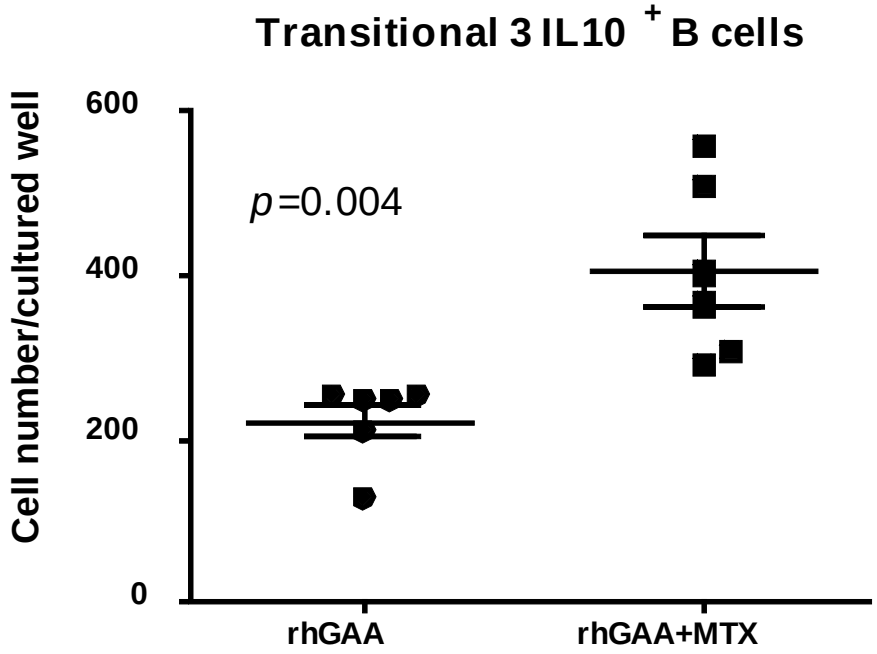


**Figure 43A**

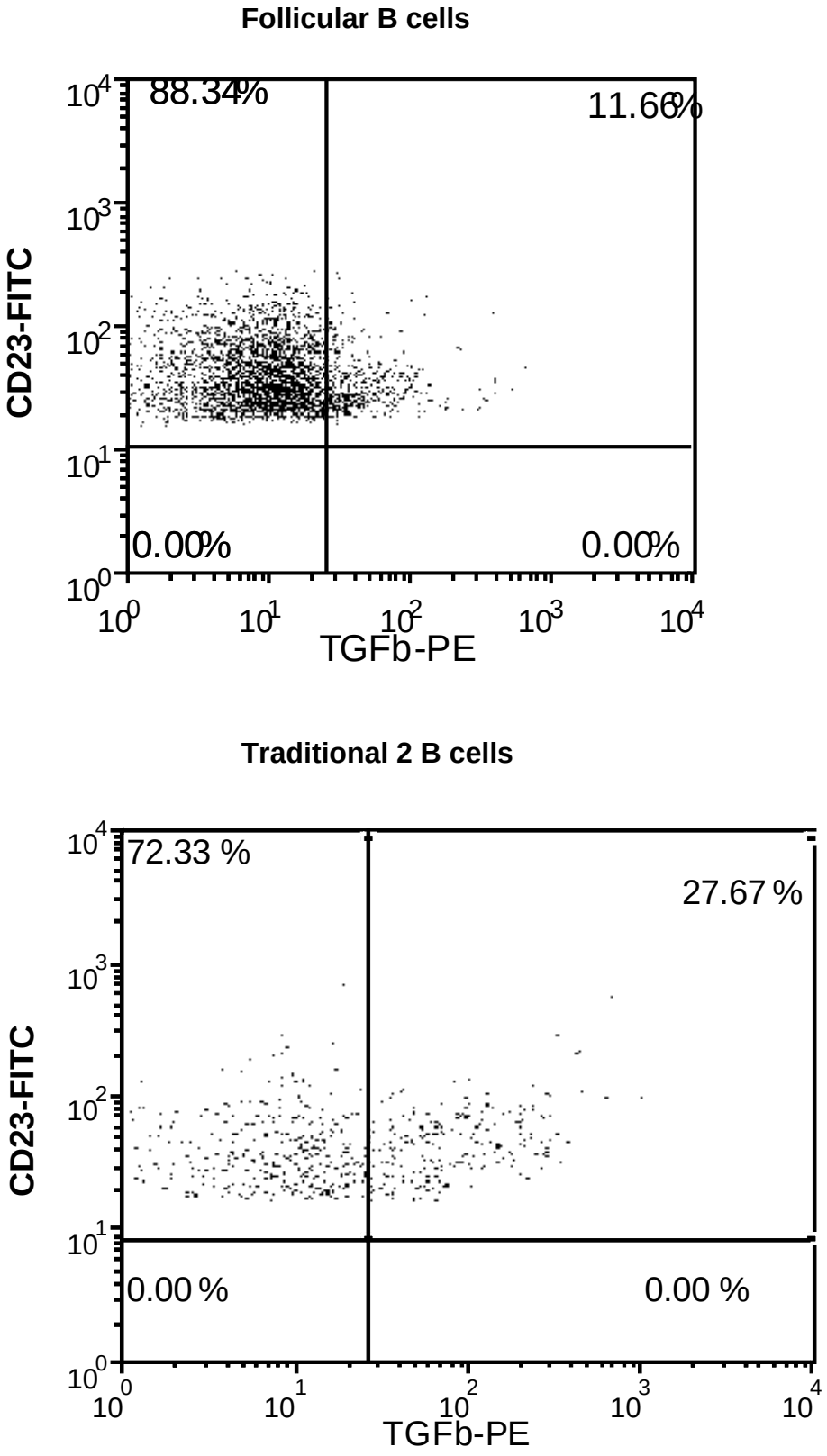

Follicular B cells
88.34%
11.66%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
TGFb-PE
Traditional 2 B cells
72.33 %
27.67 %
0.00 %
0.00 %
CD23-FITC
TGFb-PE

**Figure 43A, cont'd**

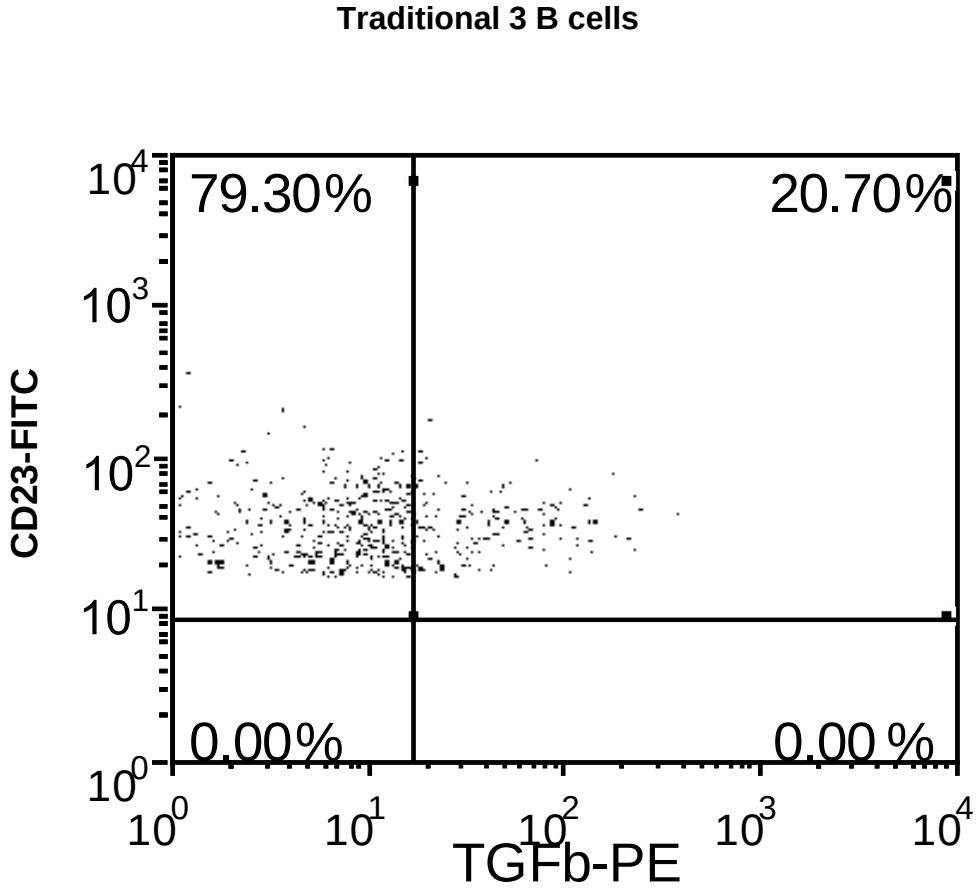


**Figure 43B**

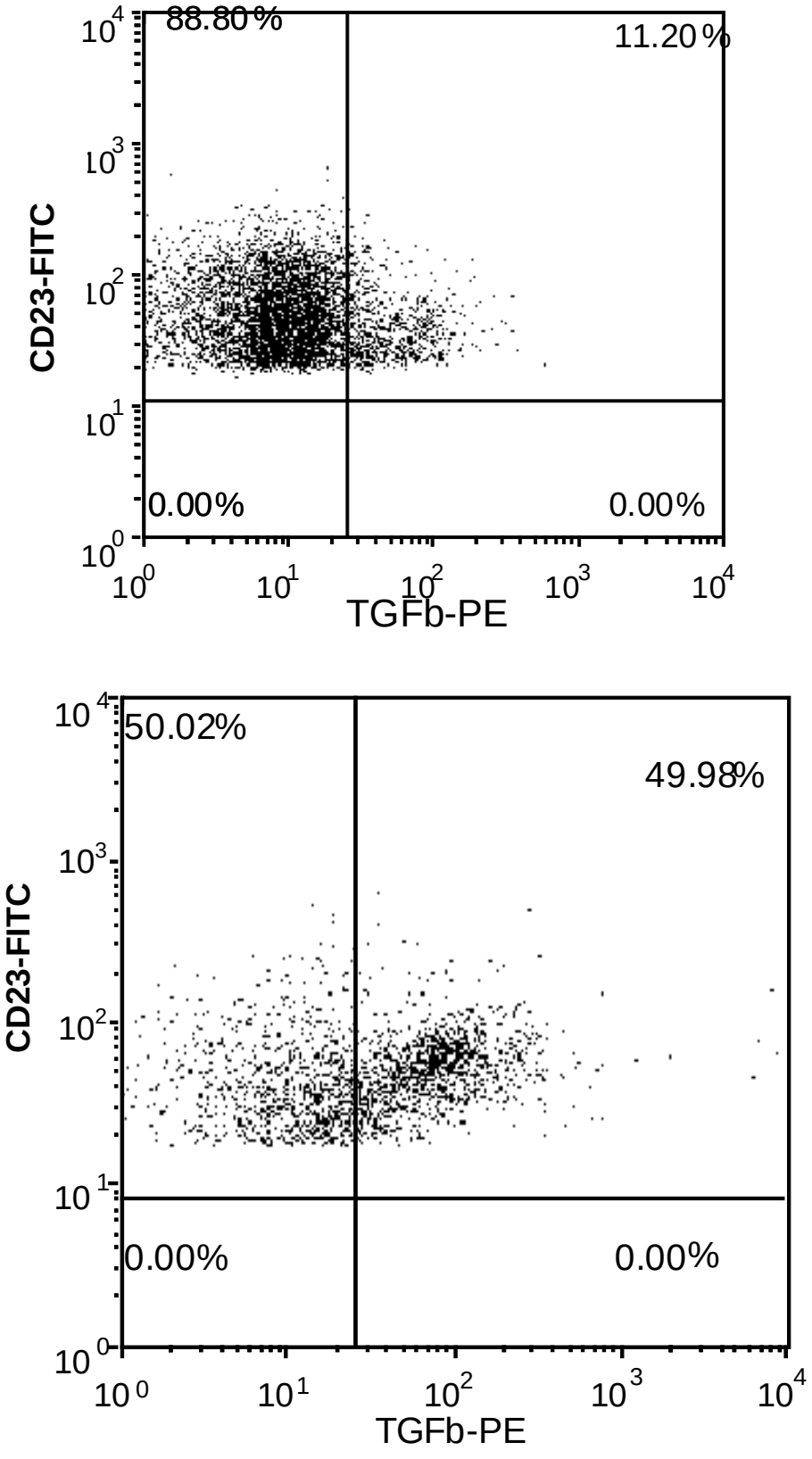

88.80%
11.20%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
TGFb-PE
50.02%
49.98%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
TGFb-PE

**Figure 43B, cont'd**

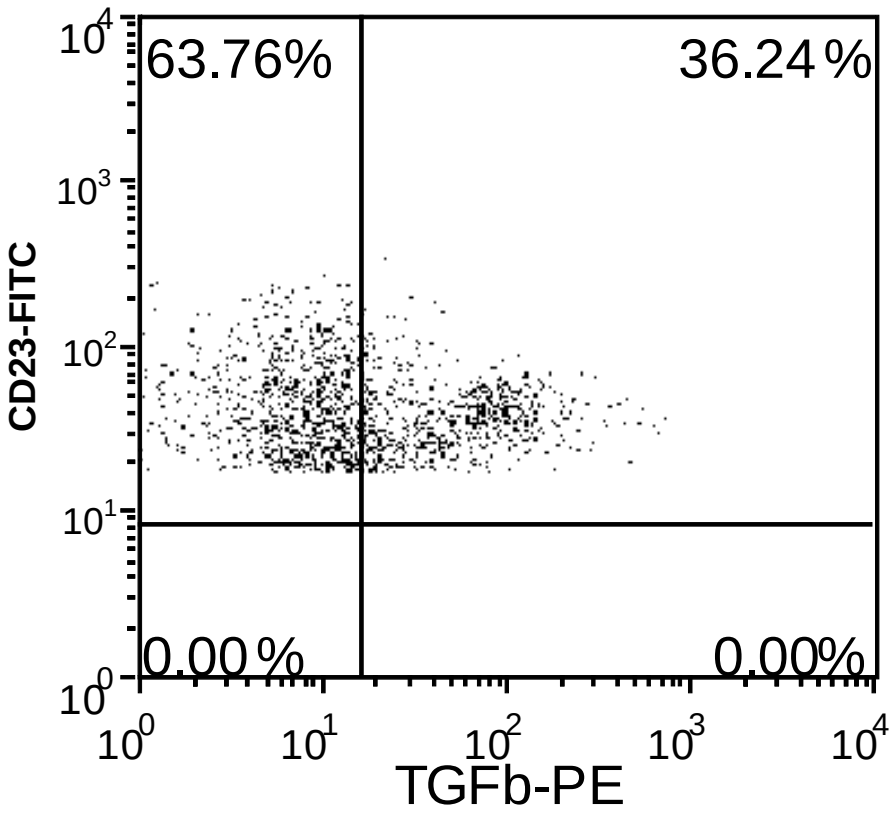
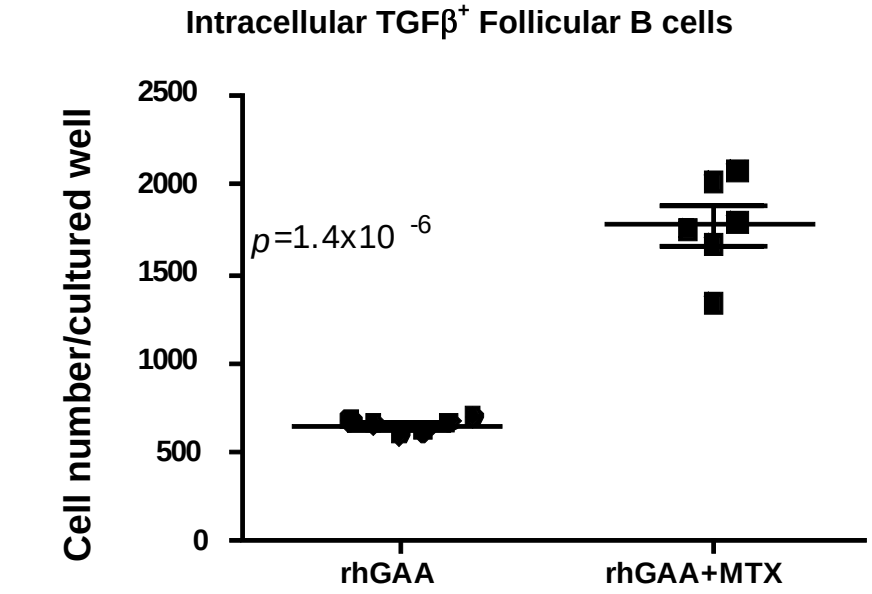


**Figure 43C**


Intracellular TGFβ+ Follicular B cells
Cell number/cultured well
2500
2000
1500
1000
500
0
p=1.4x10 -6
rhGAA
rhGAA+MTX

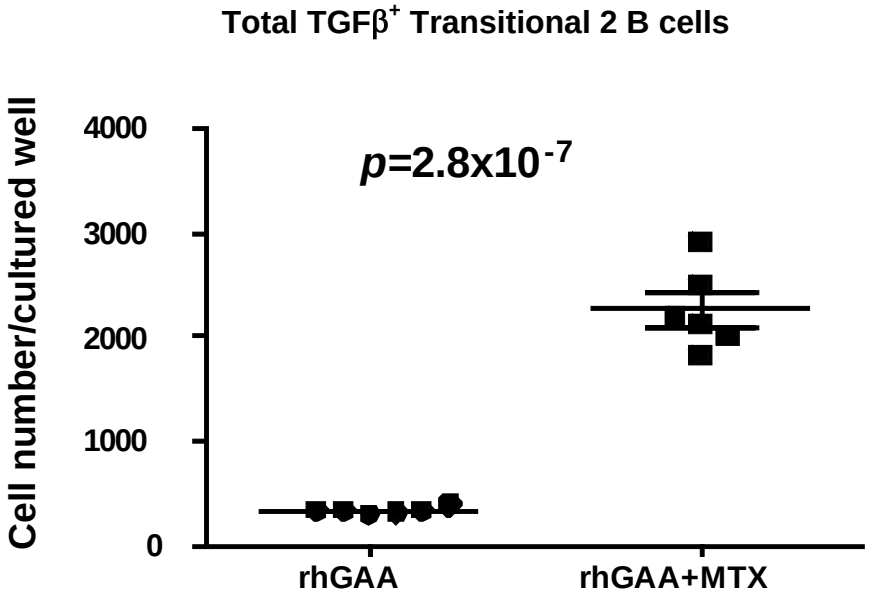

Total TGFβ+ Transitional 2 B cells
Cell number/cultured well
4000
3000
2000
1000
0
p=2.8x10-7
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figure 43C, cont'd**

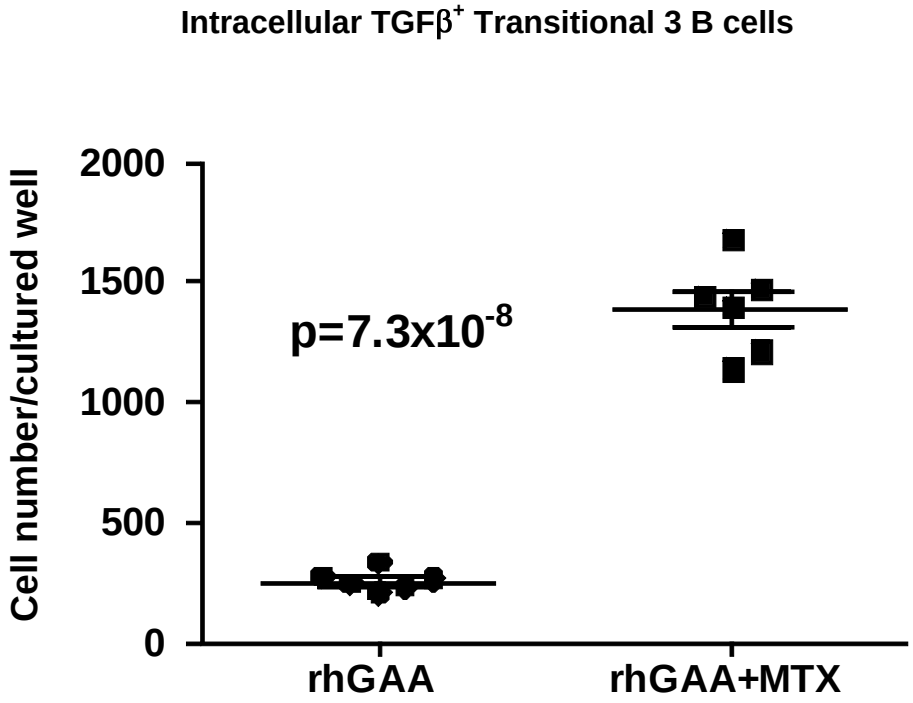
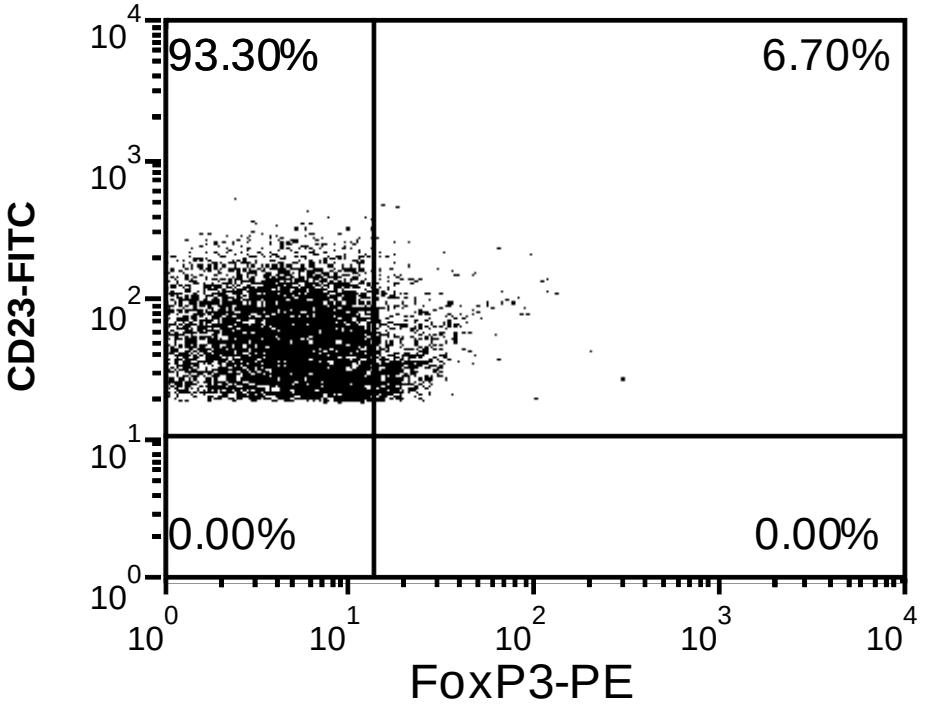


**Figure 44A**

**Follicular B cells**




**Transitional 2 B cells**

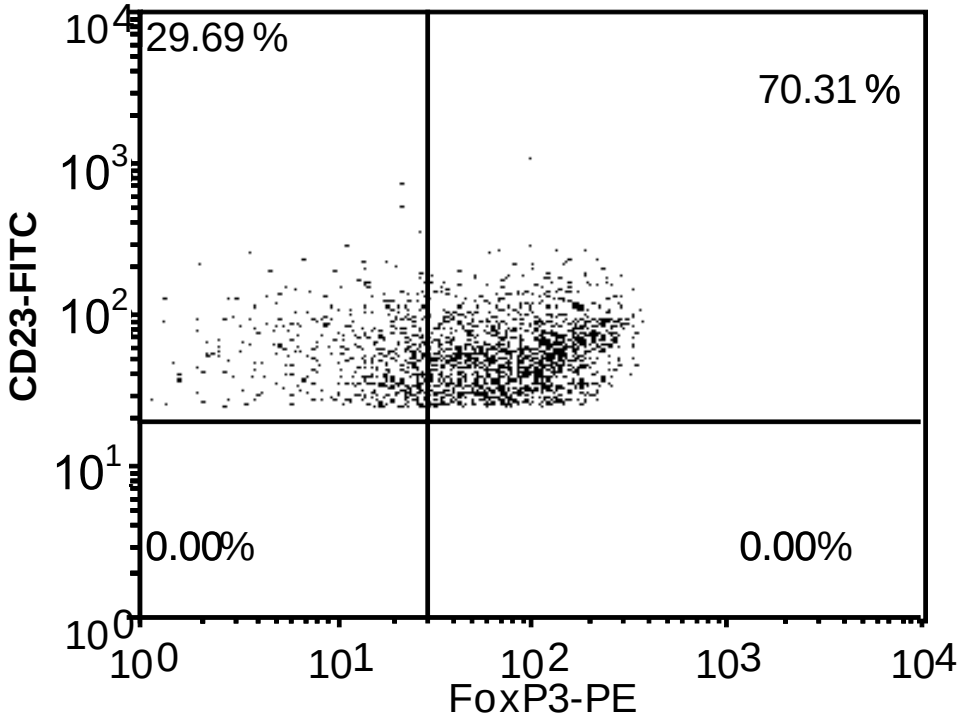


**Figure 44A, cont'd**

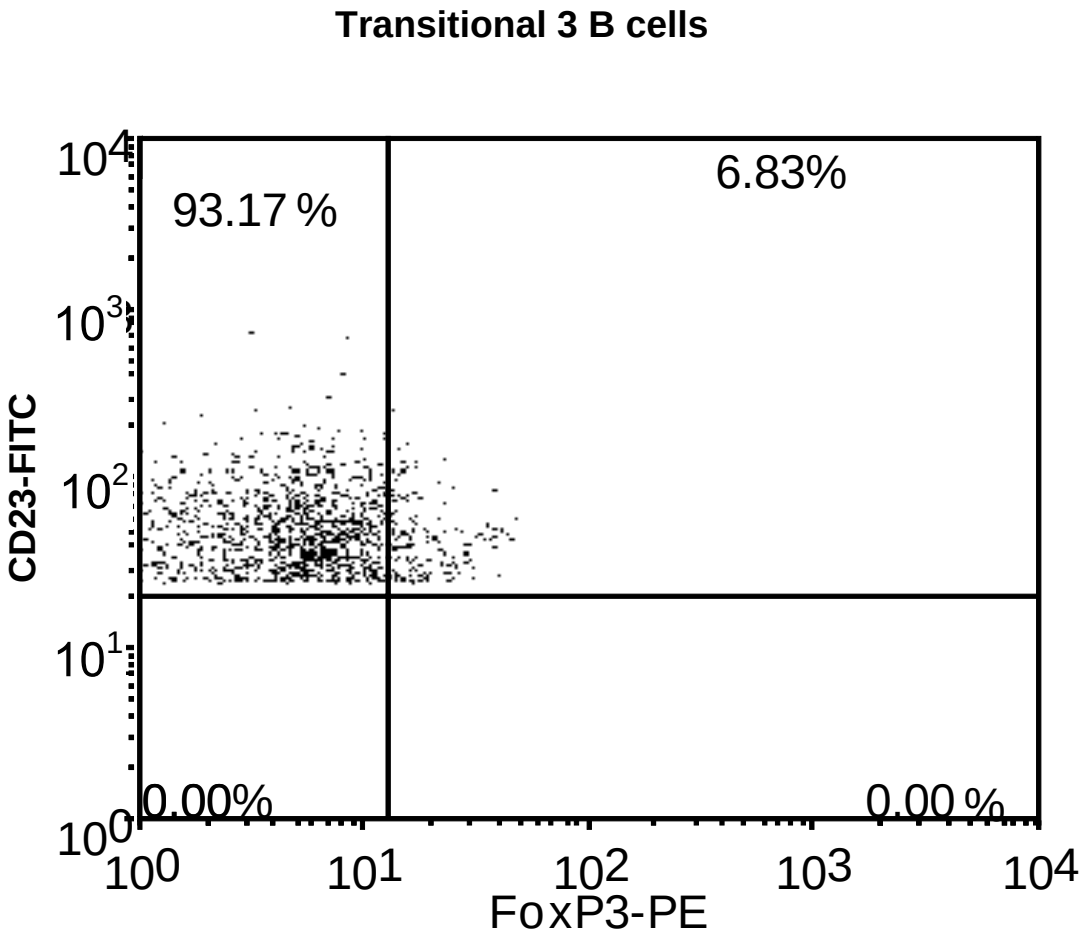
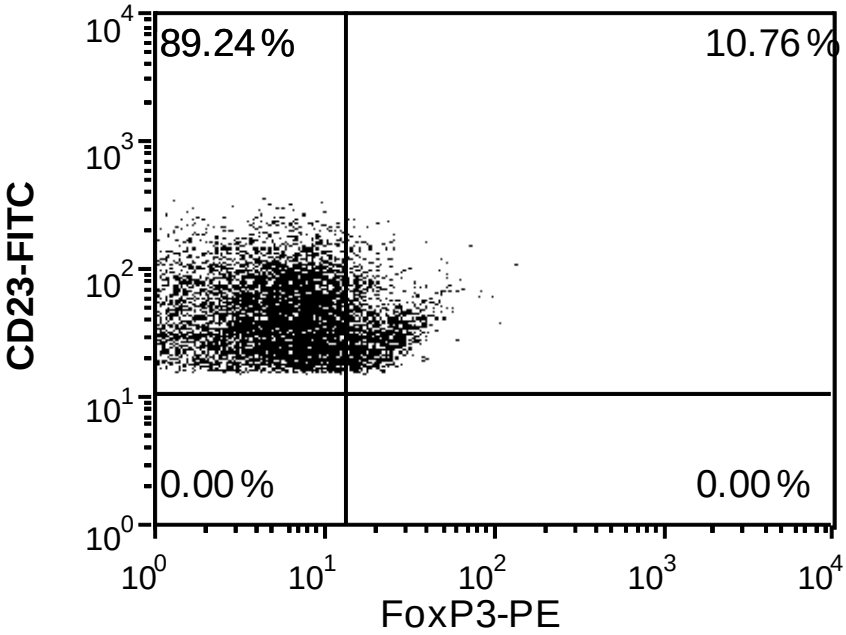


**Figure 44B**


89.24%
10.76%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
FoxP3-PE

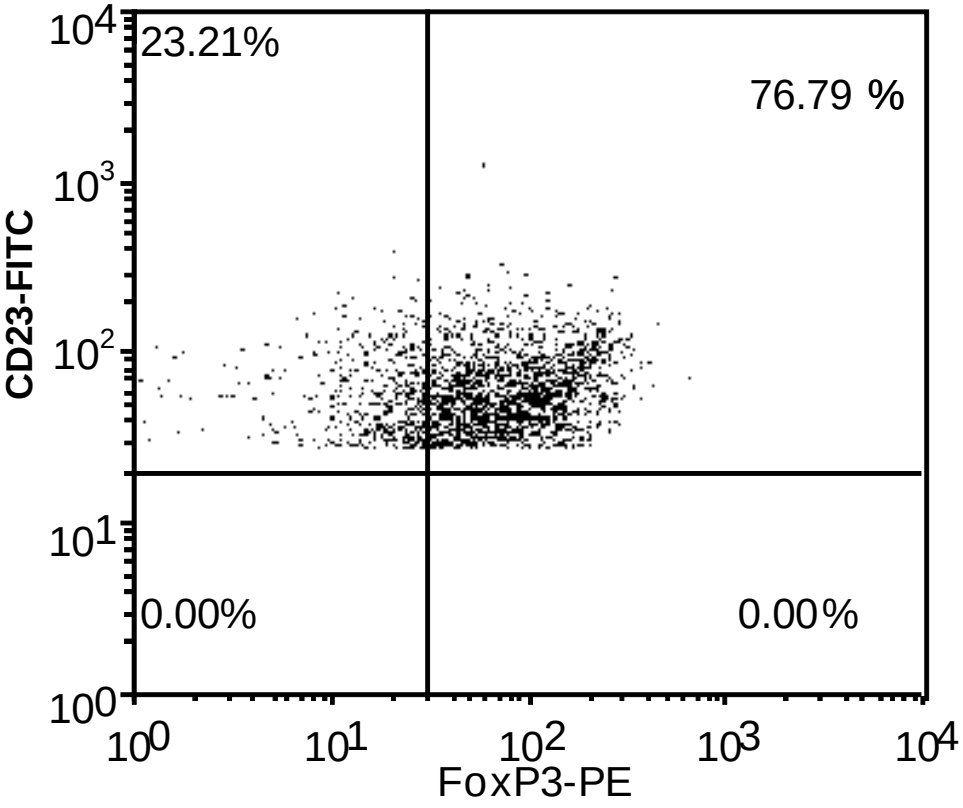

23.21%
76.79 %
0.00%
0.00%
CD23-FITC
FoxP3-PE

**Figure 44B, cont'd**

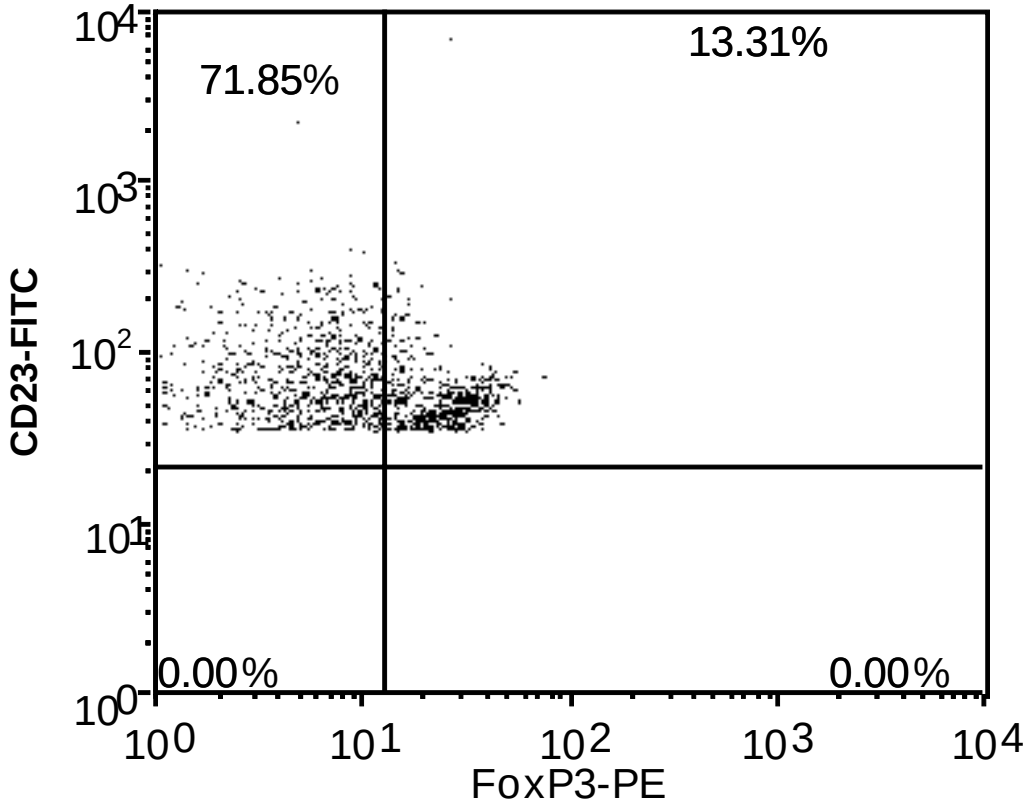
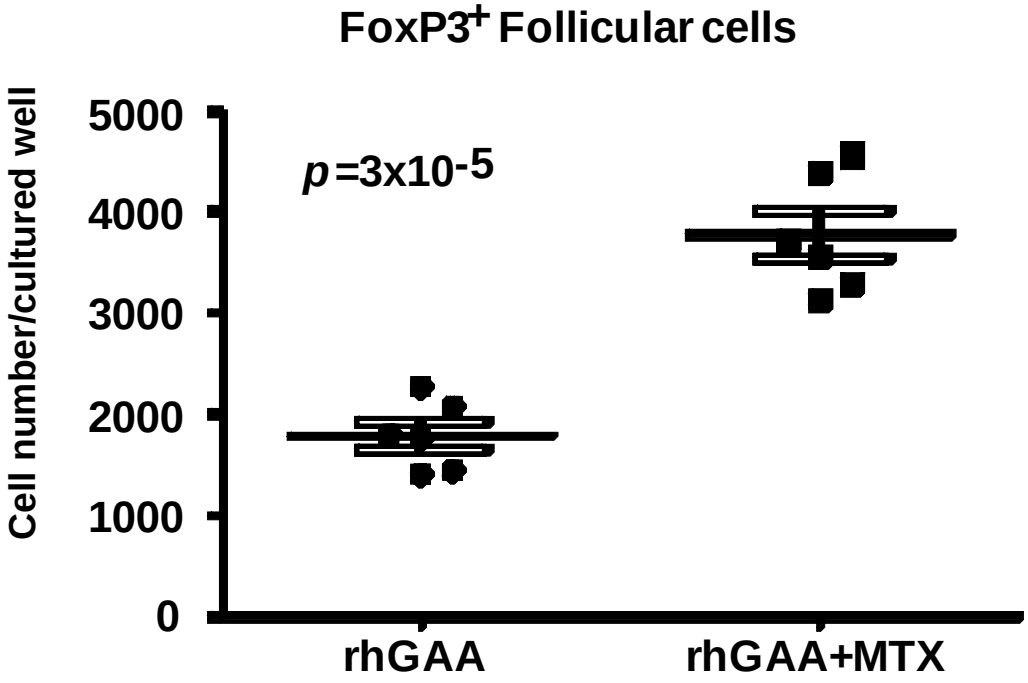


**Figure 44C**


FoxP3+ Follicular cells
Cell number/cultured well
5000
4000
3000
2000
1000
0
p=3x10-5
rhGAA
rhGAA+MTX

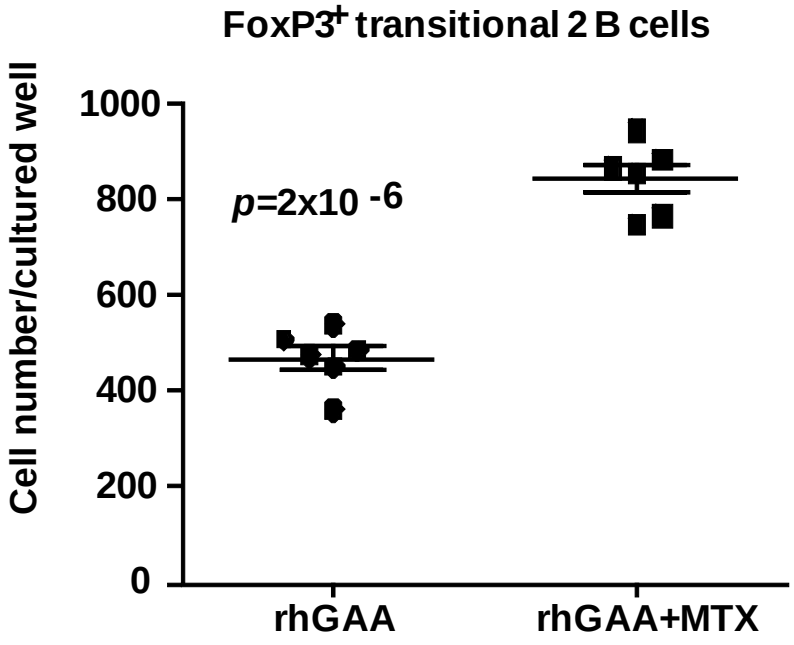

FoxP3+ transitional 2 B cells
Cell number/cultured well
1000
800
600
400
200
0
p=2x10 -6
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figure 44C, cont'd**

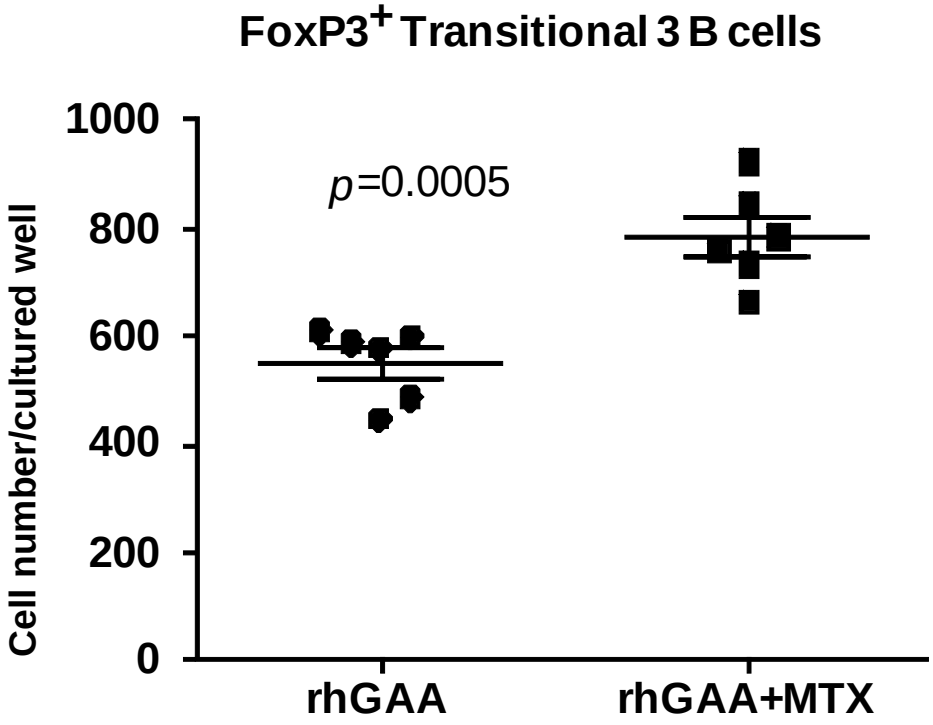


**Figure 45**

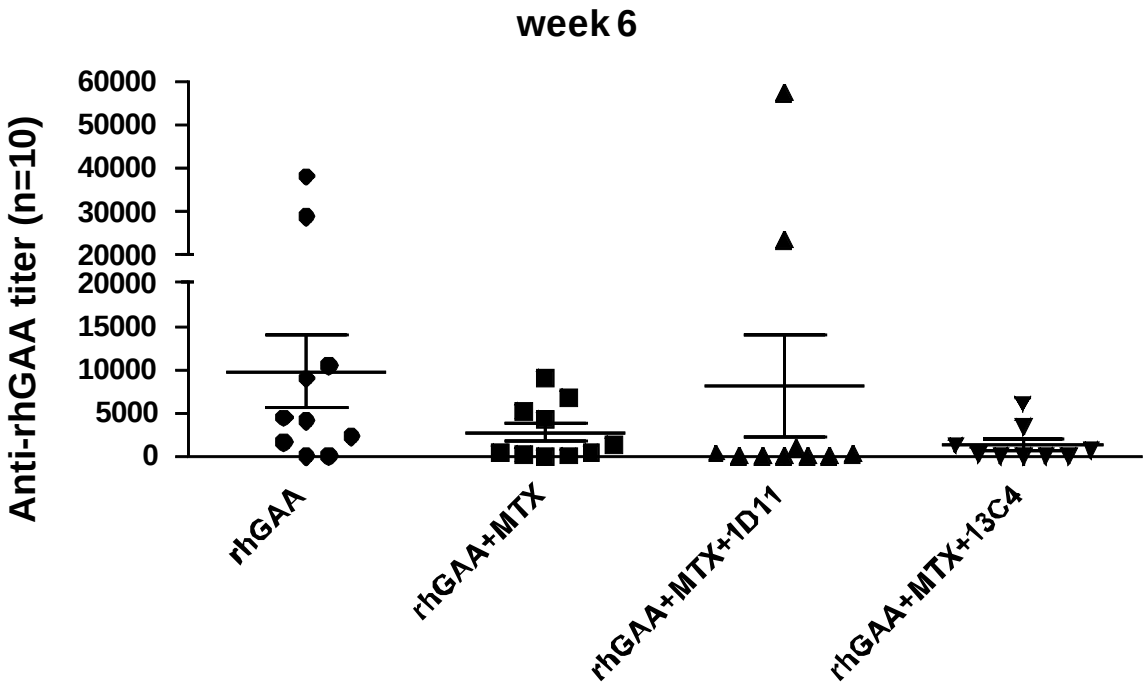

week 6
Anti-rhGAA titer (n=10)
60000
50000
40000
30000
20000
20000
15000
10000
5000
0
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX+1D11
rhGAA+MTX+13C4

**Figure 46A**

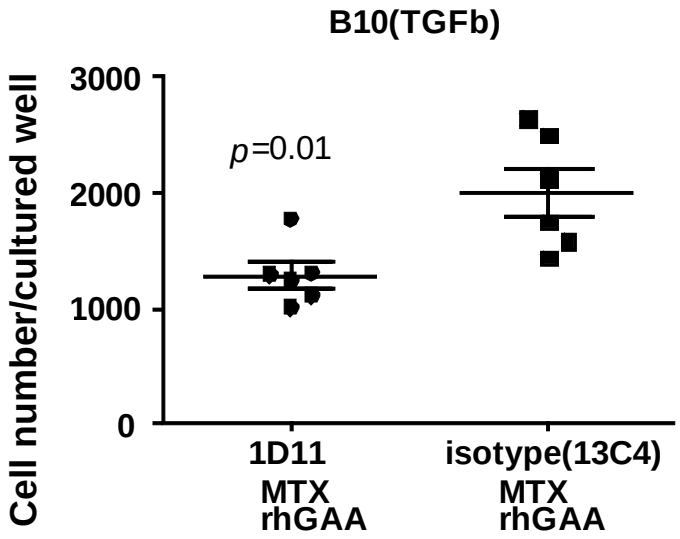



**Figure 46B**

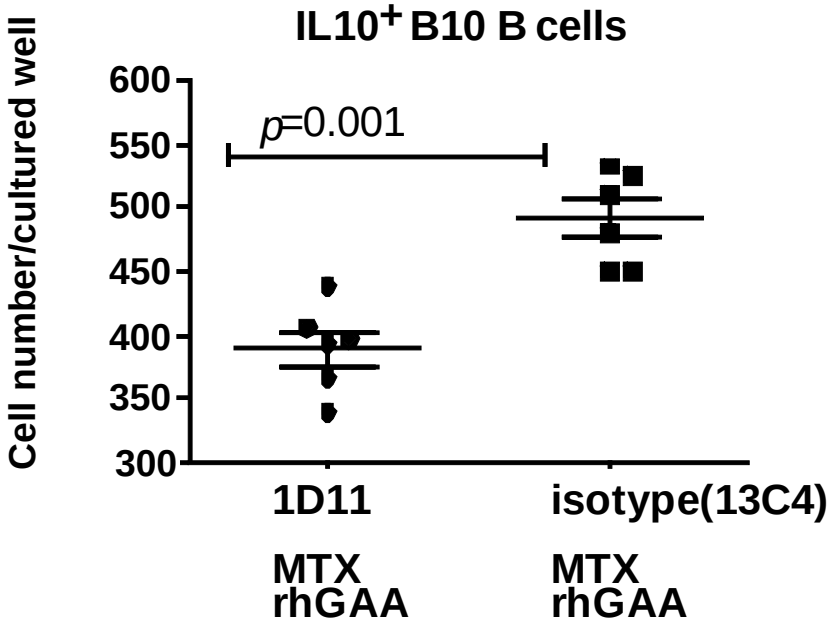


**Figure 46C**

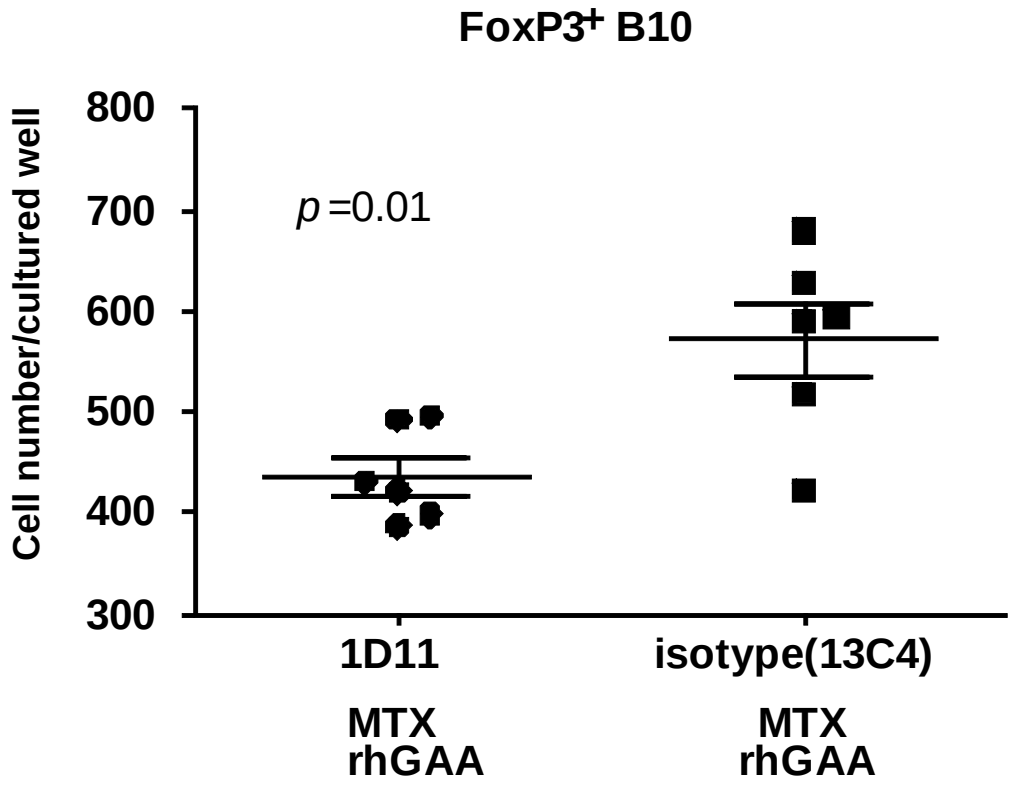

FoxP3+ B10
Cell number/cultured well
800
700
600
500
400
300
p =0.01
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

**Figure 47A**

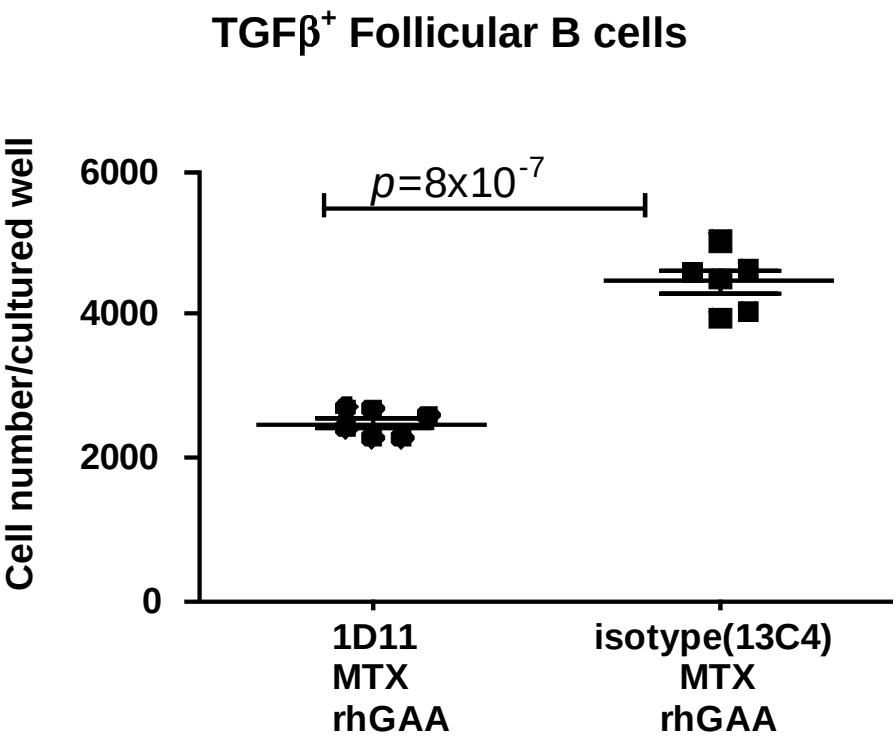



**Figure 47B**

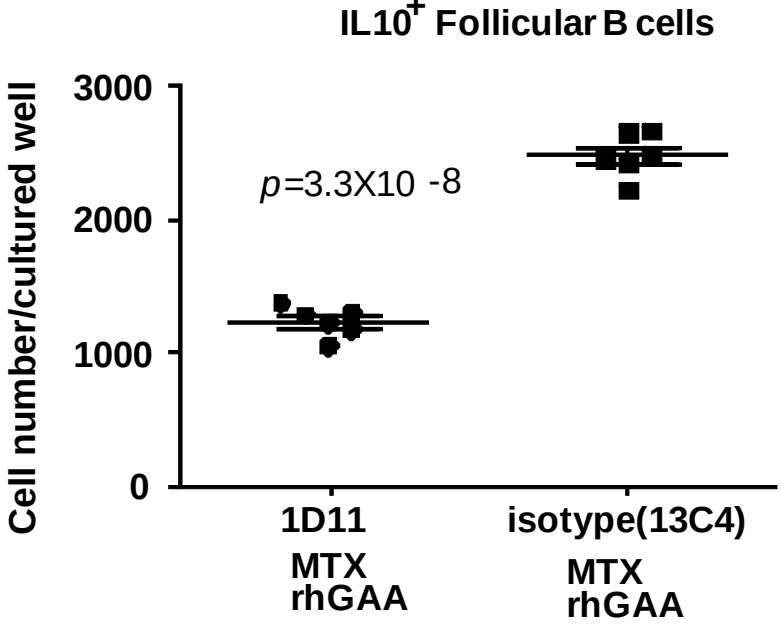


**Figure 47C**

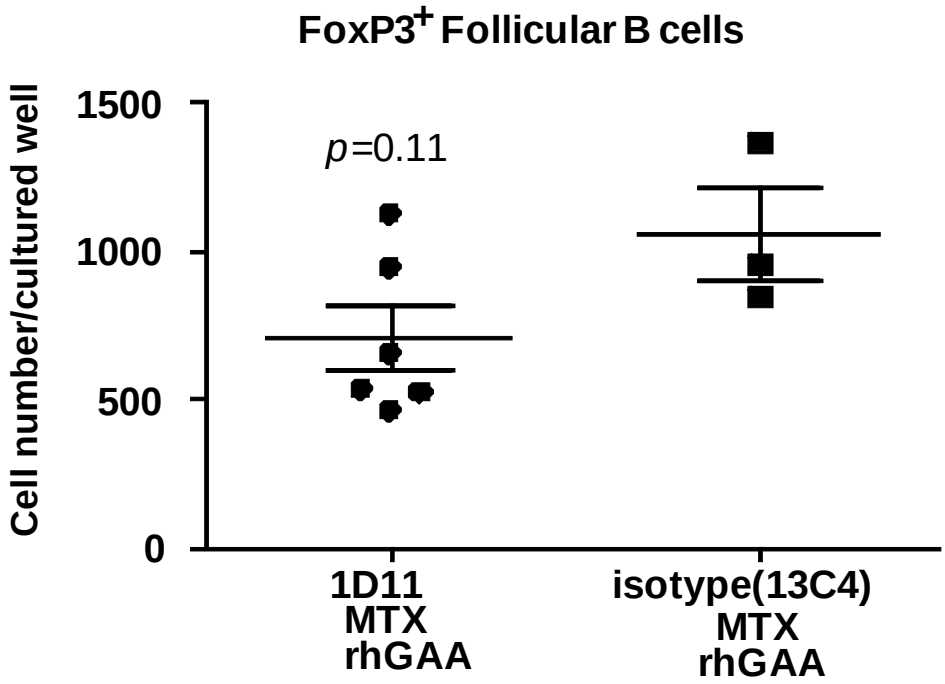

FoxP3+ Follicular B cells
Cell number/cultured well
1500
1000
500
0
p=0.11
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

**Figure 48A**

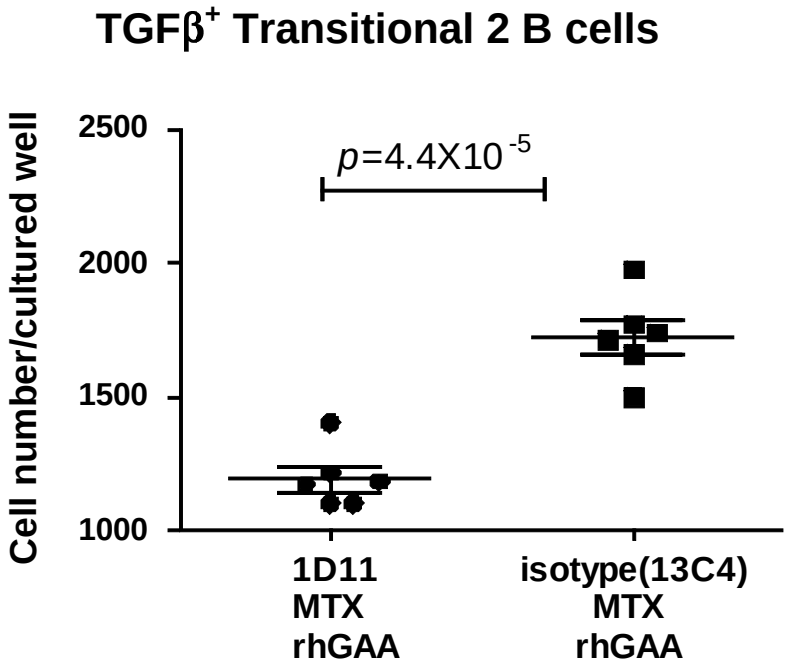



**Figure 48B**

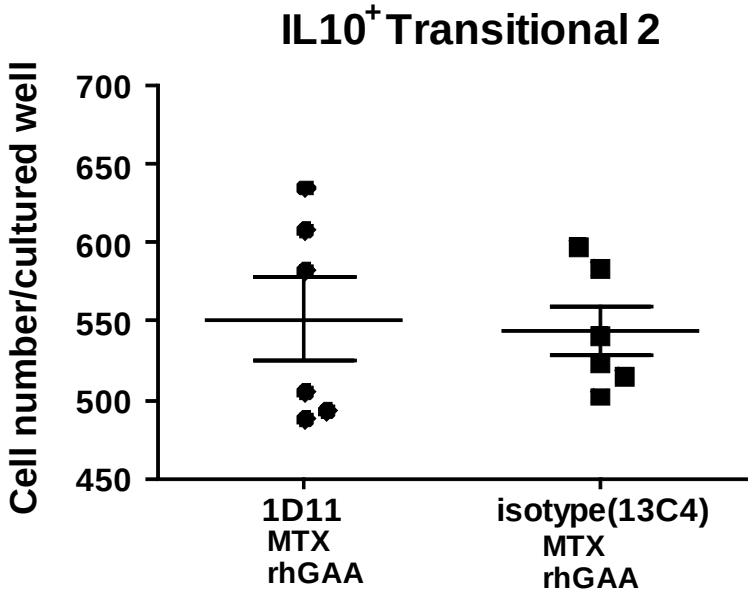
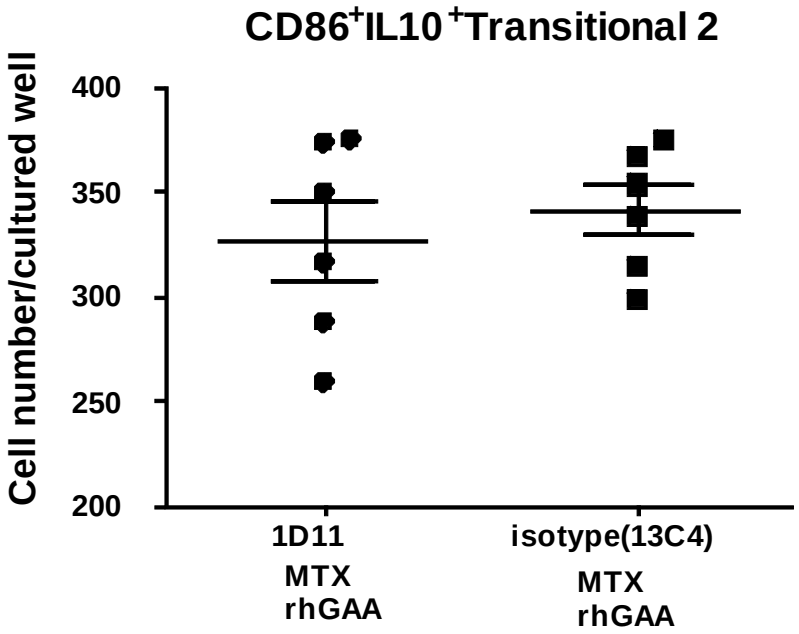


**Figure 48B, cont'd**



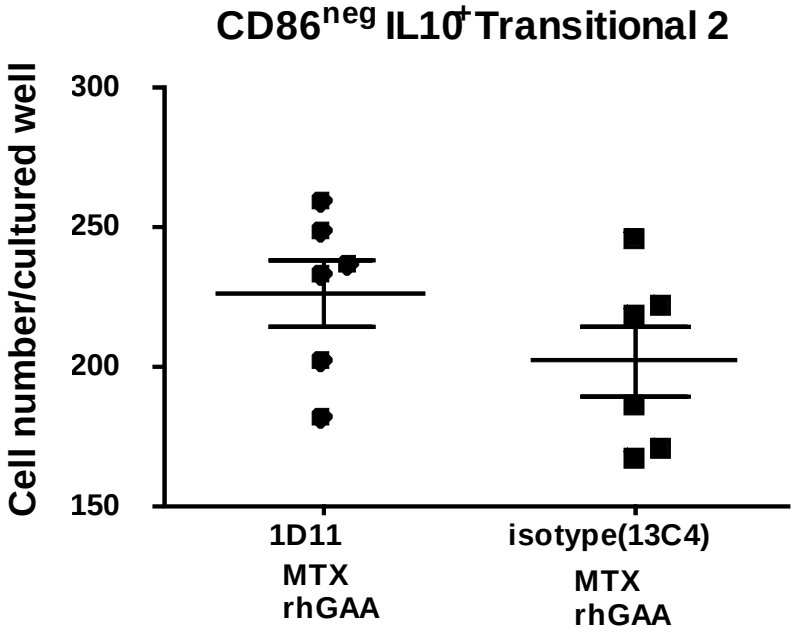
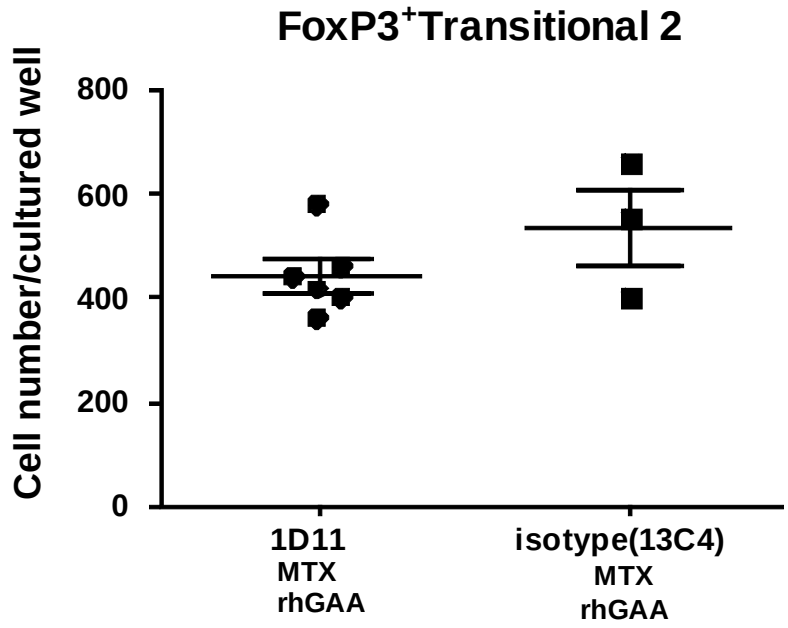



**Figure 48C**


FoxP3+Transitional 2
Cell number/cultured well
800
600
400
200
0
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

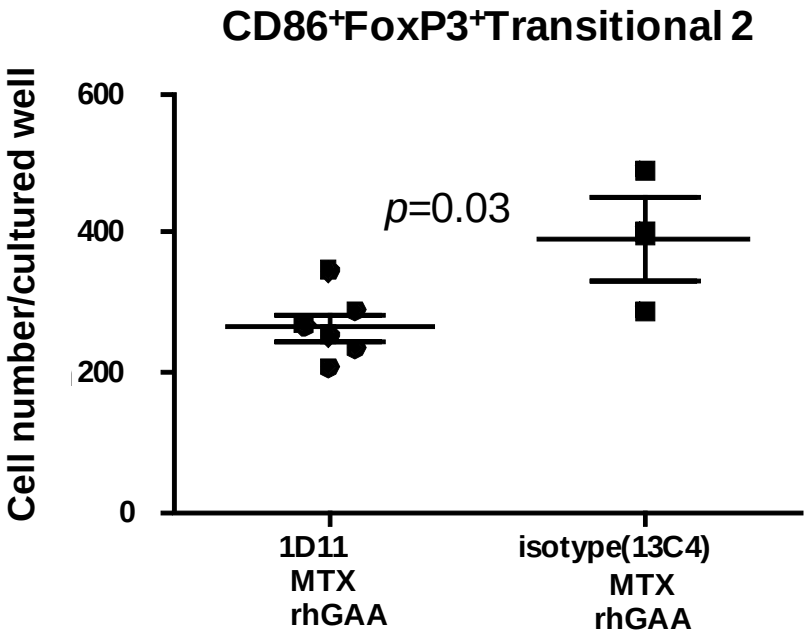

CD86+FoxP3+Transitional 2
Cell number/cultured well
600
400
200
0
p=0.03
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

Figure 48C, cont'd

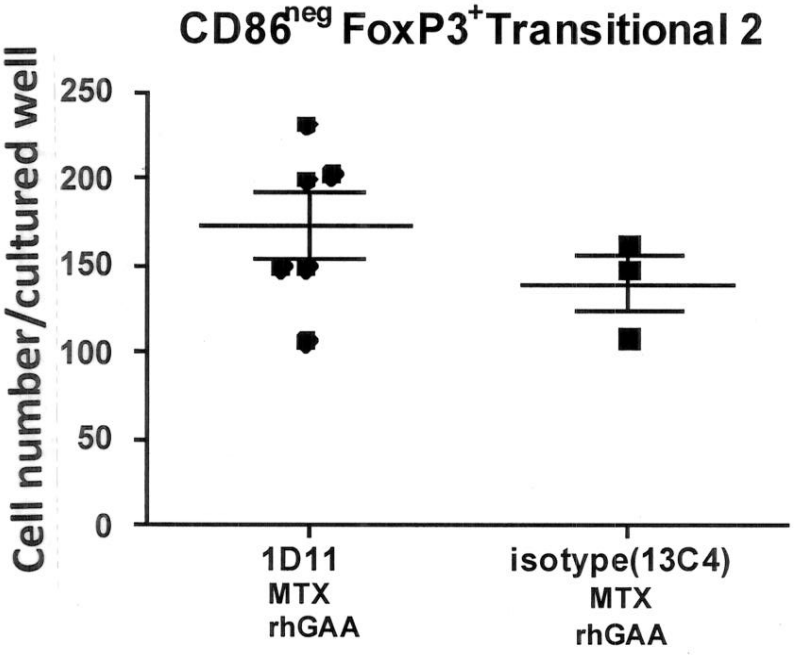
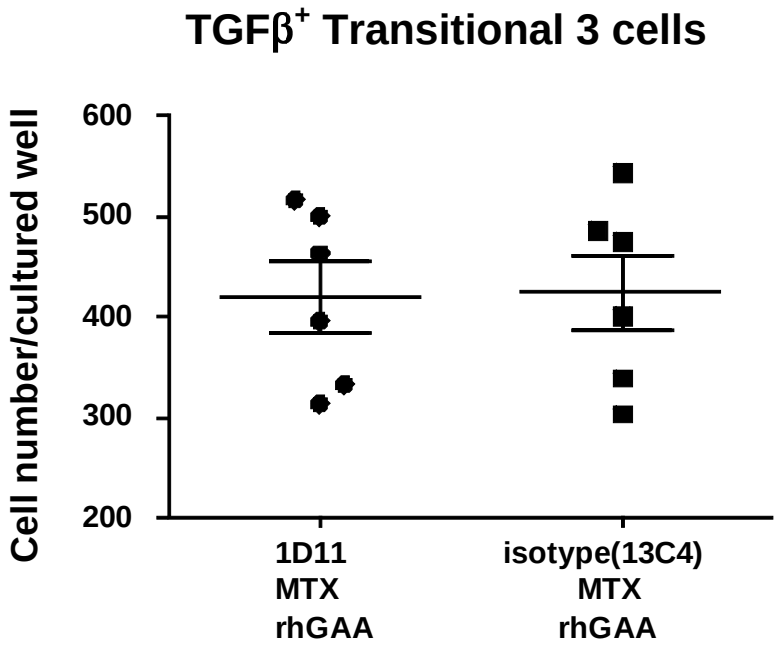


**Figure 49A**


TGFβ+ Transitional 3 cells
Cell number/cultured well
600
500
400
300
200
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

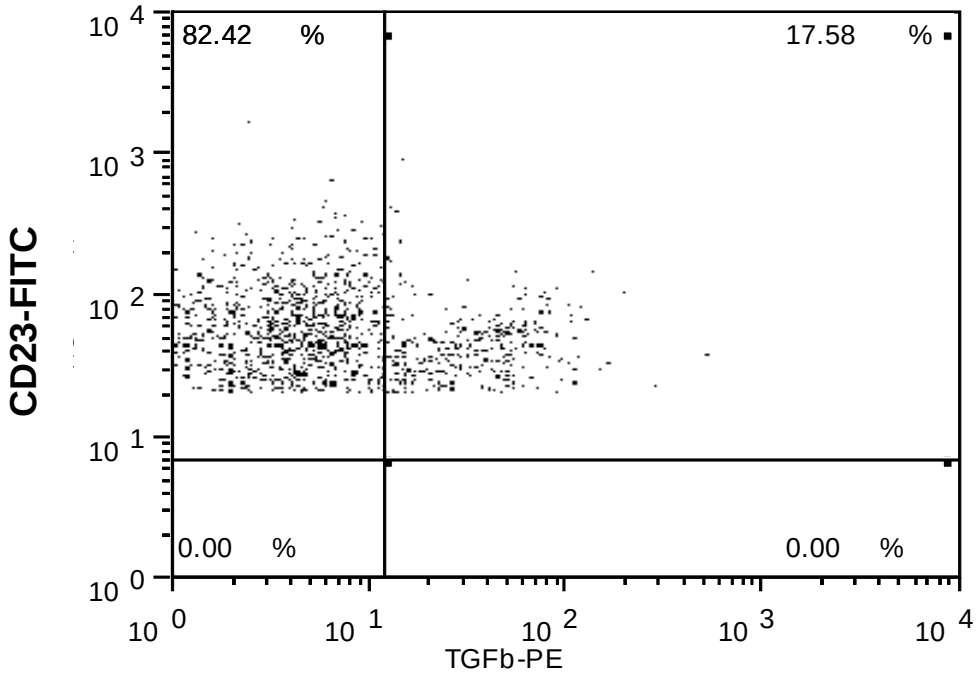

CD23-FITC
82.42 %
17.58 %
0.00 %
0.00 %
TGFb-PE

Figure 49A, cont'd

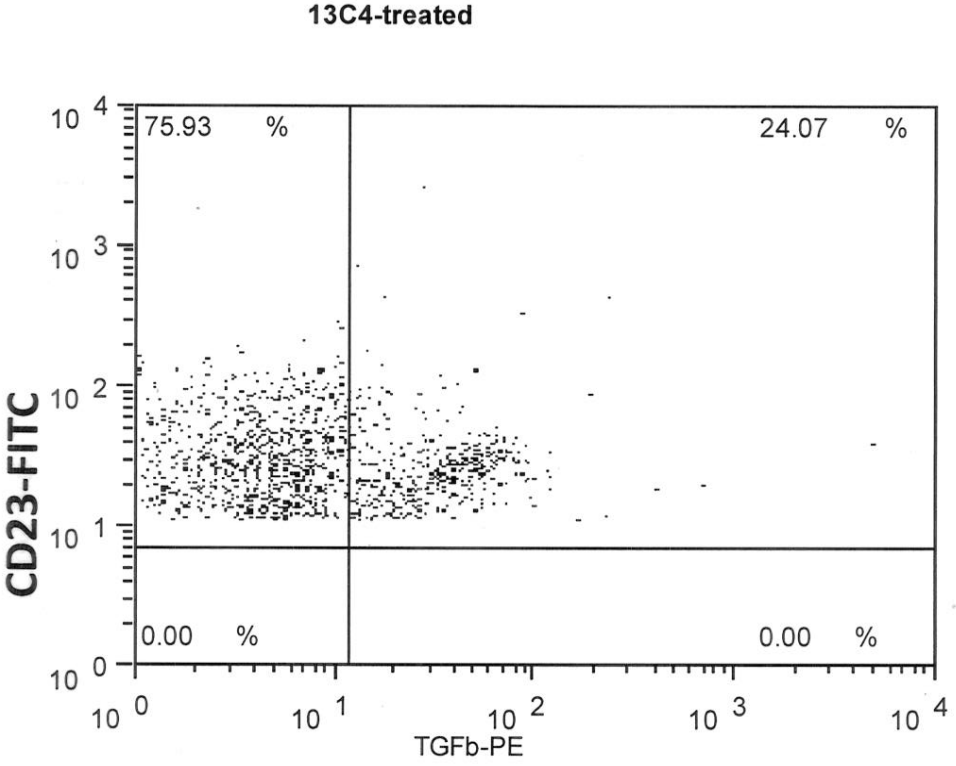



Figure 49B

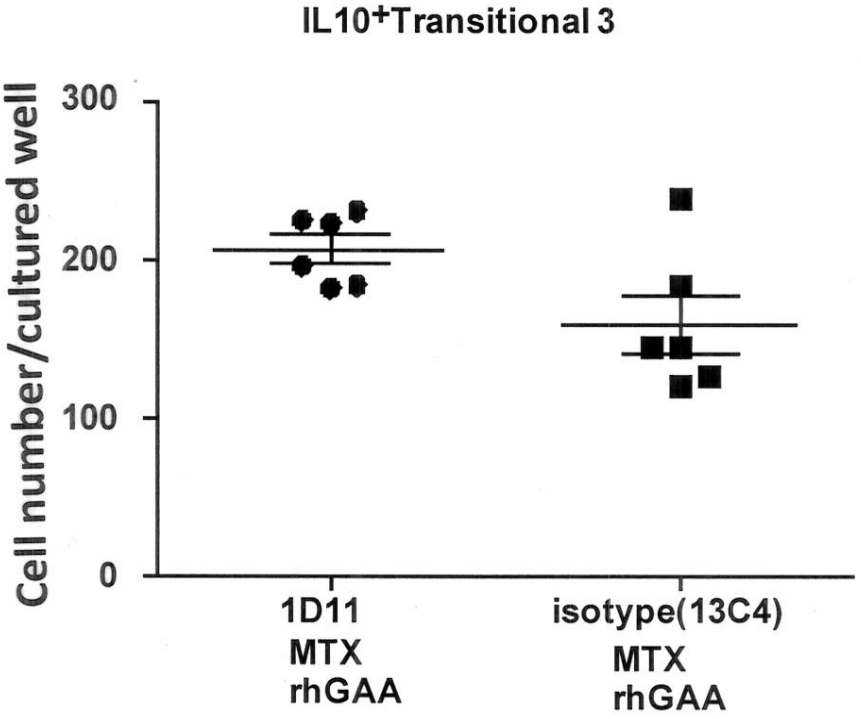
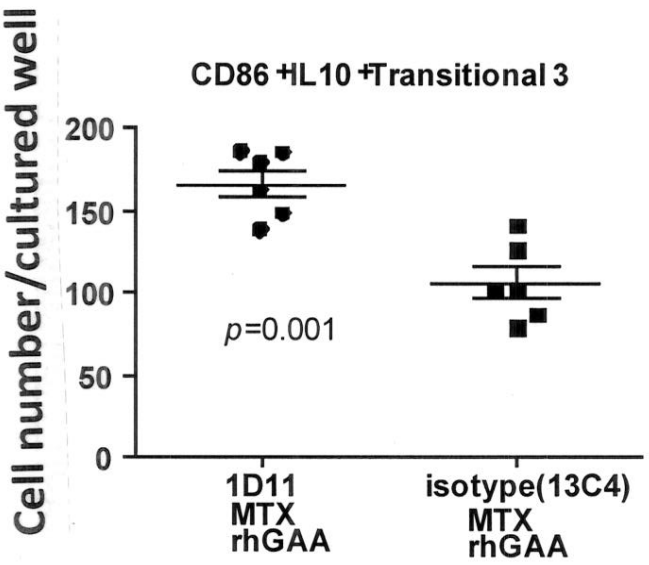


Figure 49B, cont'd



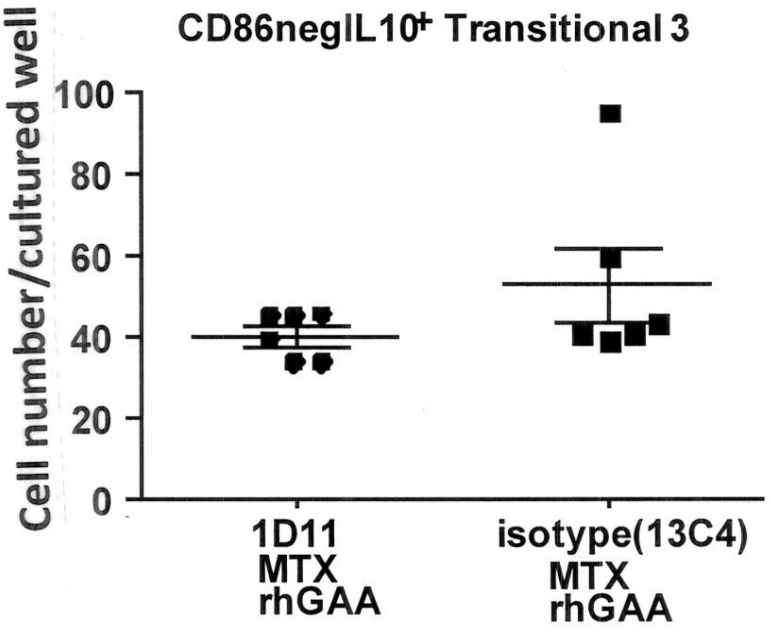
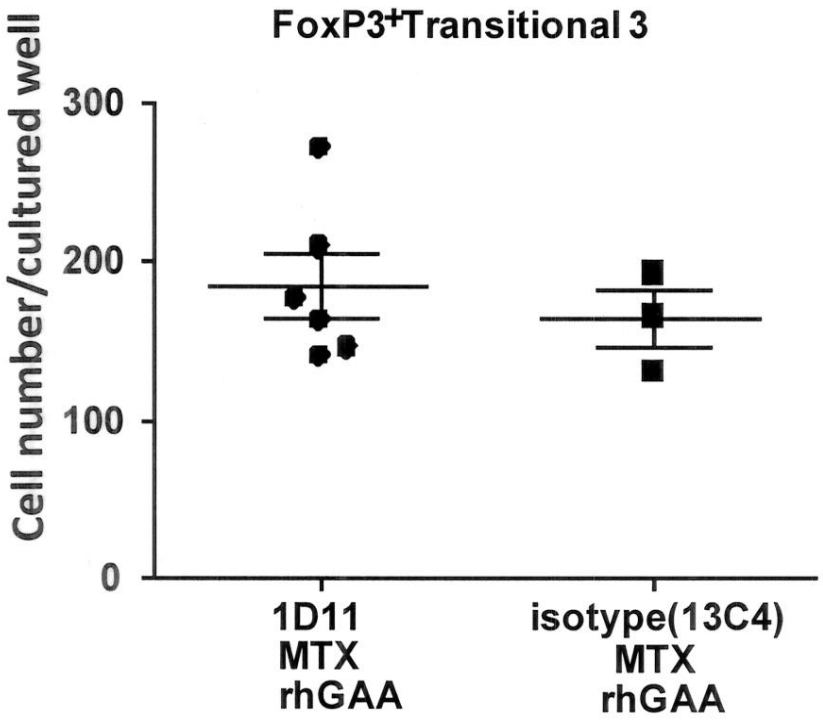



Figure 49C


FoxP3+Transitional 3
Cell number/cultured well
300
200
100
0
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

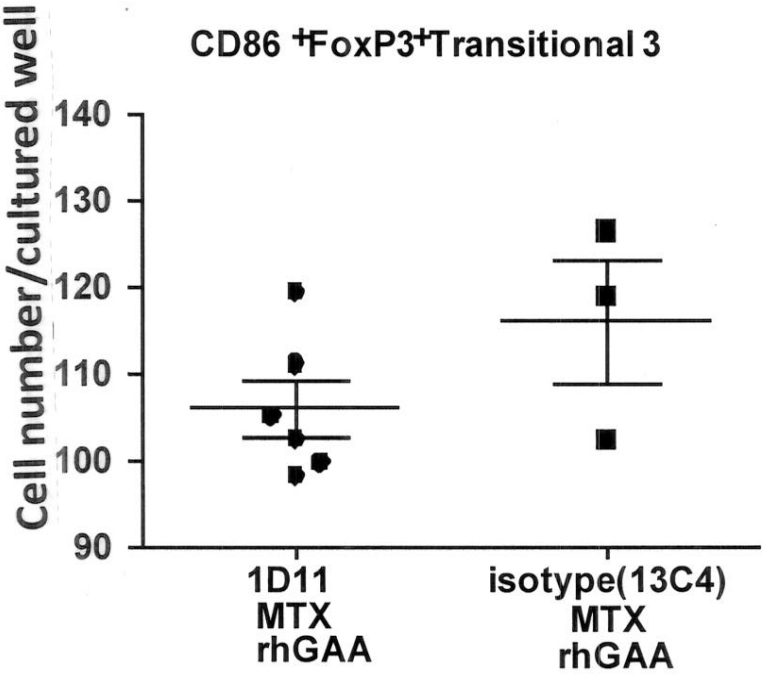

CD86 +FoxP3+Transitional 3
Cell number/cultured well
140
130
120
110
100
90
1D11
MTX
rhGAA
isotype(13C4)
MTX
rhGAA

Figure 49C, cont'd

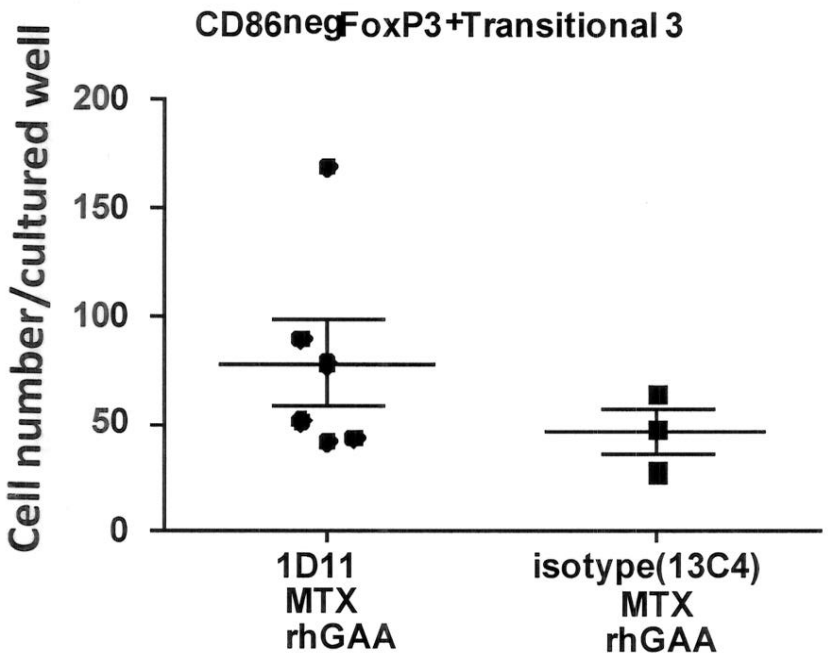
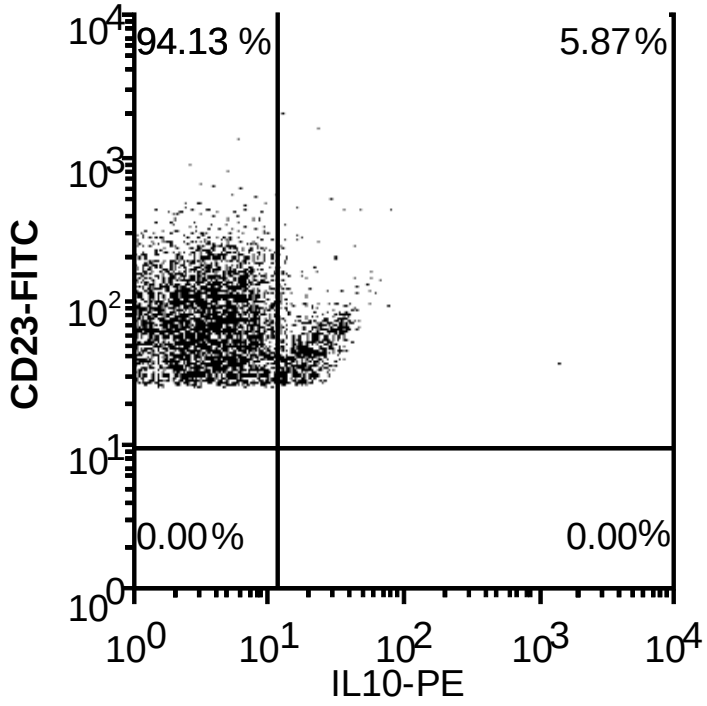


**Figure 50A**


94.13 %
5.87%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
IL10-PE

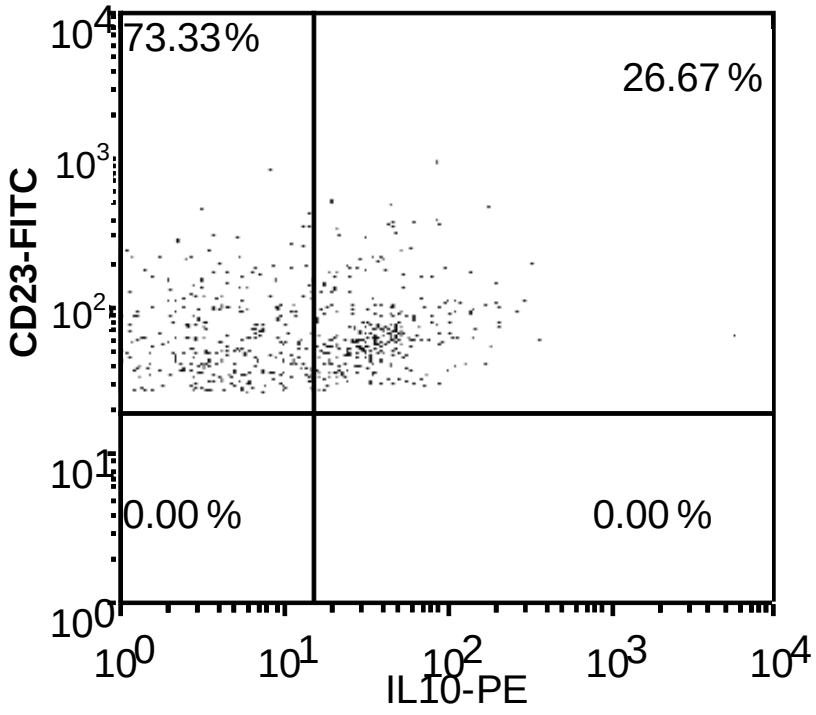

73.33%
26.67 %
0.00 %
0.00 %
CD23-FITC
IL10-PE

**Figure 50A, cont'd**

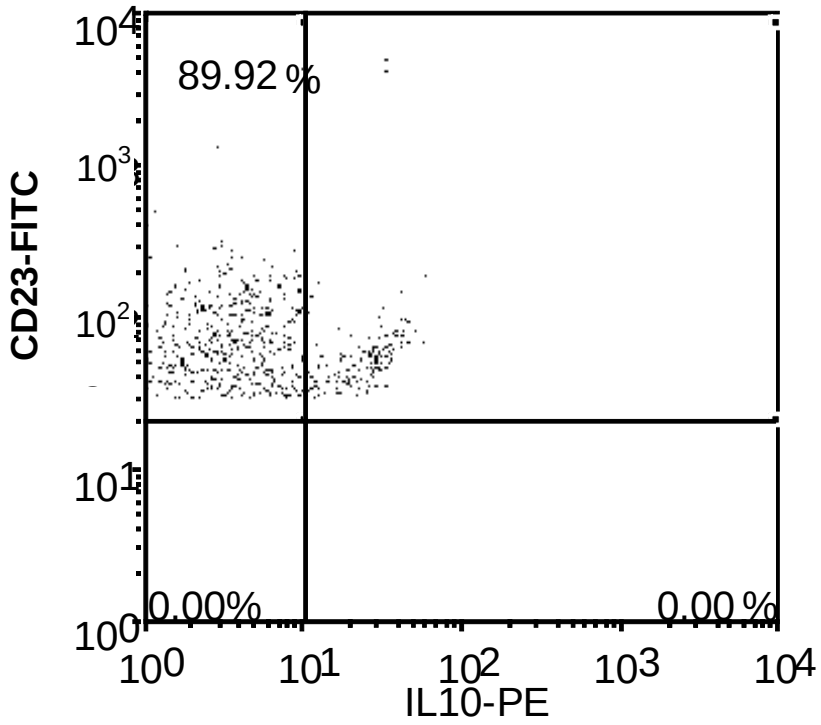



**Figure 50B**

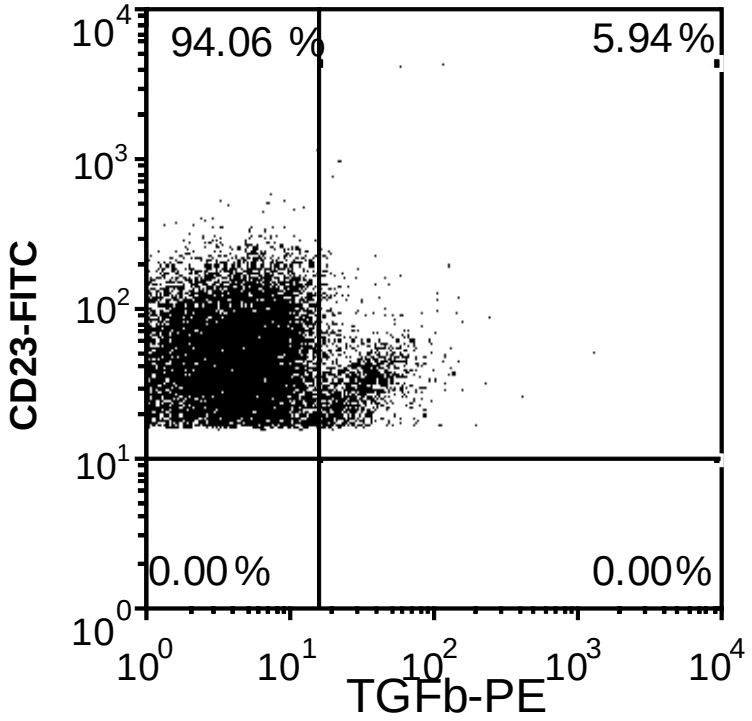
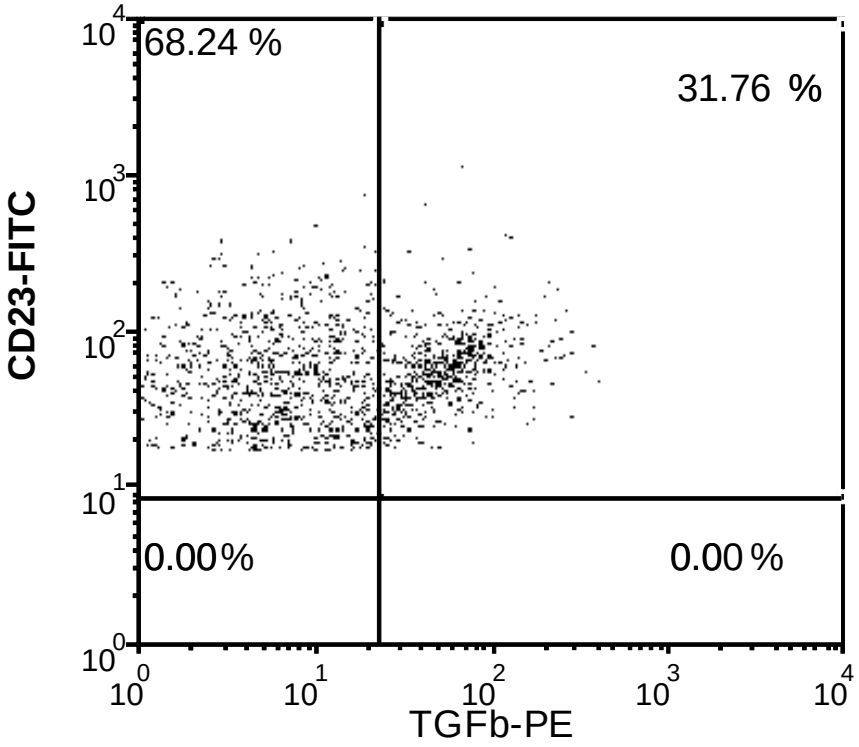


**Figure 50B, cont'd**



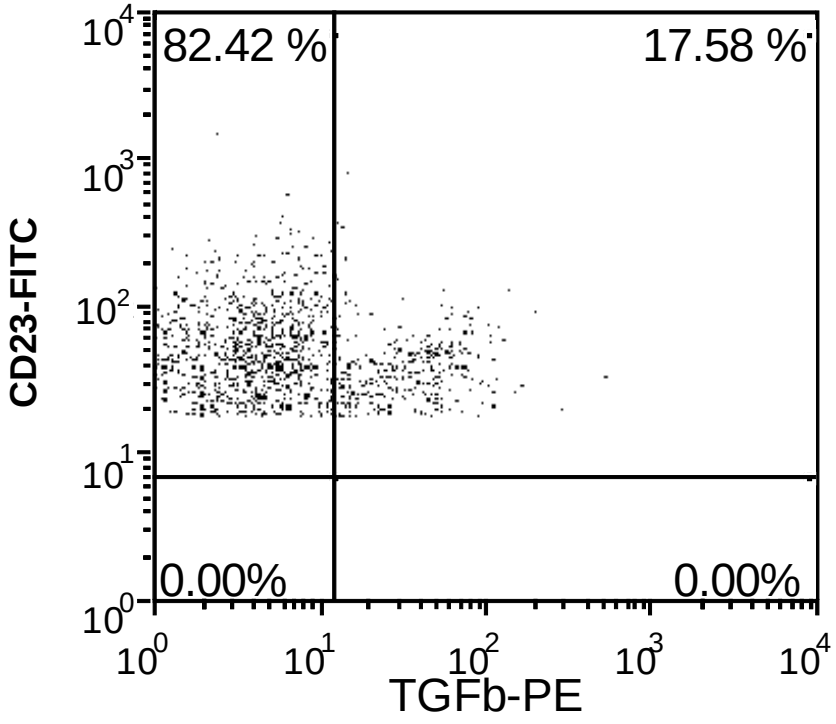



**Figure 50C**

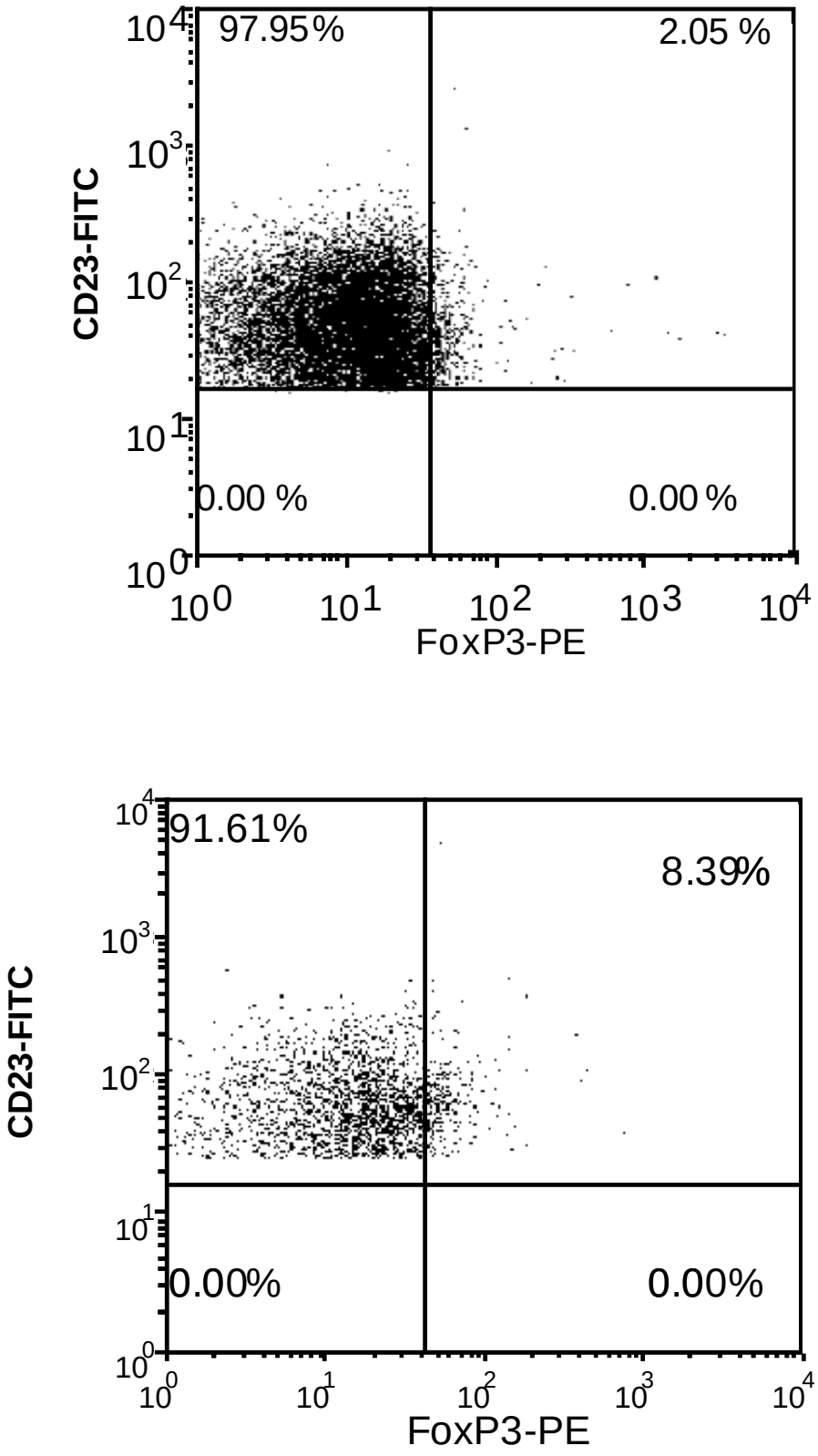

97.95%
2.05 %
0.00 %
0.00 %
CD23-FITC
FoxP3-PE
91.61%
8.39%
0.00%
0.00%
CD23-FITC
FoxP3-PE

**Figure 50C, cont'd**

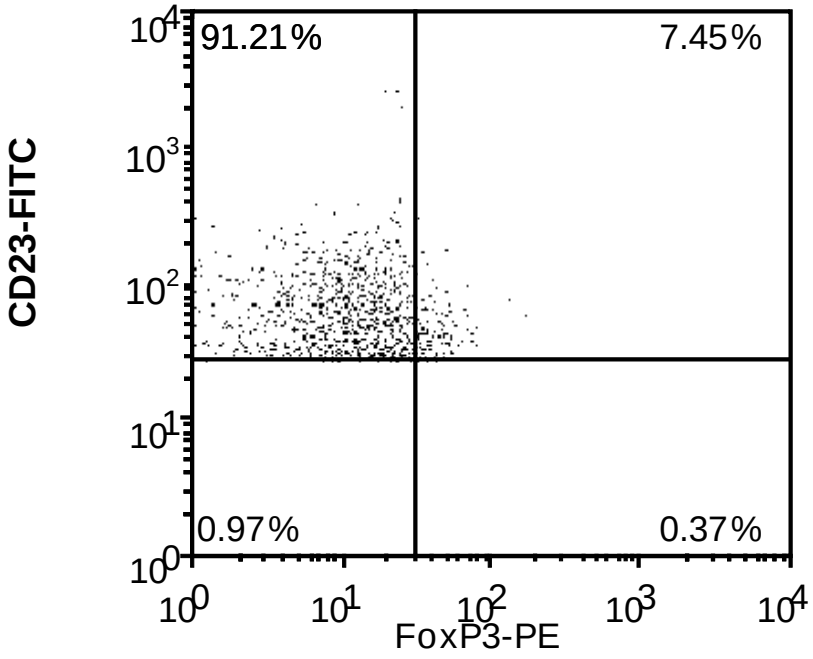


**Figure 51A**

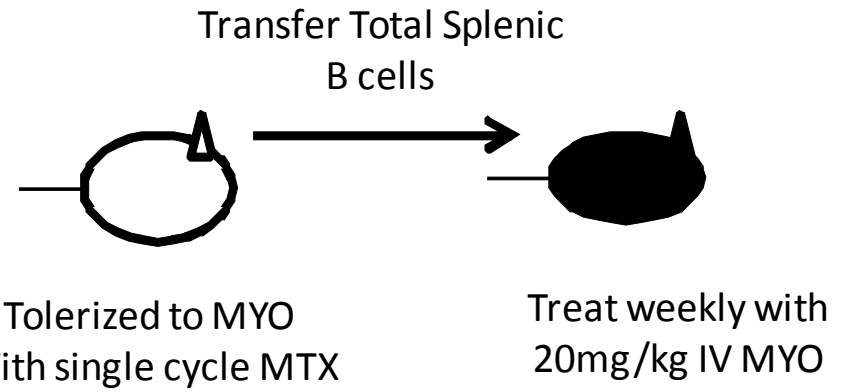



**Figure 51B**

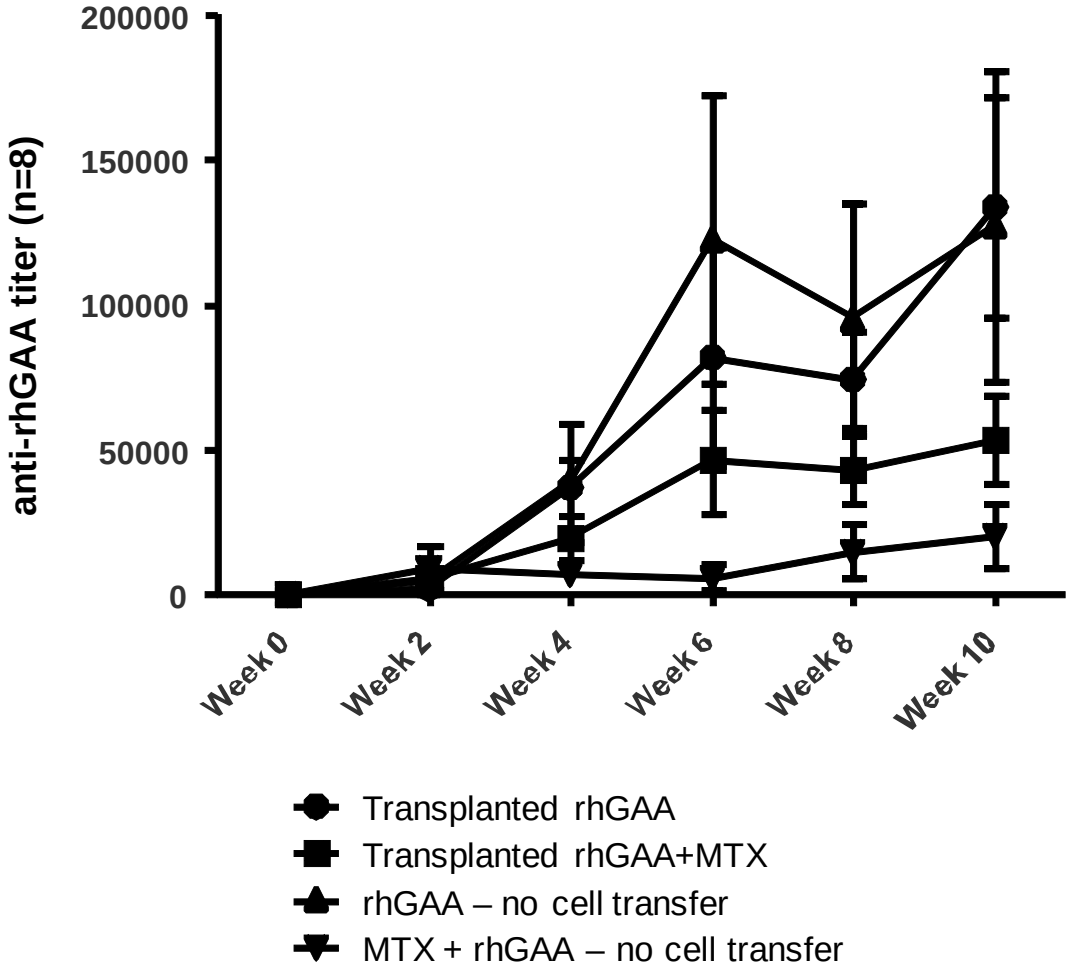


**Figure 52**

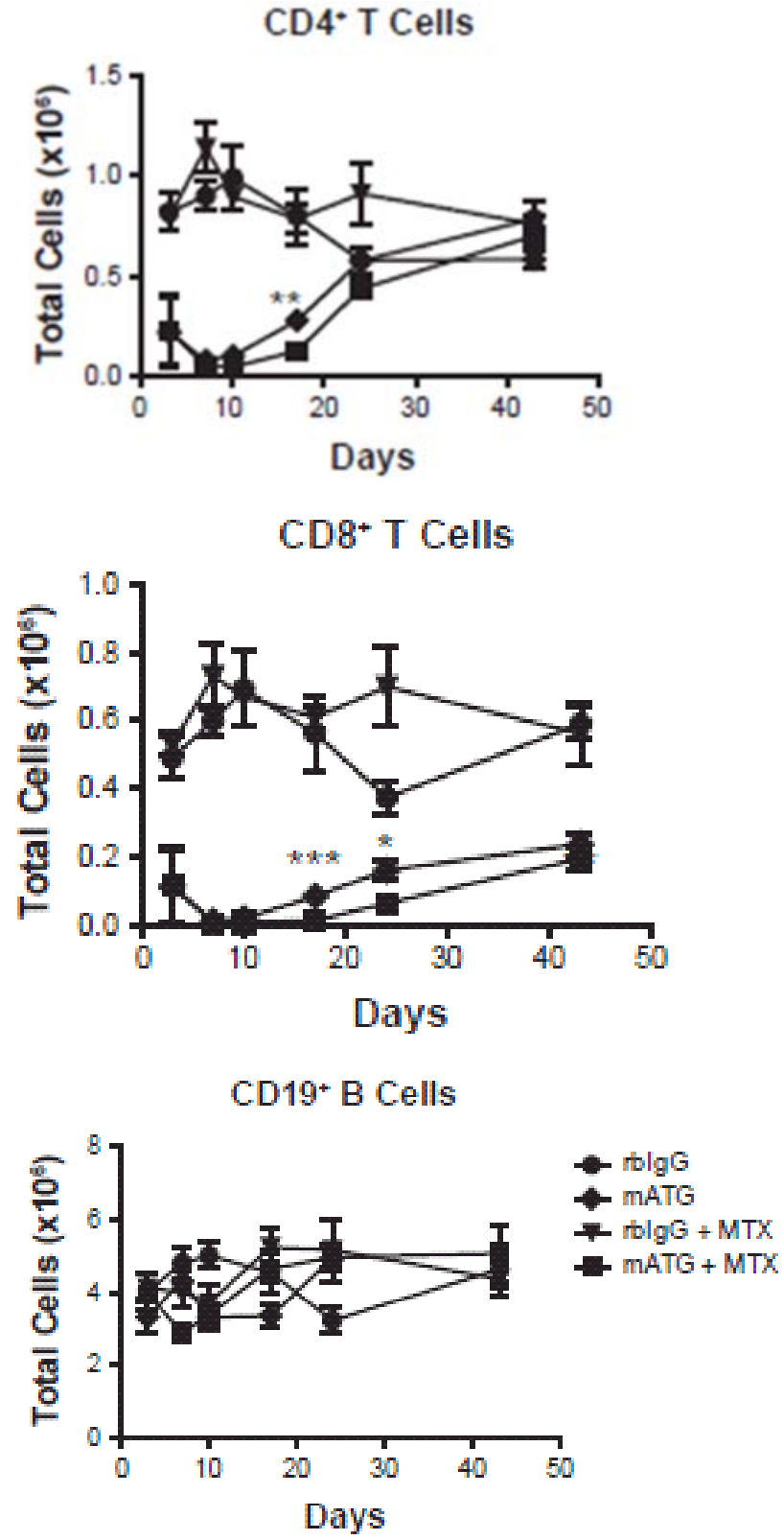
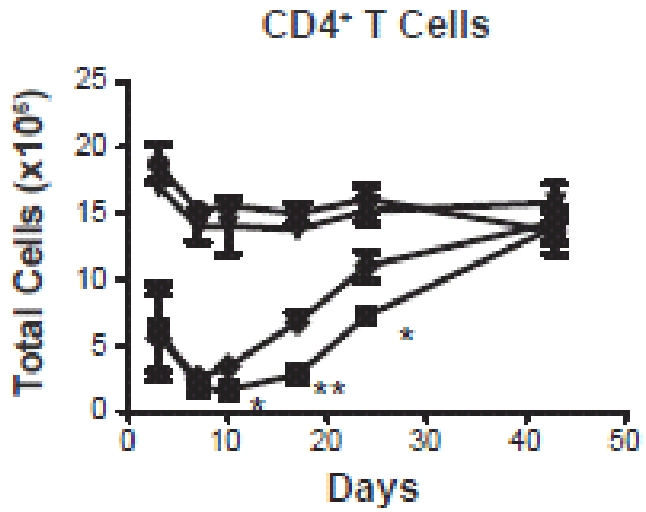
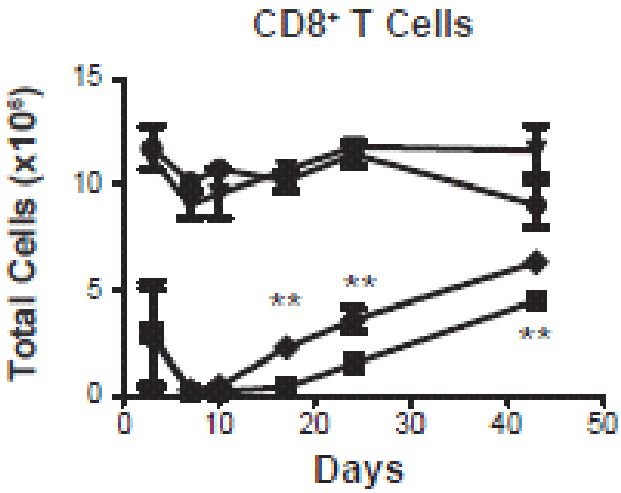

BLOOD
CD4+ T Cells
Total Cells (x10⁶)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
0
10
20
30
40
50
Days
CD8+ T Cells
Total Cells (x10⁶)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
*
0
10
20
30
40
50
Days
CD19+ B Cells
Total Cells (x10⁶)
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
Days
rbIgG
mATG
rbIgG + MTX
mATG + MTX

**Figure 52, cont'd**

**SPLEEN**



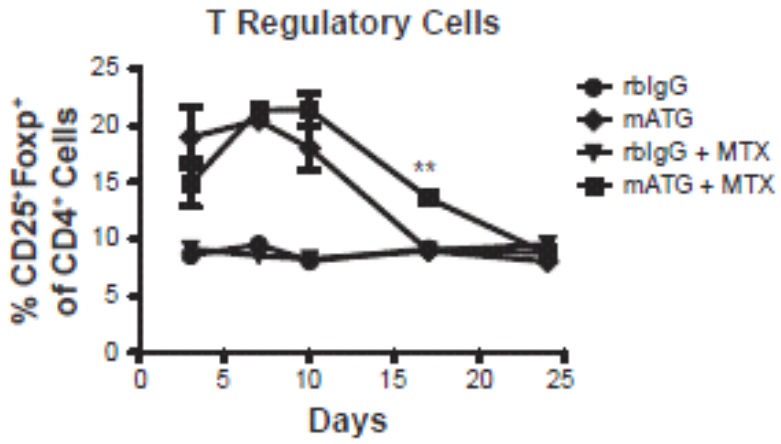



**Figure 53**

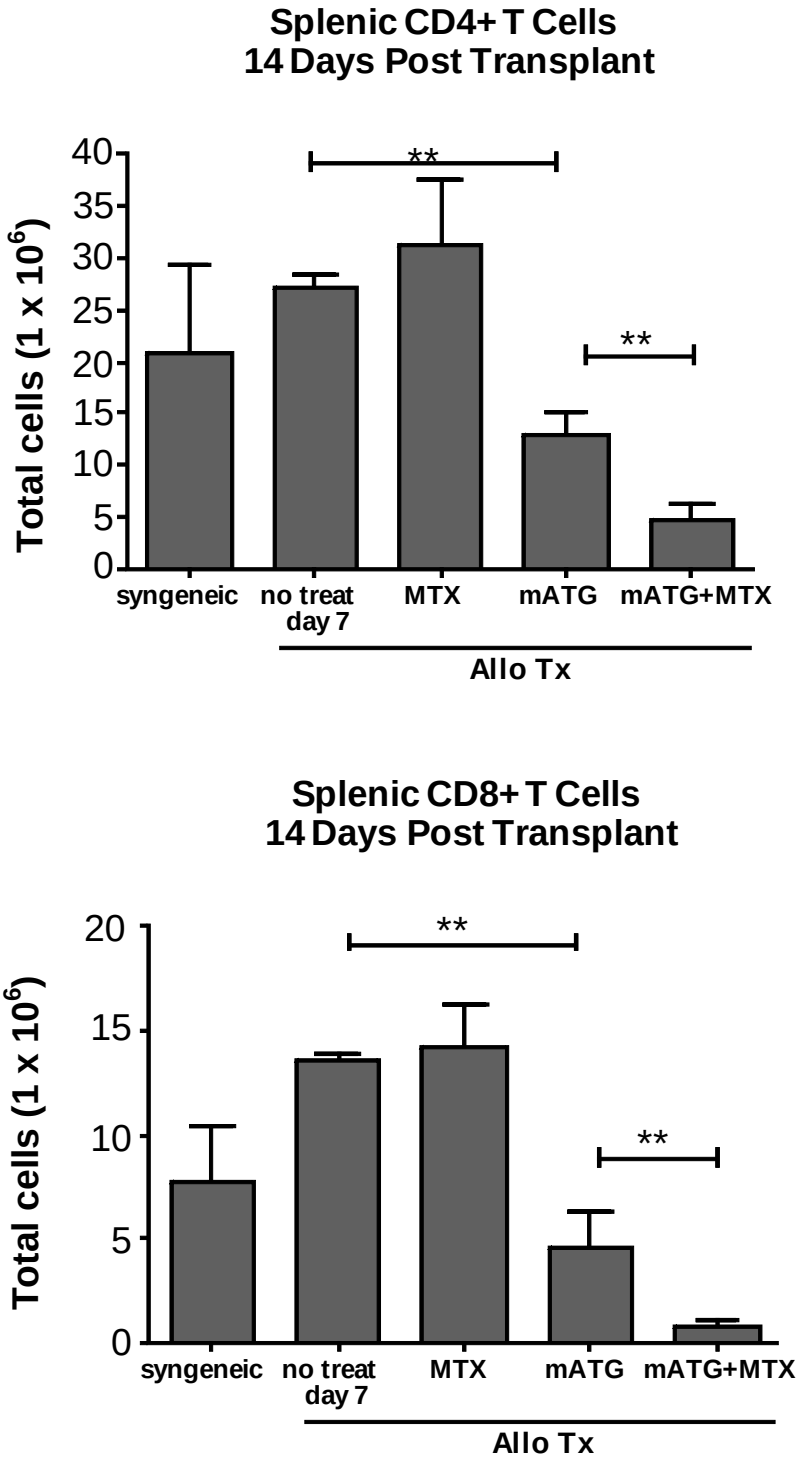
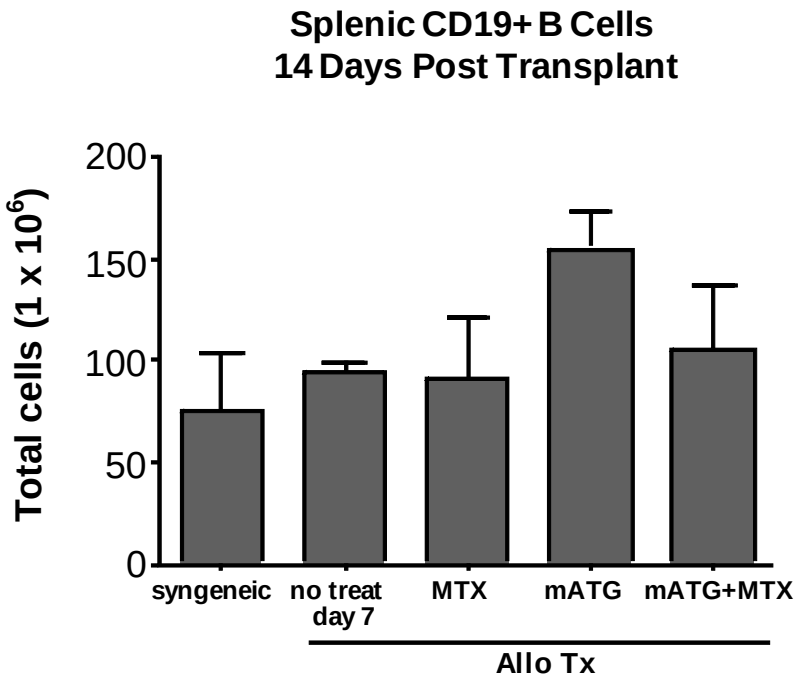

Splenic CD4+ T Cells
14 Days Post Transplant
Total cells (1 x 10^6)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
**
**
syngeneic
no treat day 7
MTX
mATG
mATG+MTX
Allo Tx
Splenic CD8+ T Cells
14 Days Post Transplant
Total cells (1 x 10^6)
20
15
10
5
0
**
**
syngeneic
no treat day 7
MTX
mATG
mATG+MTX
Allo Tx

**Figure 53, cont'd**



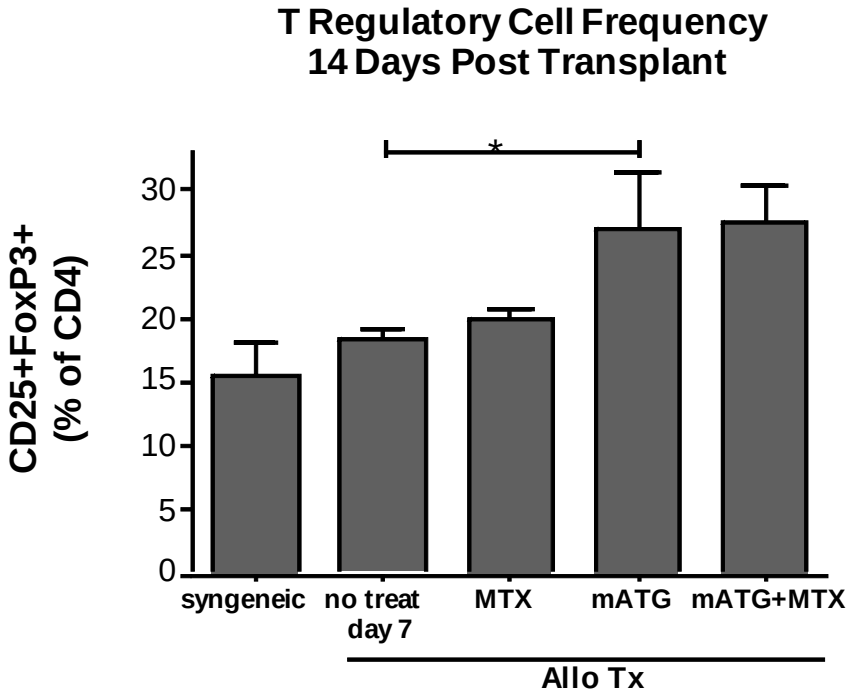
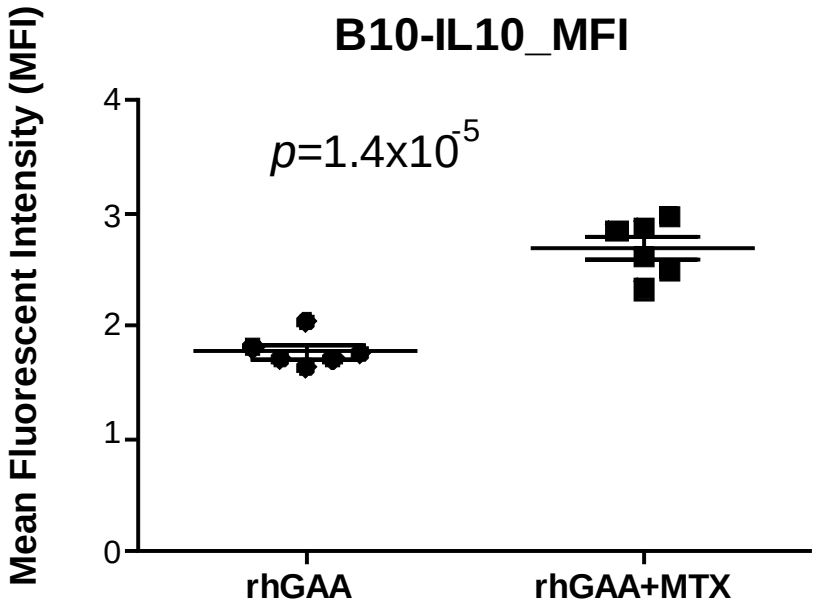



**Figure 54**


B10-IL10_MFI
Mean Fluorescent Intensity (MFI)
p=1.4x10-5
4
3
2
1
0
rhGAA
rhGAA+MTX

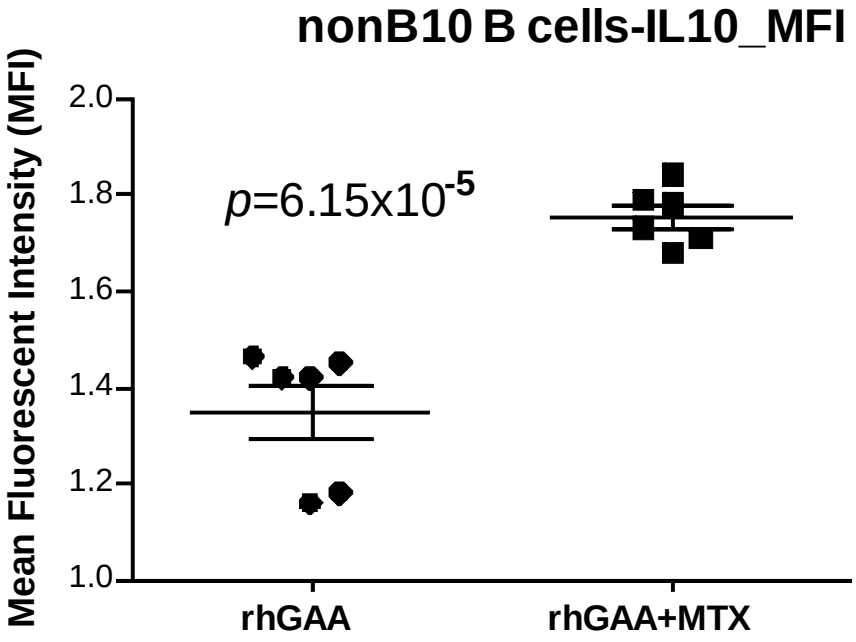
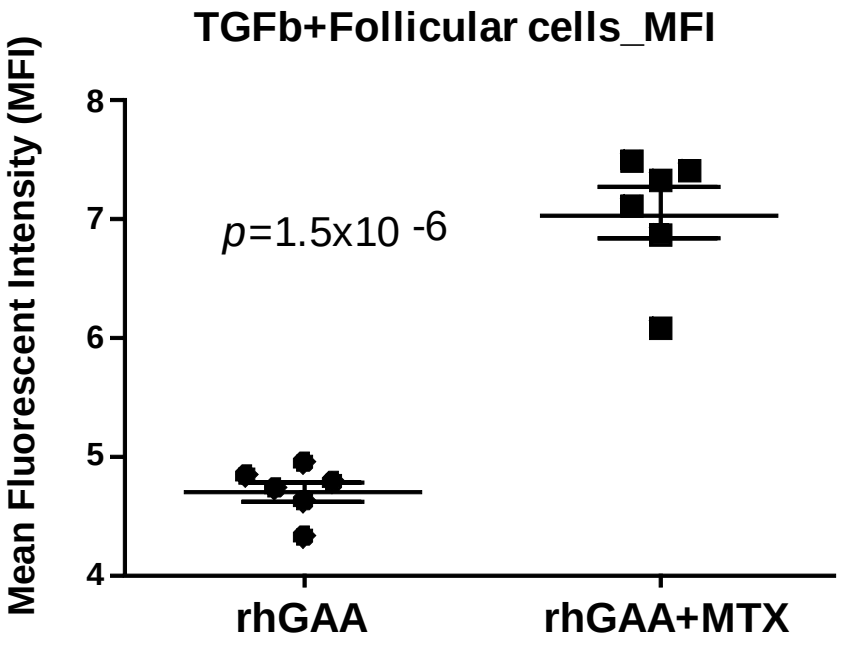

nonB10 B cells-IL10_MFI
Mean Fluorescent Intensity (MFI)
p=6.15x10-5
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figure 55**


TGFb+Follicular cells_MFI
Mean Fluorescent Intensity (MFI)
8
7
6
5
4
p=1.5x10 -6
rhGAA
rhGAA+MTX

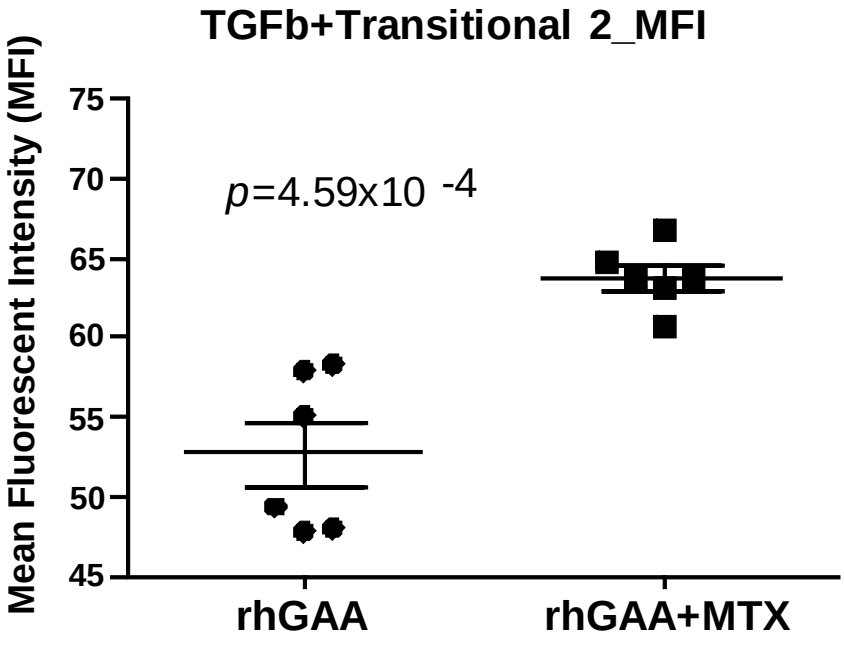

TGFb+Transitional 2_MFI
Mean Fluorescent Intensity (MFI)
75
70
65
60
55
50
45
p=4.59x10 -4
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figure 55, cont'd**

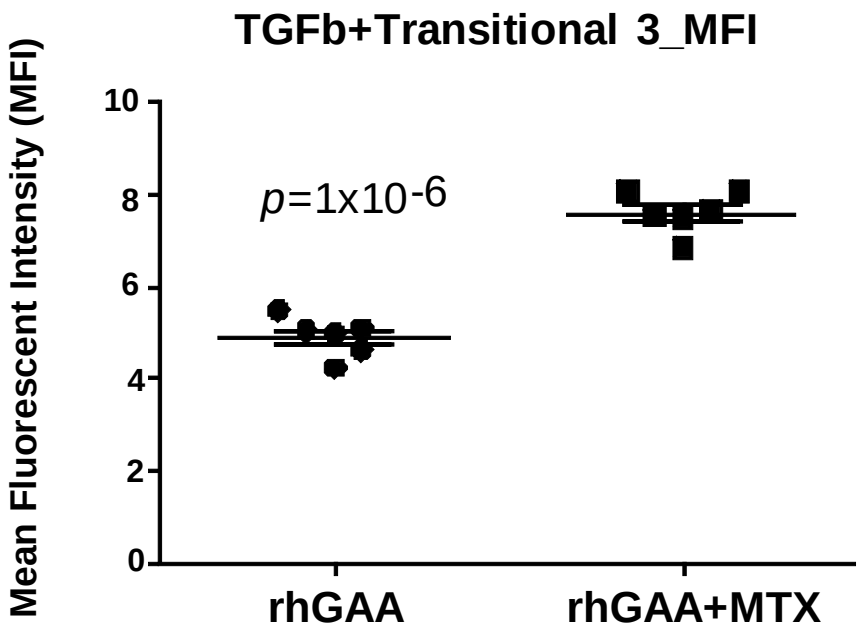


**Figure 56**

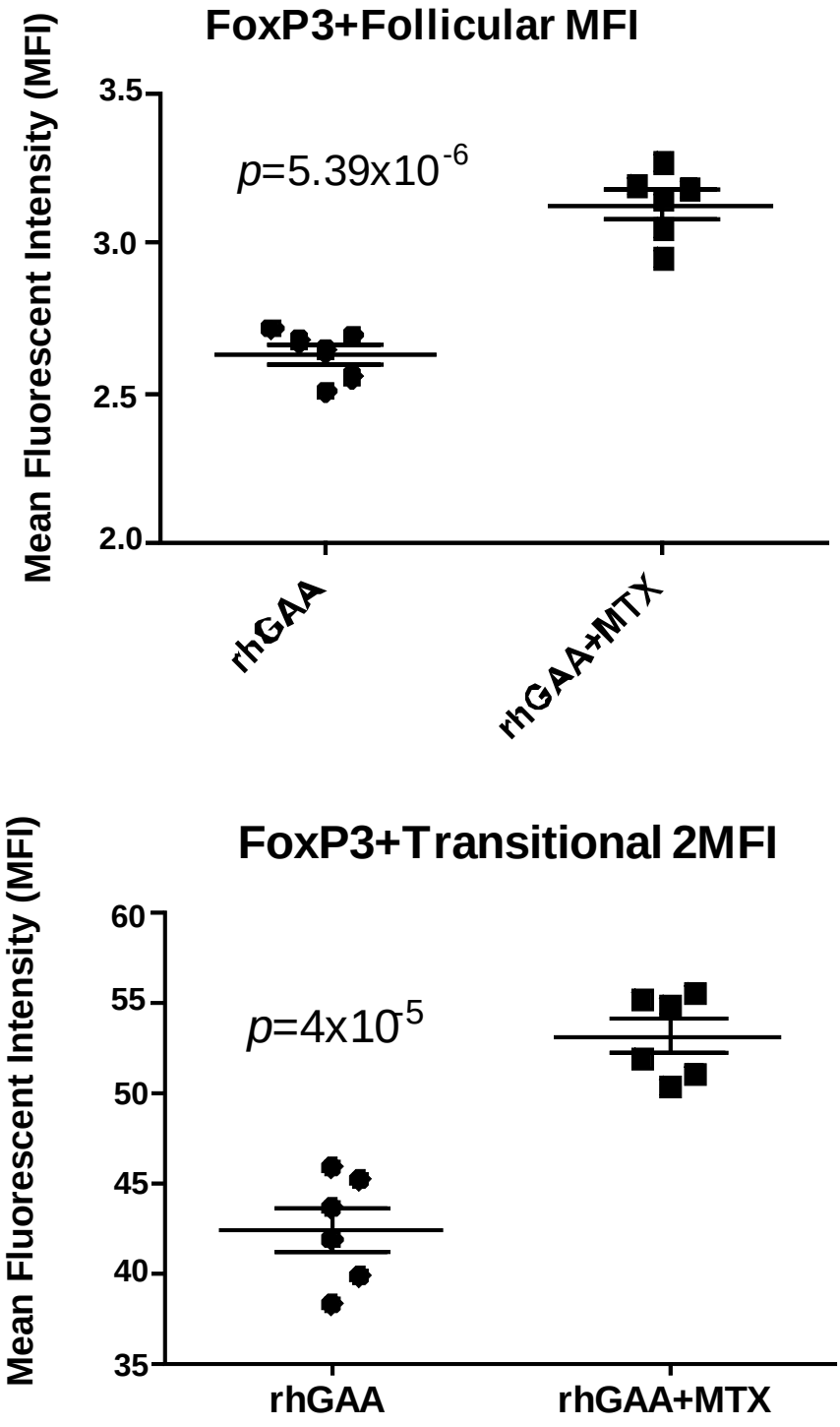

FoxP3+Follicular MFI
Mean Fluorescent Intensity (MFI)
3.5
3.0
2.5
2.0
p=5.39x10-6
rhGAA
rhGAA+MTX
FoxP3+Transitional 2MFI
Mean Fluorescent Intensity (MFI)
60
55
50
45
40
35
p=4x10-5
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figure 56, cont'd**

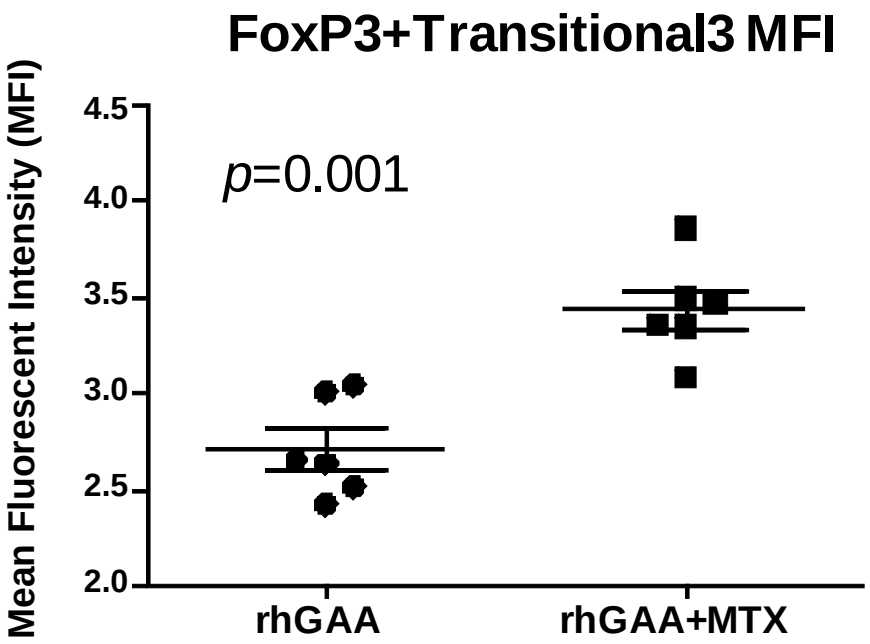
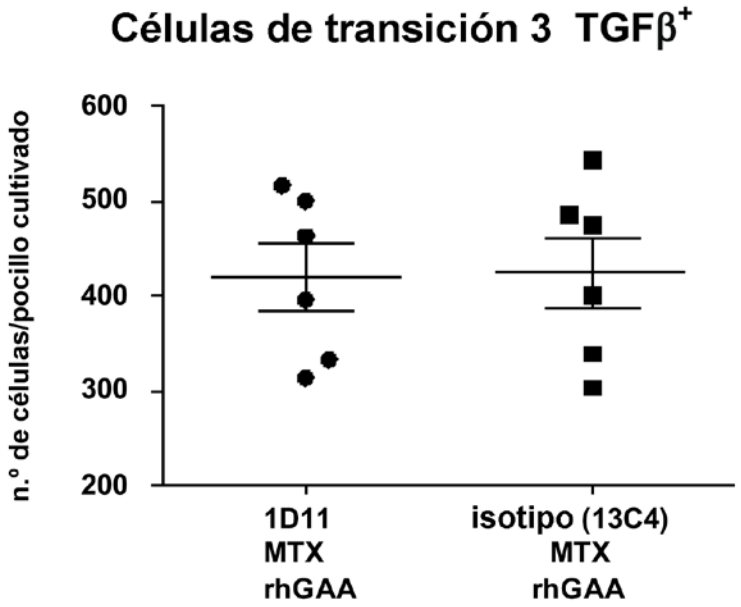


**Figura 49A**


Células de transición 3 TGFβ+
n.º de células/pocillo cultivado
600
500
400
300
200
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA

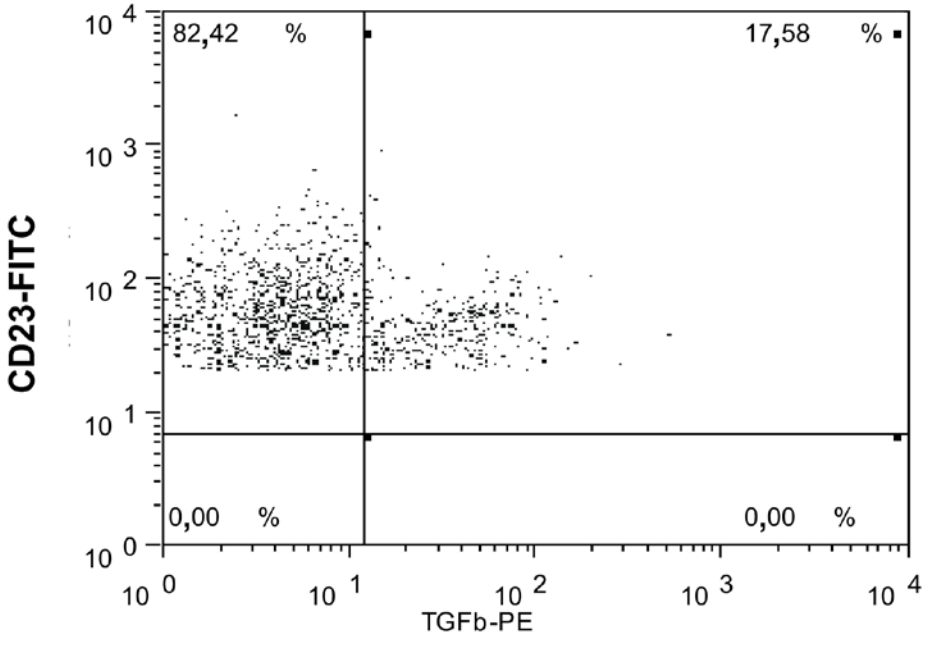

CD23-FITC
82,42 %
17,58 %
0,00 %
0,00 %
TGFb-PE

**Figura 49A, cont.**

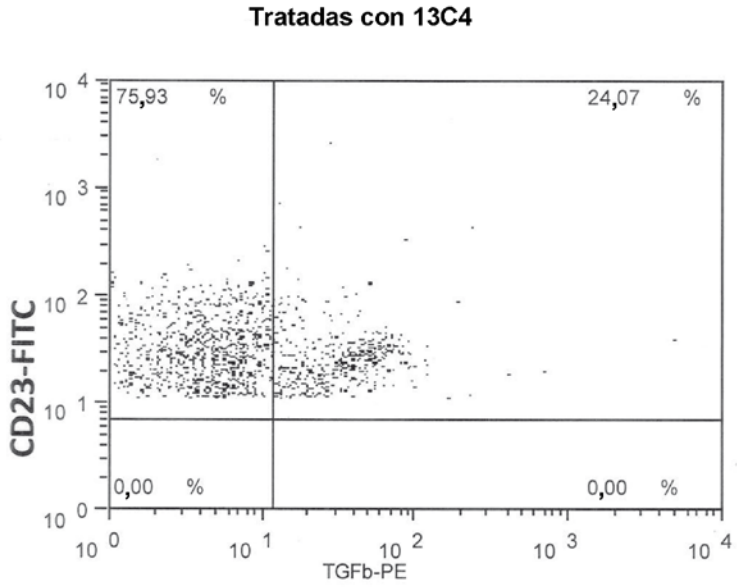



**Figura 49B**

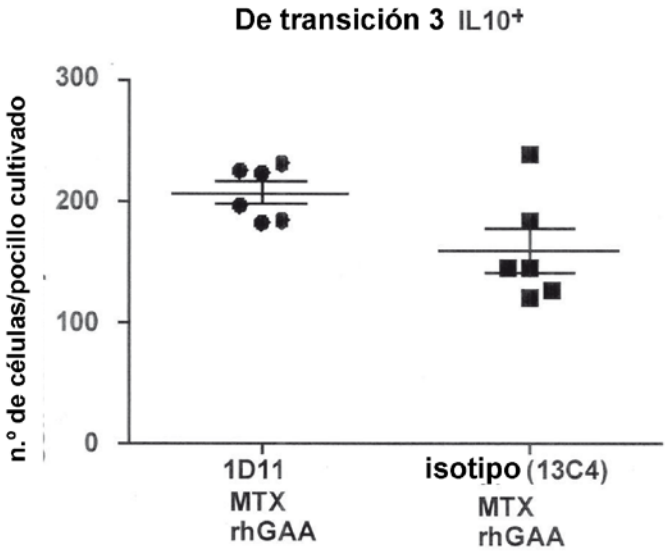


**Figura 49B, cont.**

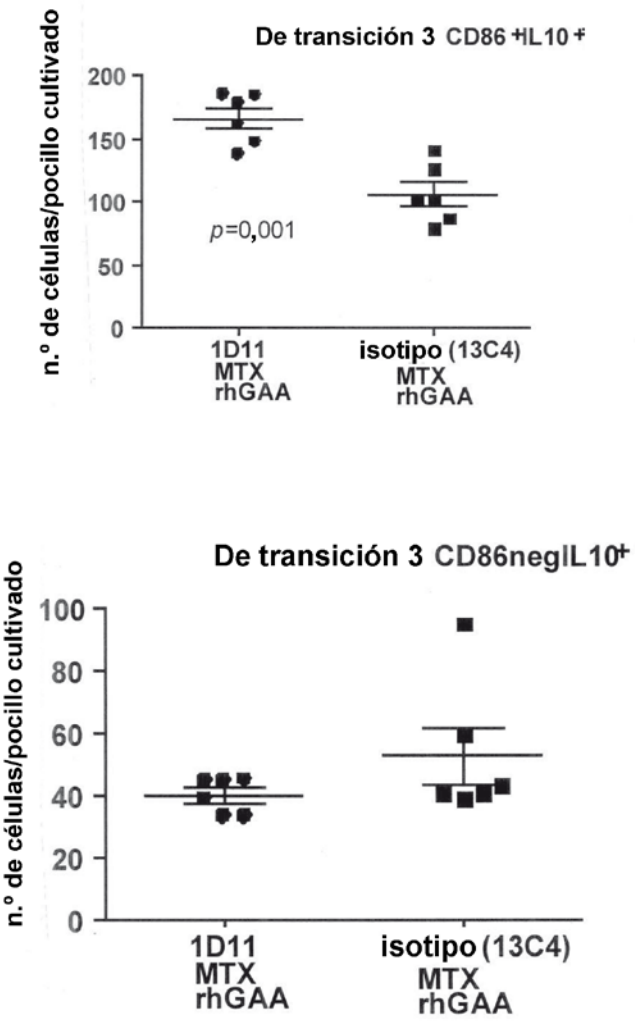
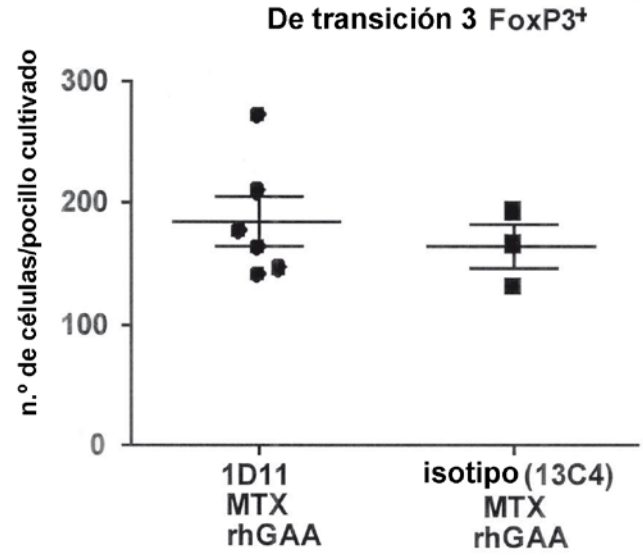


Figura 49C


De transición 3 FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
300
200
100
0
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA

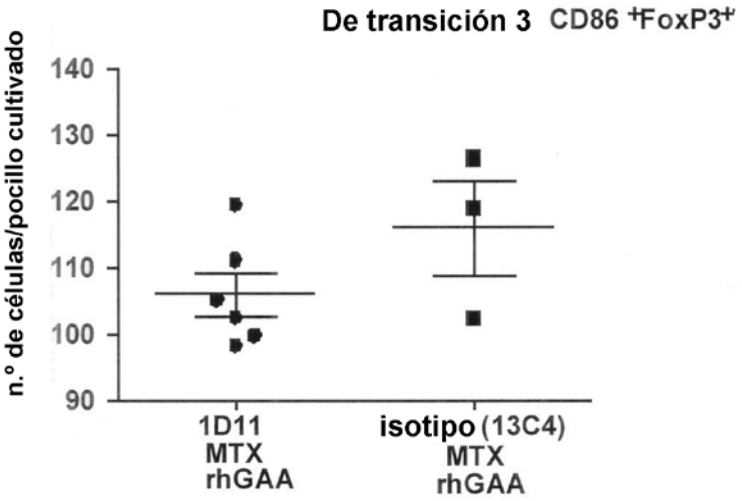

De transición 3 CD86 +FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
140
130
120
110
100
90
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA

**Figura 49C, cont.**

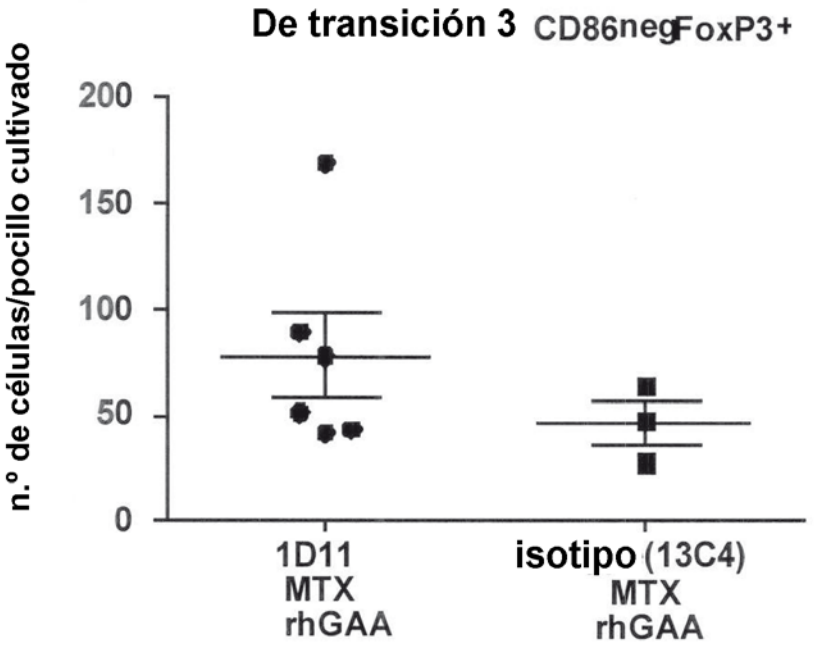
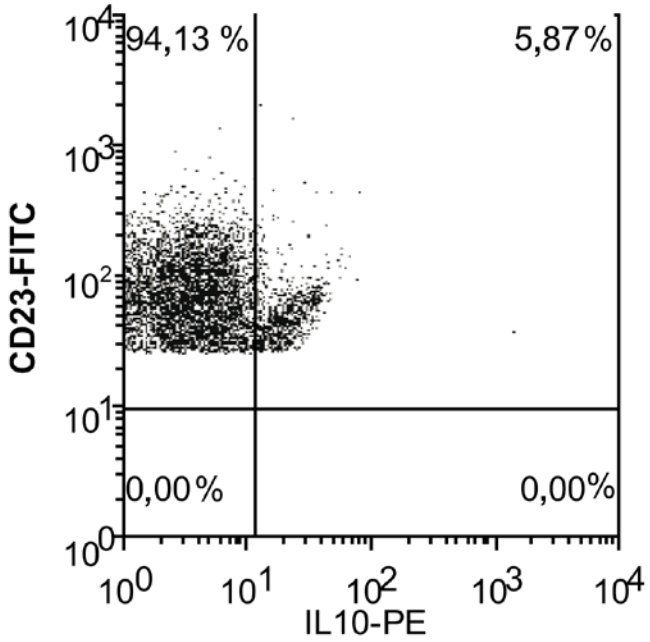


**Figura 50A**


94,13 %
5,87 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
IL10-PE

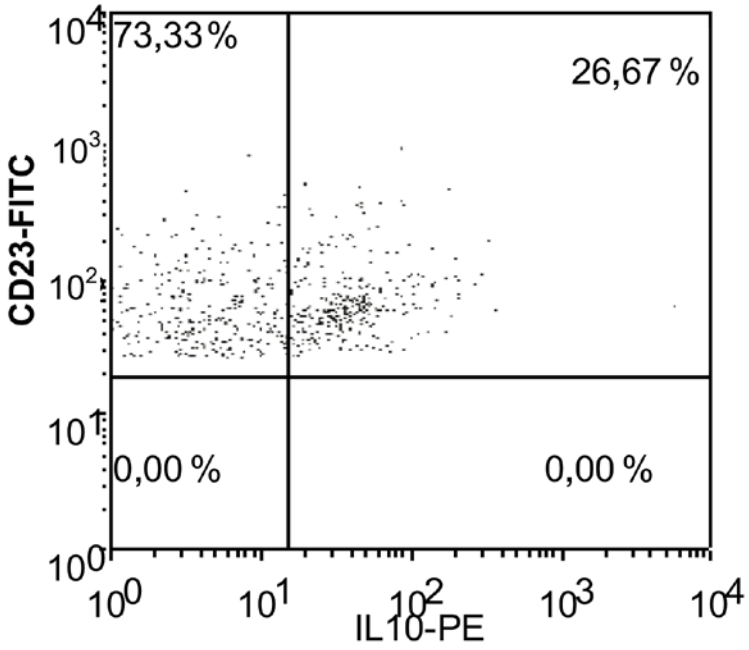

73,33 %
26,67 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
IL10-PE

**Figura 50A, cont.**

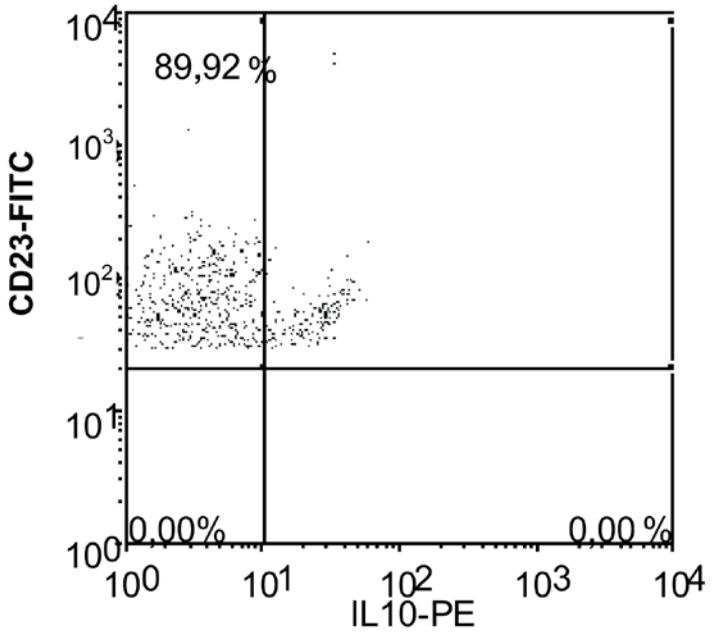



**Figura 50B**

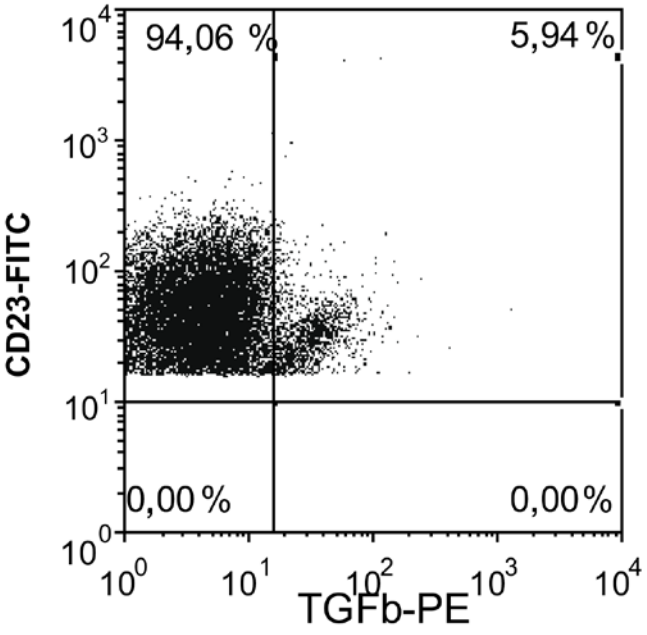
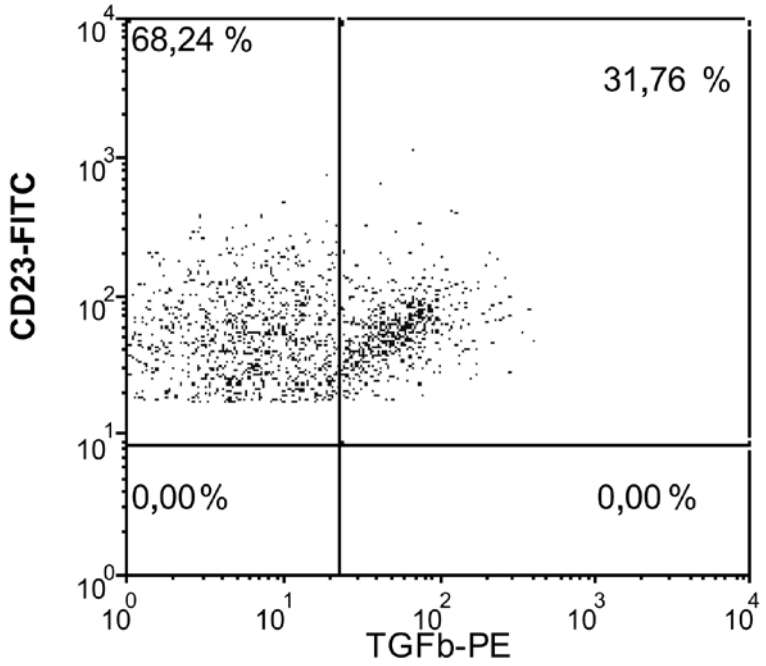


**Figura 50B, cont.**



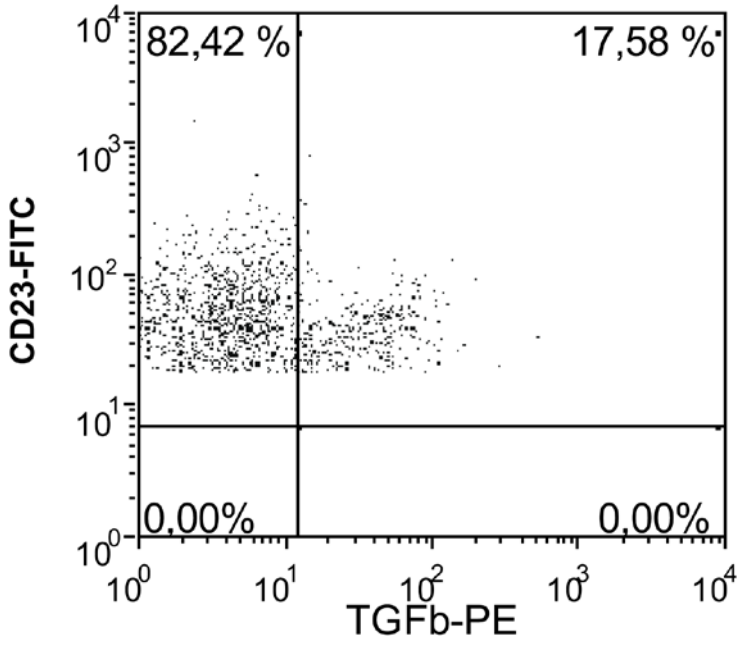
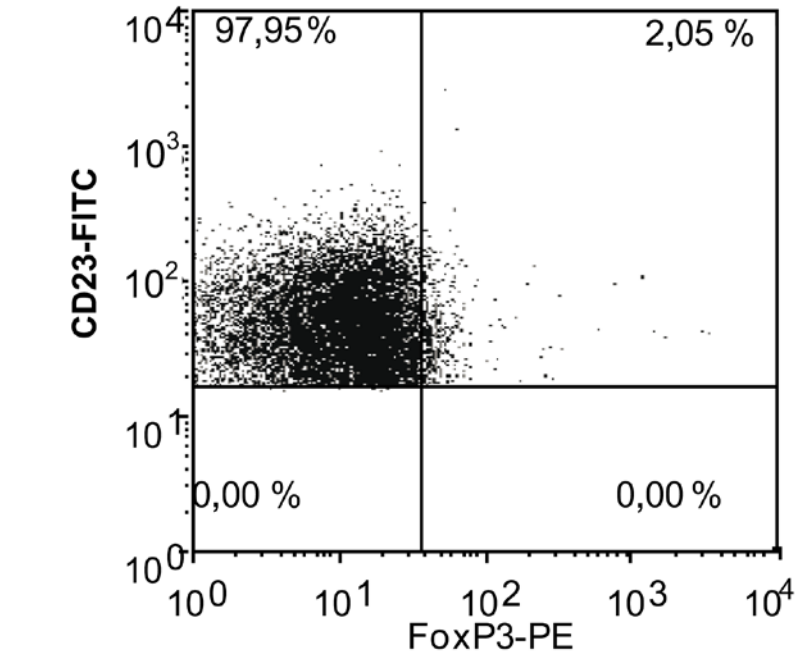



**Figura 50C**


97,95%
2,05 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
FoxP3-PE

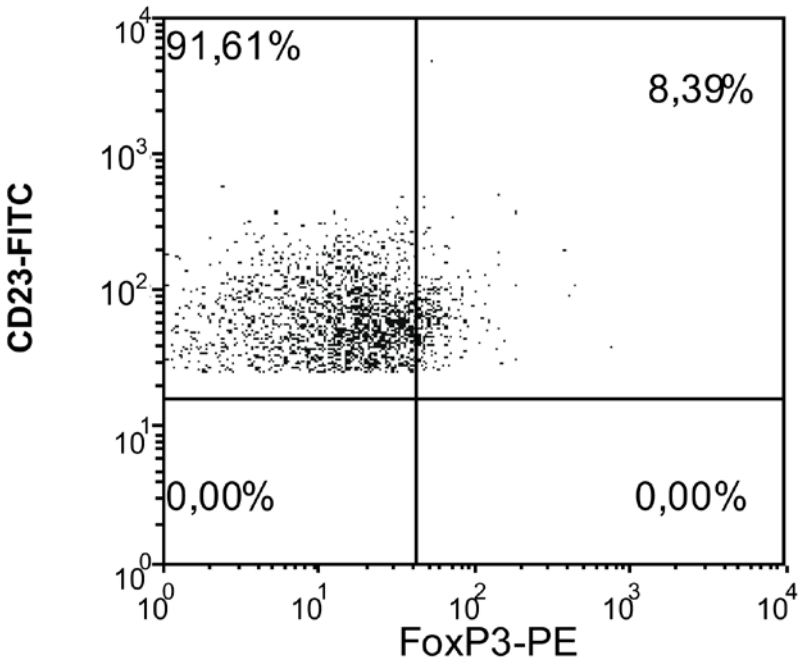
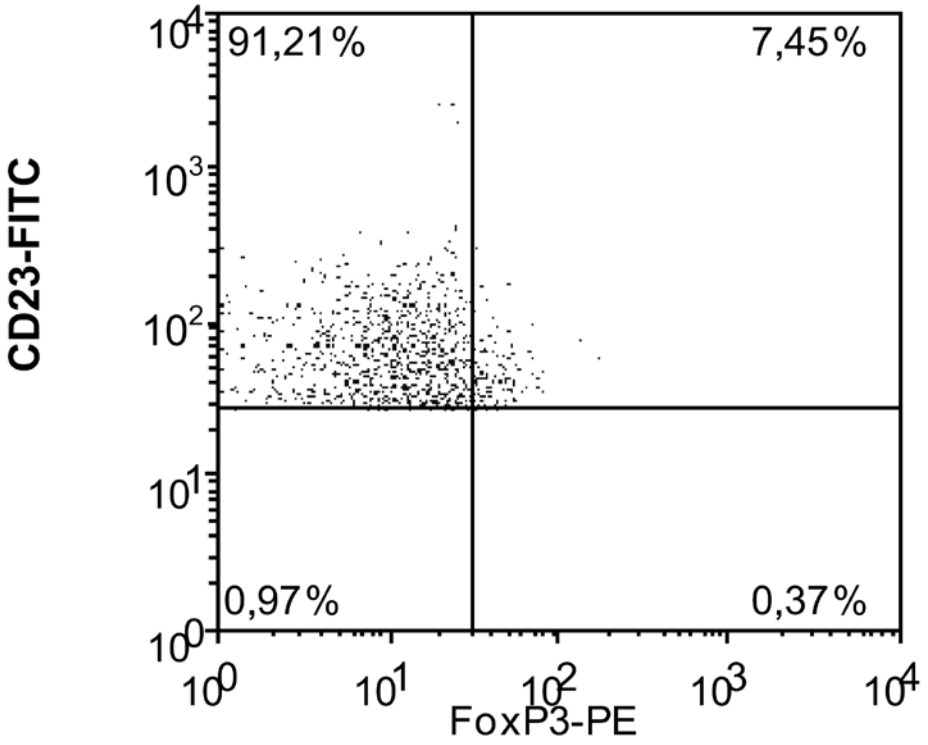

91,61%
8,39%
0,00%
0,00%
CD23-FITC
FoxP3-PE

**Figura 50C, cont.**



-

**Figura 51A**

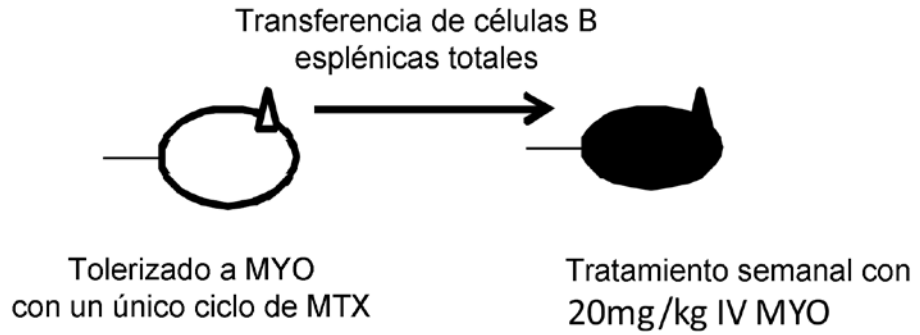



**Figura 51B**

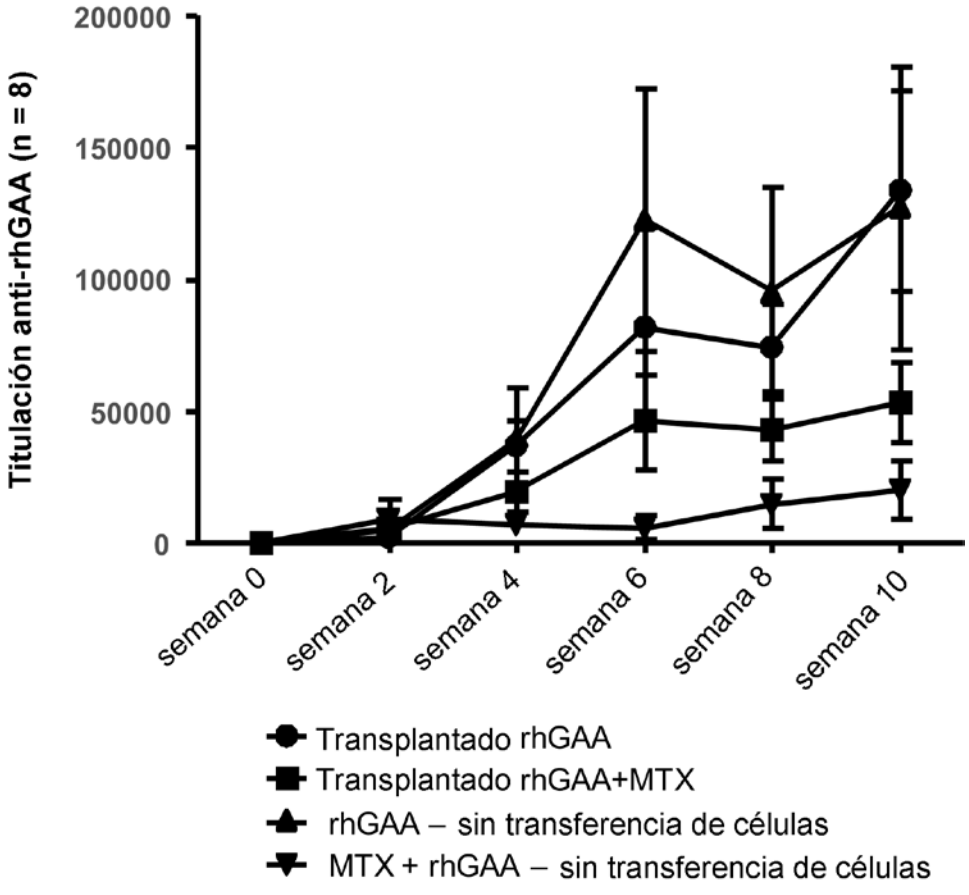


**Figura 52**

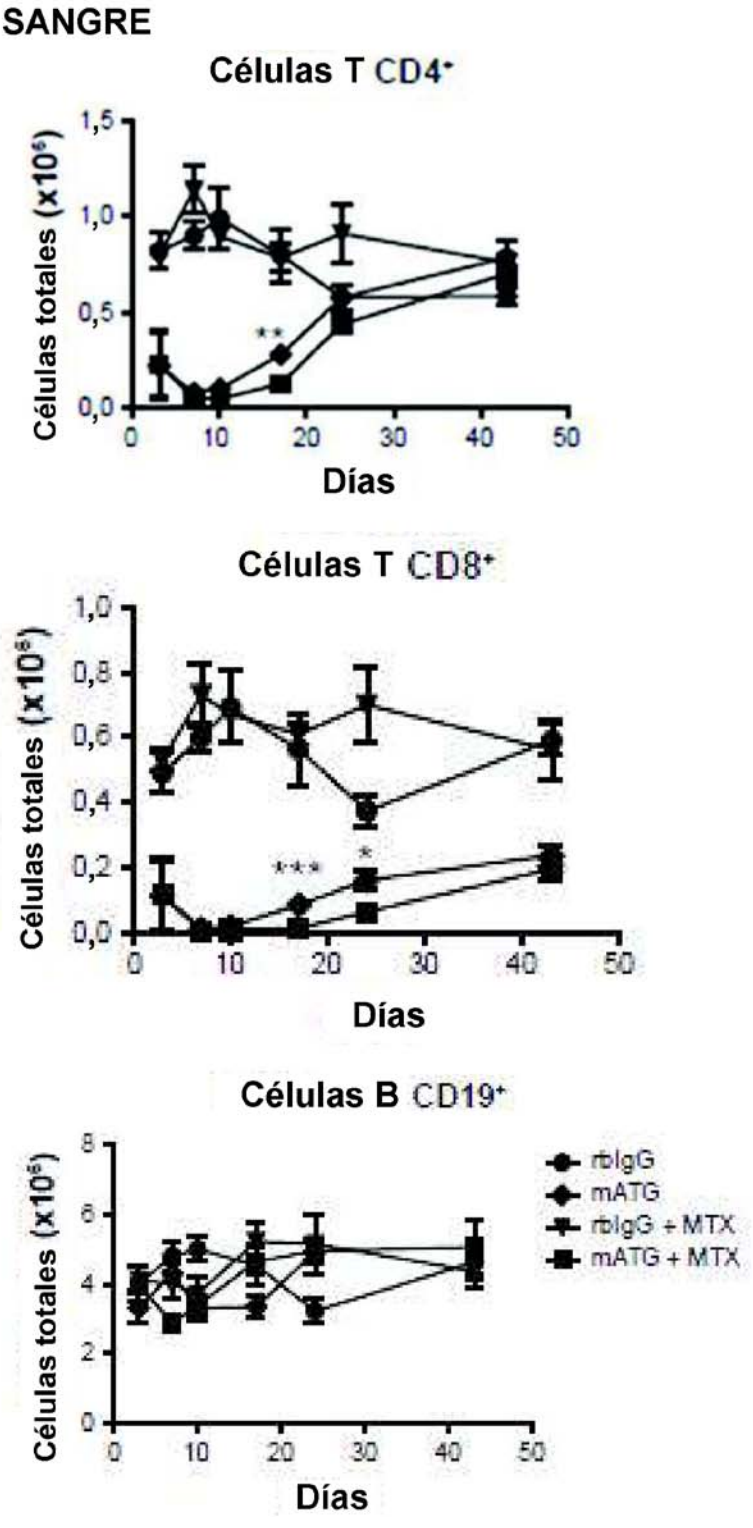
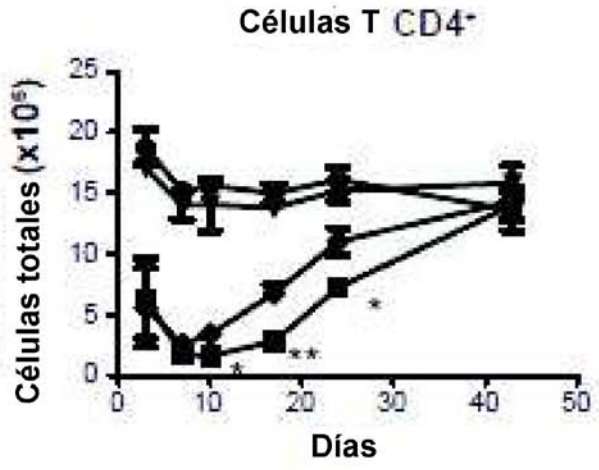
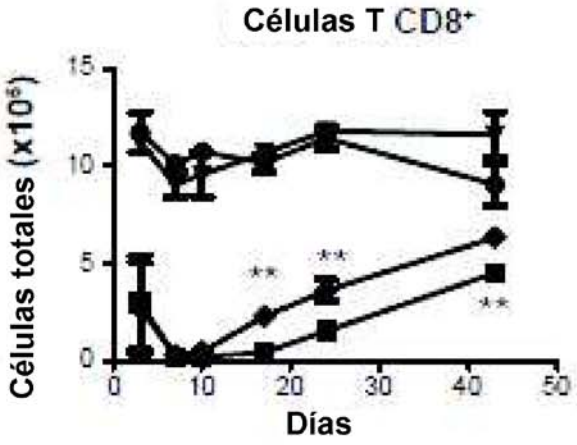

SANGRE
Células T CD4+
Células totales (x10⁶)
1,5
1,0
0,5
0,0
**
0
10
20
30
40
50
Días
Células T CD8+
Células totales (x10⁶)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
*
0
10
20
30
40
50
Días
Células B CD19+
Células totales (x10⁶)
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
Días
rbIgG
mATG
rbIgG + MTX
mATG + MTX

**Figura 52, cont.**

**BAZO**



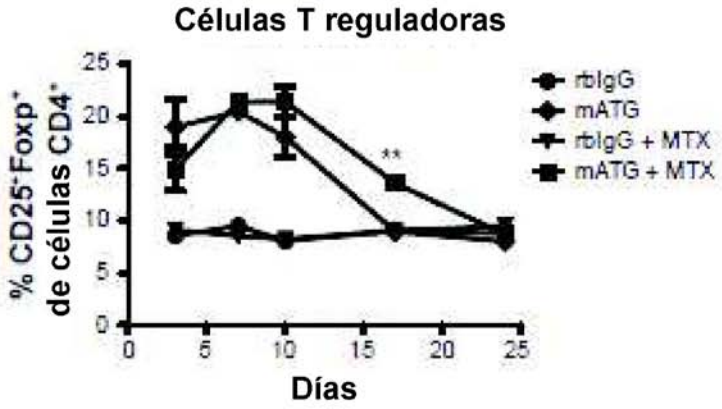



**Figura 53**

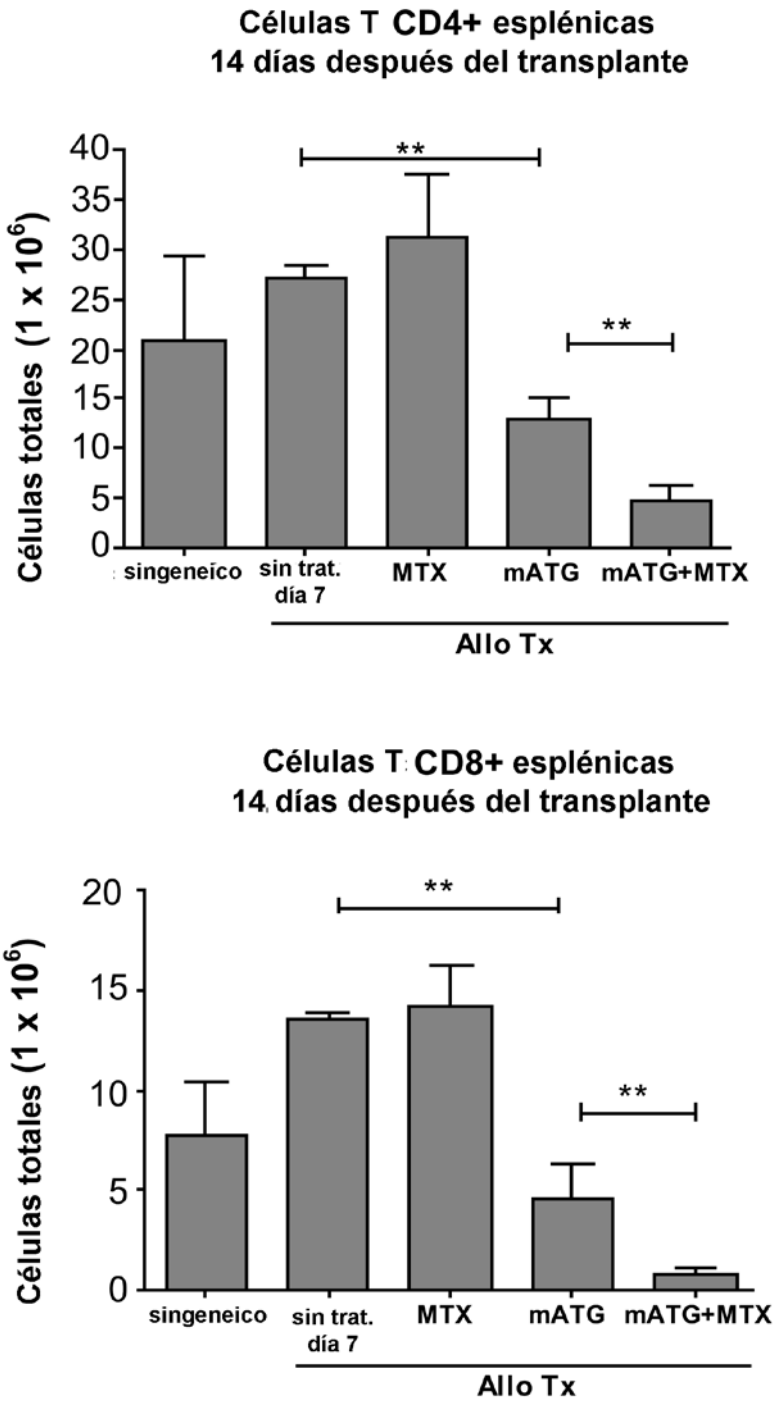
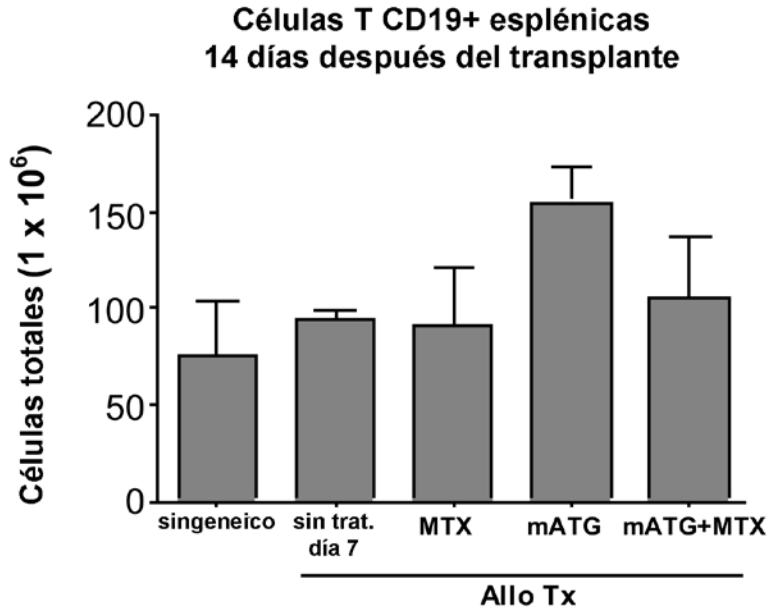

Células T CD4+ esplénicas
14 días después del transplante
Células totales (1 x 10^6)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
**
**
singeneico
sin trat. día 7
MTX
mATG
mATG+MTX
Allo Tx
Células T CD8+ esplénicas
14 días después del transplante
Células totales (1 x 10^6)
20
15
10
5
0
**
**
singeneico
sin trat. día 7
MTX
mATG
mATG+MTX
Allo Tx

**Figura 53, cont.**



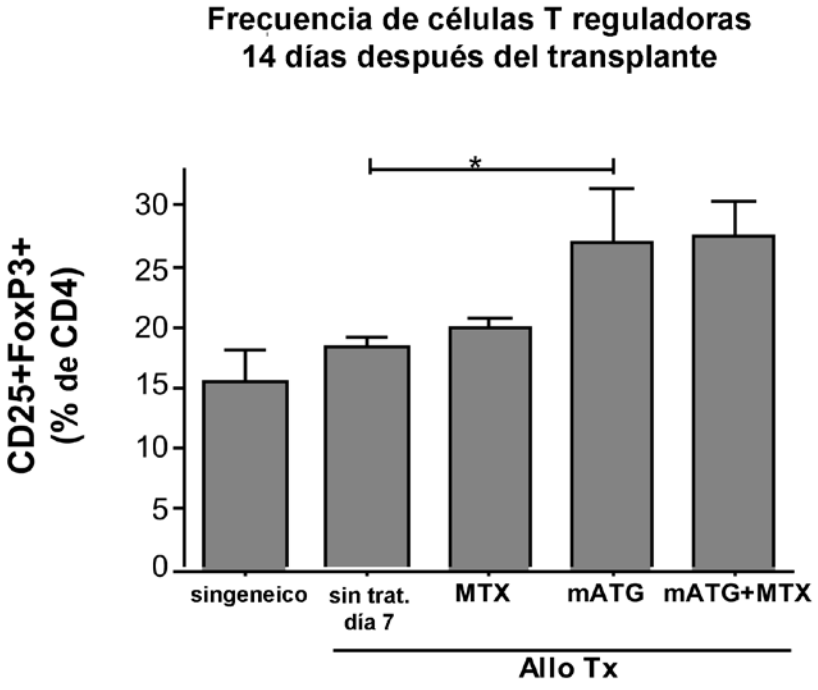
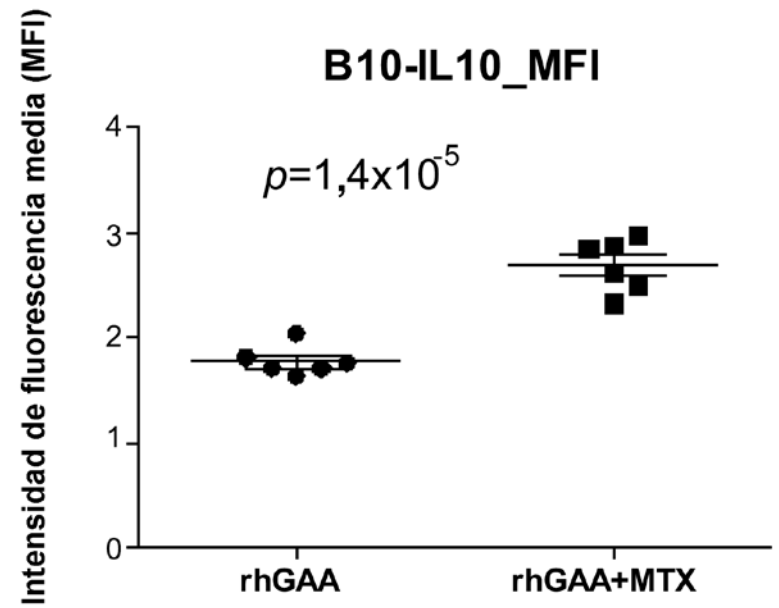



**Figura 54**


B10-IL10_MFI
Intensidad de fluorescencia media (MFI)
p=1,4x10-5
4
3
2
1
0
rhGAA
rhGAA+MTX

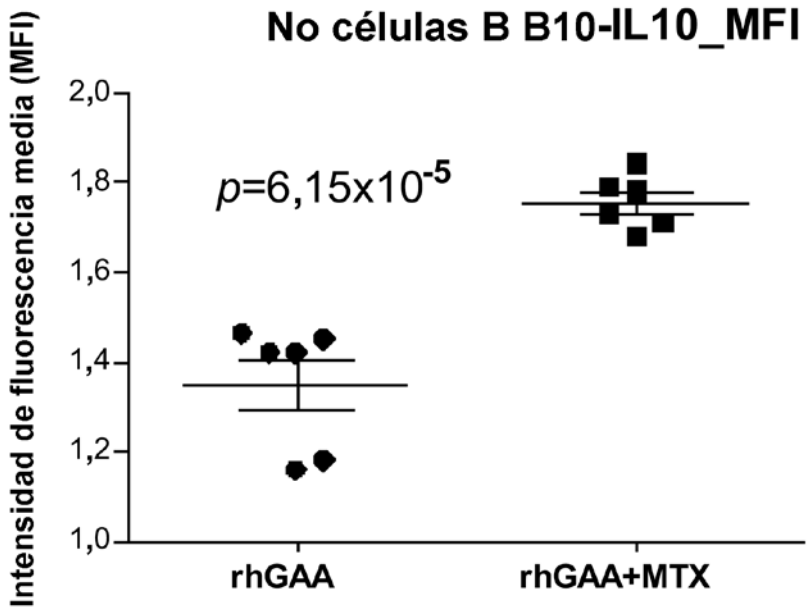
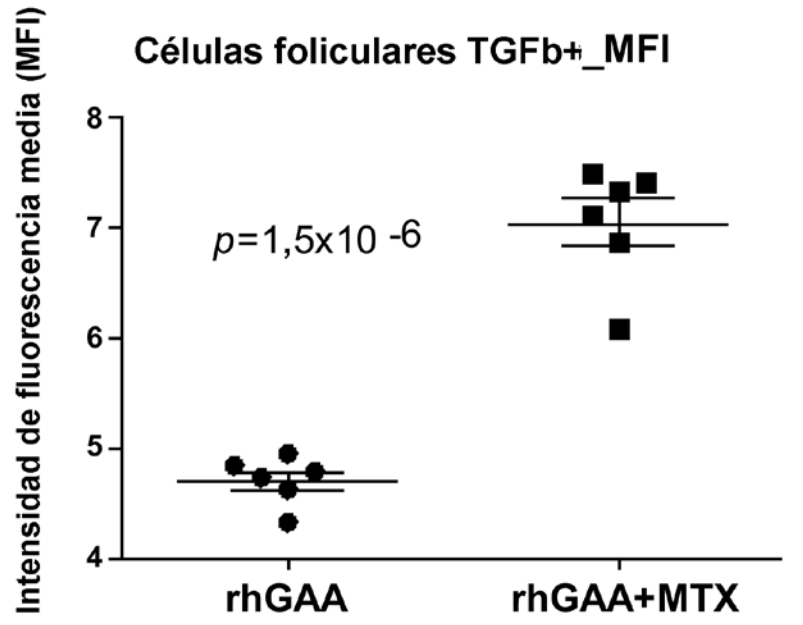

No células B B10-IL10_MFI
Intensidad de fluorescencia media (MFI)
p=6,15x10-5
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
rhGAA
rhGAA+MTX

Figura 55


Células foliculares TGFb+_MFI
Intensidad de fluorescencia media (MFI)
8
7
6
5
4
p=1,5x10 -6
rhGAA
rhGAA+MTX

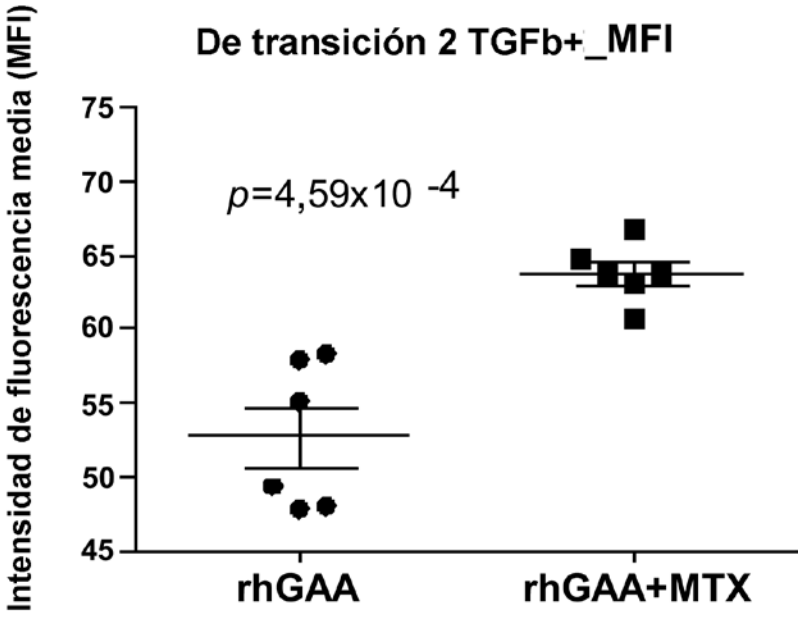

De transición 2 TGFb+_MFI
Intensidad de fluorescencia media (MFI)
75
70
65
60
55
50
45
p=4,59x10 -4
rhGAA
rhGAA+MTX

**Figura 55, cont.**

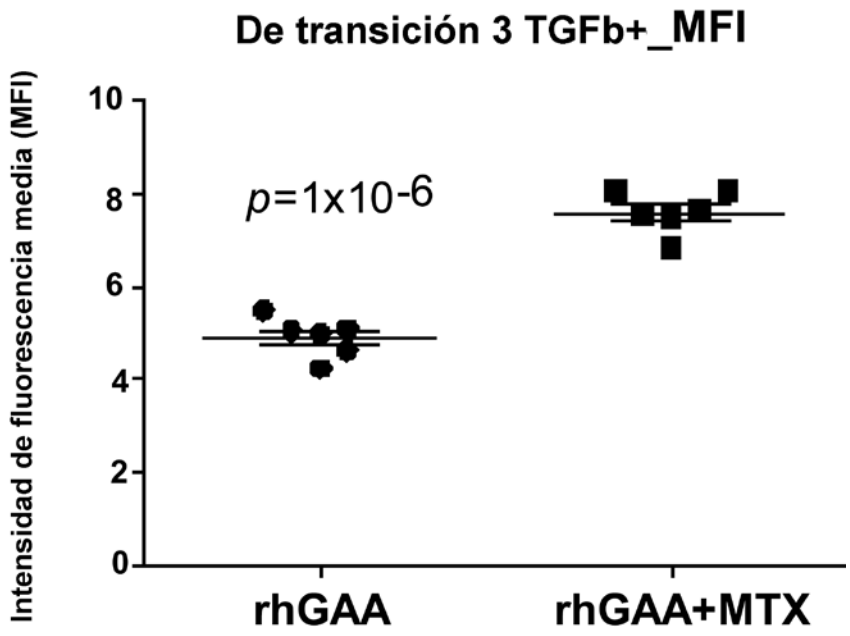


Figura 56

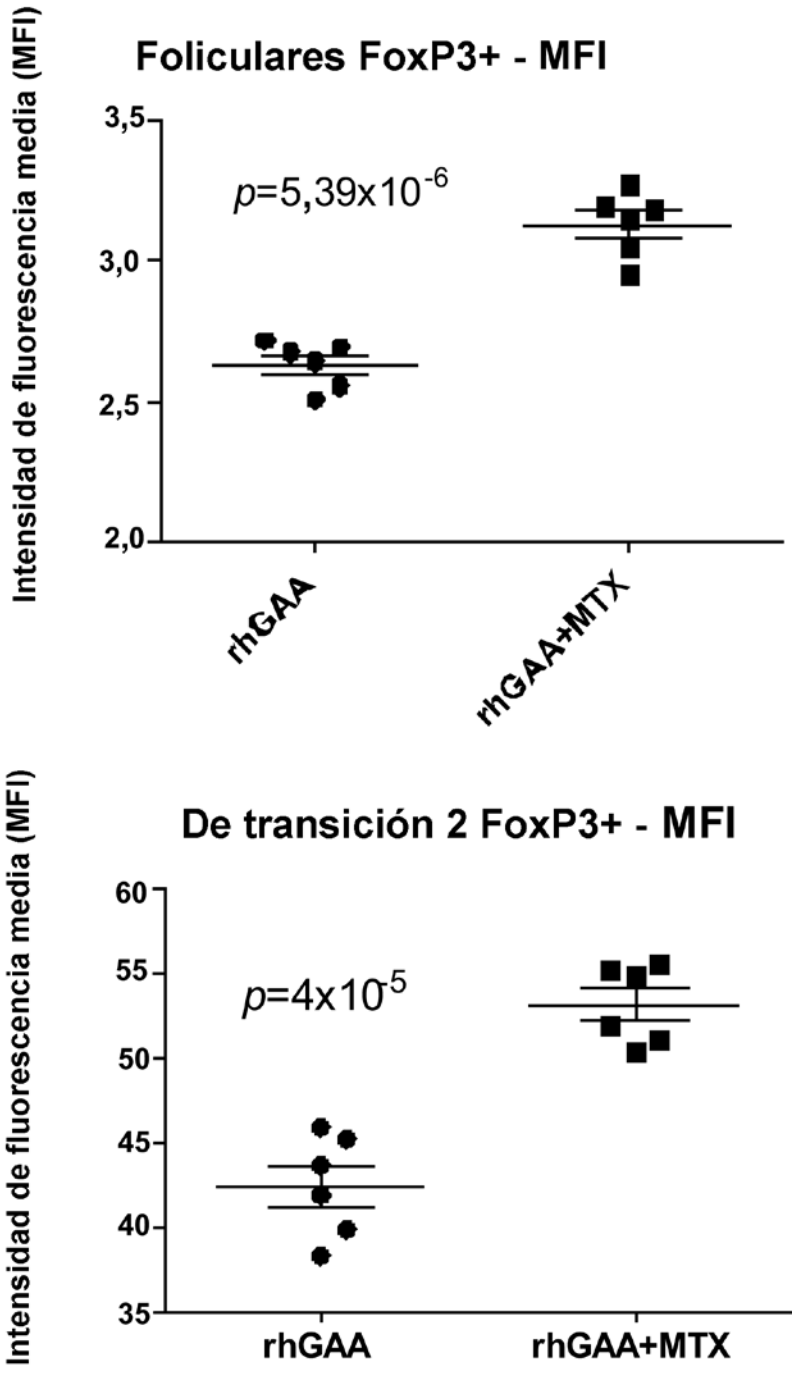

Foliculares FoxP3+ - MFI
Intensidad de fluorescencia media (MFI)
3,5
3,0
2,5
2,0
p=5,39x10-6
rhGAA
rhGAA+MTX
De transición 2 FoxP3+ - MFI
Intensidad de fluorescencia media (MFI)
60
55
50
45
40
35
p=4x10-5
rhGAA
rhGAA+MTX

Figura 56, cont.

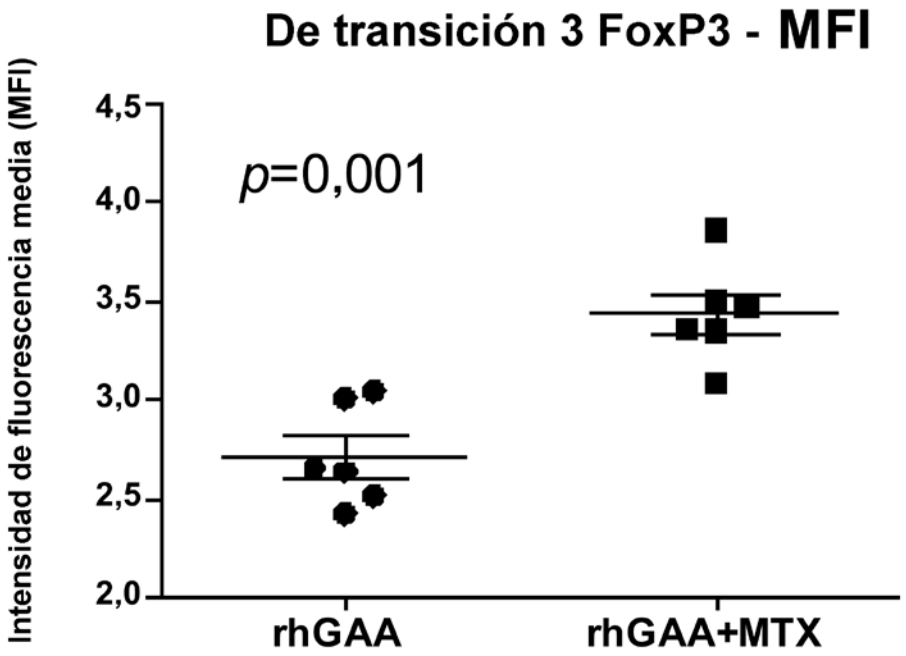


**Figura 42A**

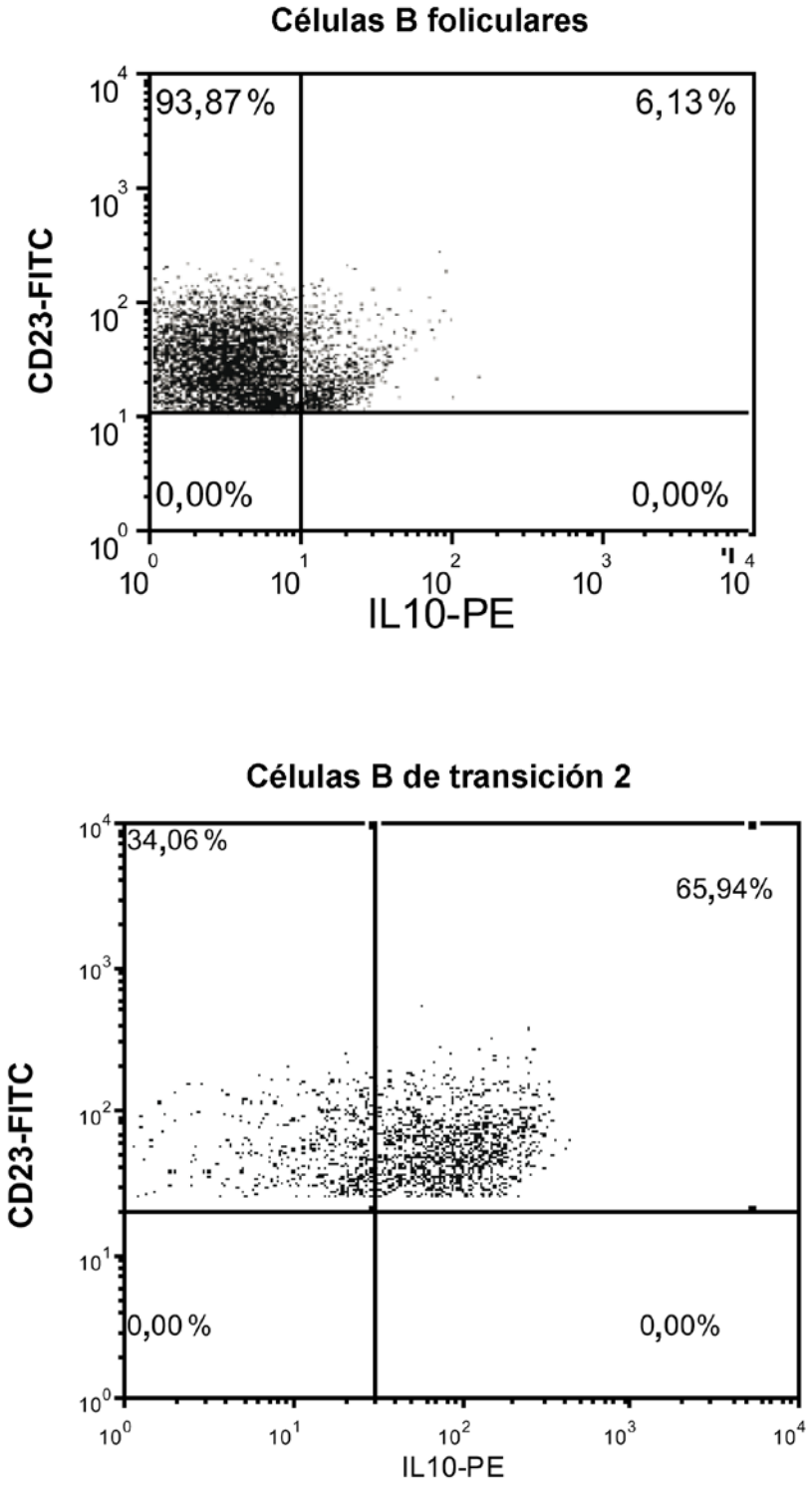

Células B foliculares
93,87 %
6,13 %
0,00%
0,00%
CD23-FITC
IL10-PE
Células B de transición 2
34,06 %
65,94%
0,00 %
0,00%
CD23-FITC
IL10-PE

**Figura 42A, cont.**

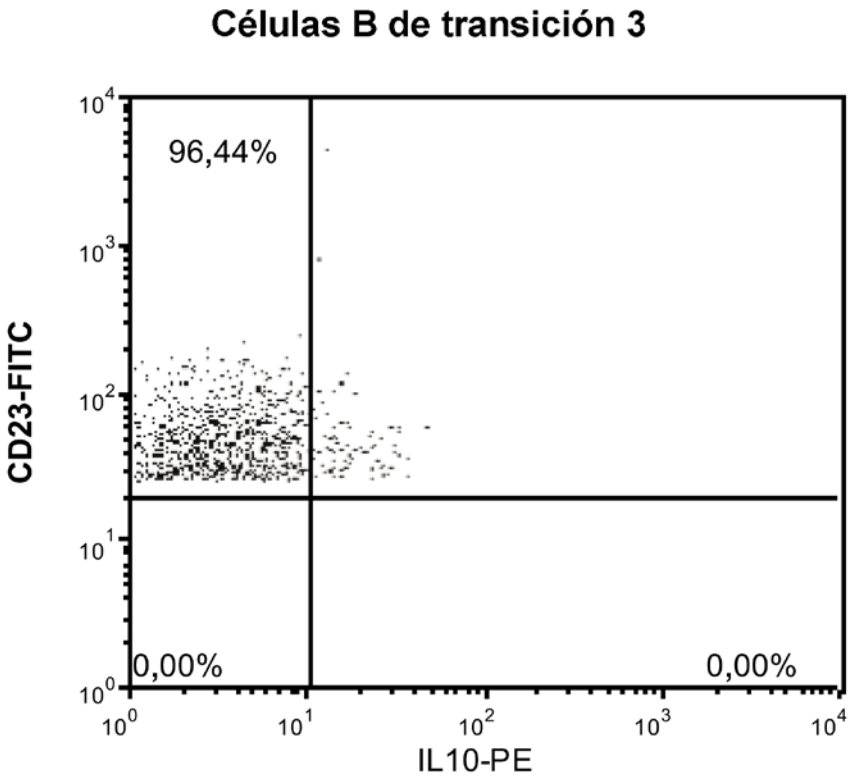


**Figura 42B**

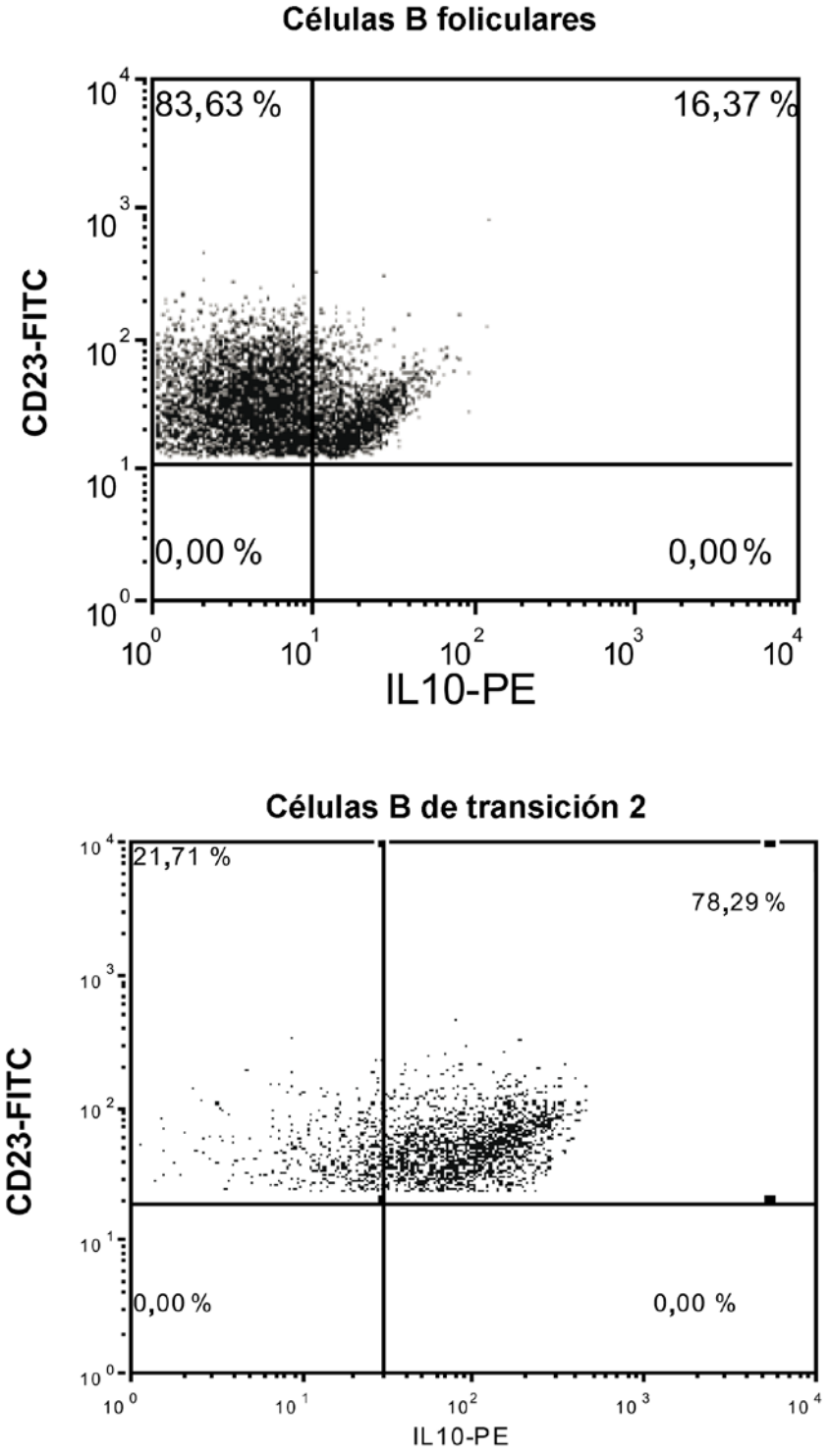

Células B foliculares
83,63 %
16,37 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
IL10-PE
Células B de transición 2
21,71 %
78,29 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
IL10-PE

**Figura 42B, cont.**

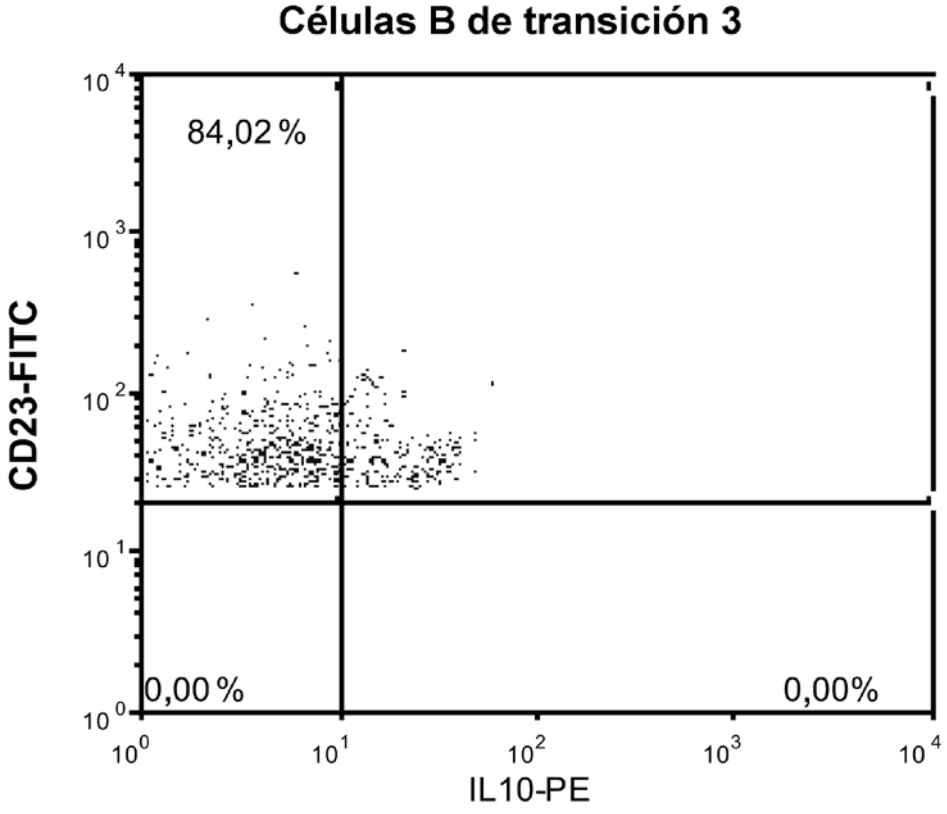


**Figura 42C**

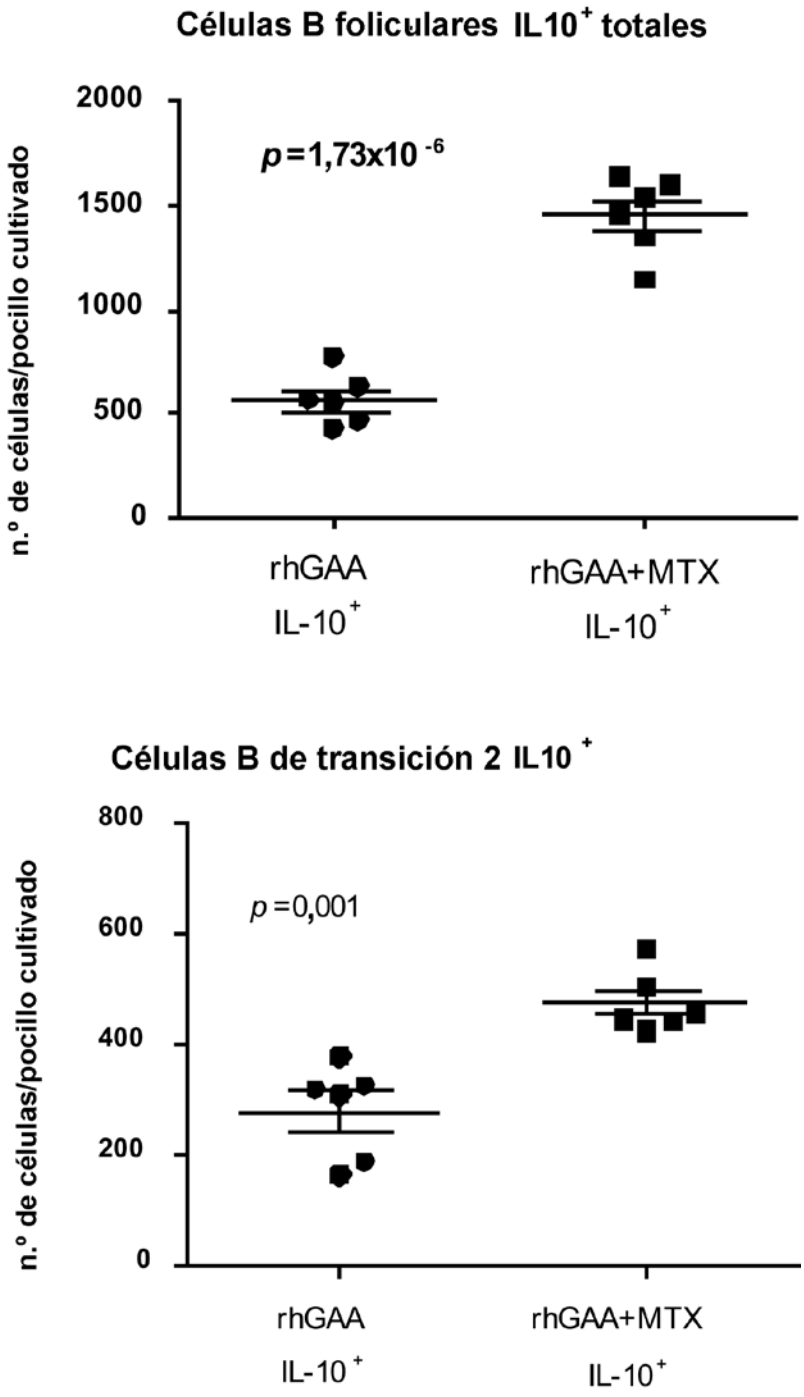

Células B foliculares IL10+ totales
n.º de células/pocillo cultivado
2000
1500
1000
500
0
p=1,73x10 -6
rhGAA
IL-10+
rhGAA+MTX
IL-10+
Células B de transición 2 IL10 +
n.º de células/pocillo cultivado
800
600
400
200
0
p =0,001
rhGAA
IL-10 +
rhGAA+MTX
IL-10+

Figura 42C, cont.

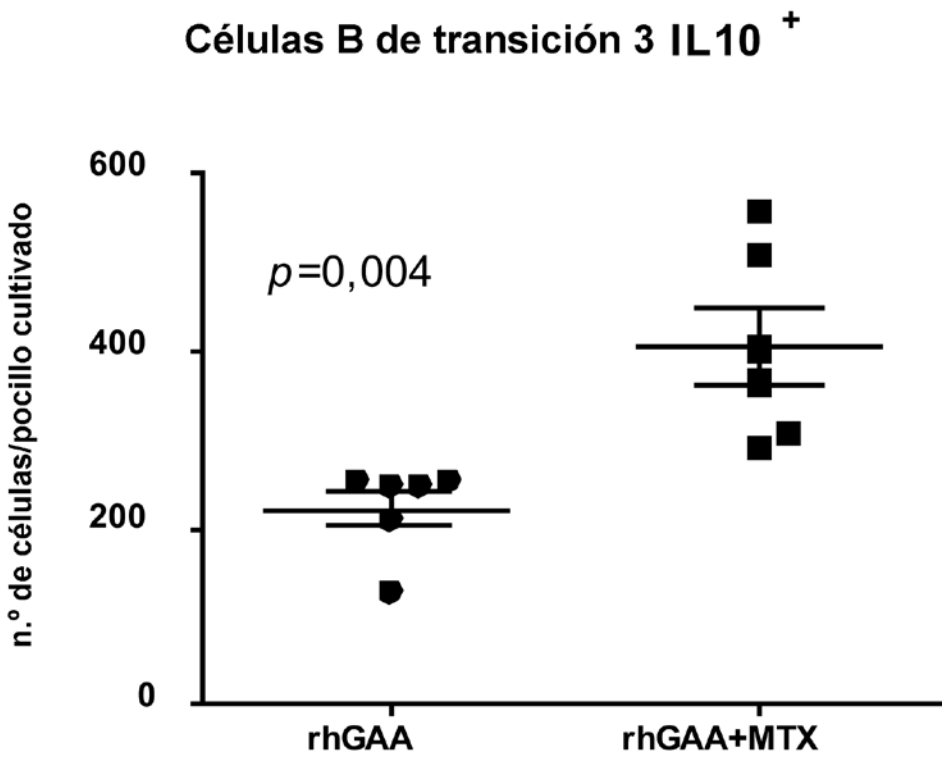


**Figura 43A**

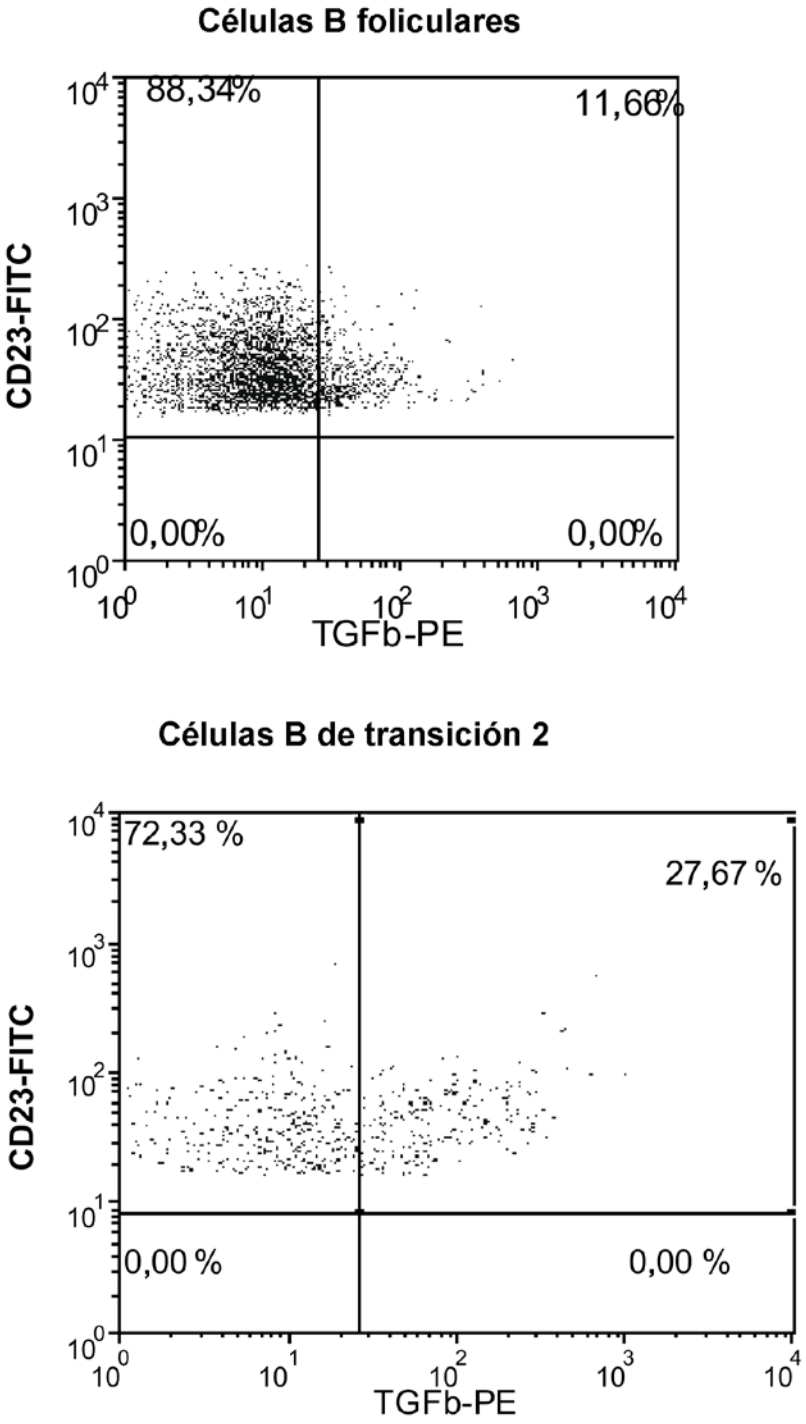

Células B foliculares
88,34%
11,66%
0,00%
0,00%
CD23-FITC
TGFb-PE
Células B de transición 2
72,33 %
27,67 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
TGFb-PE

Figura 43A, cont.

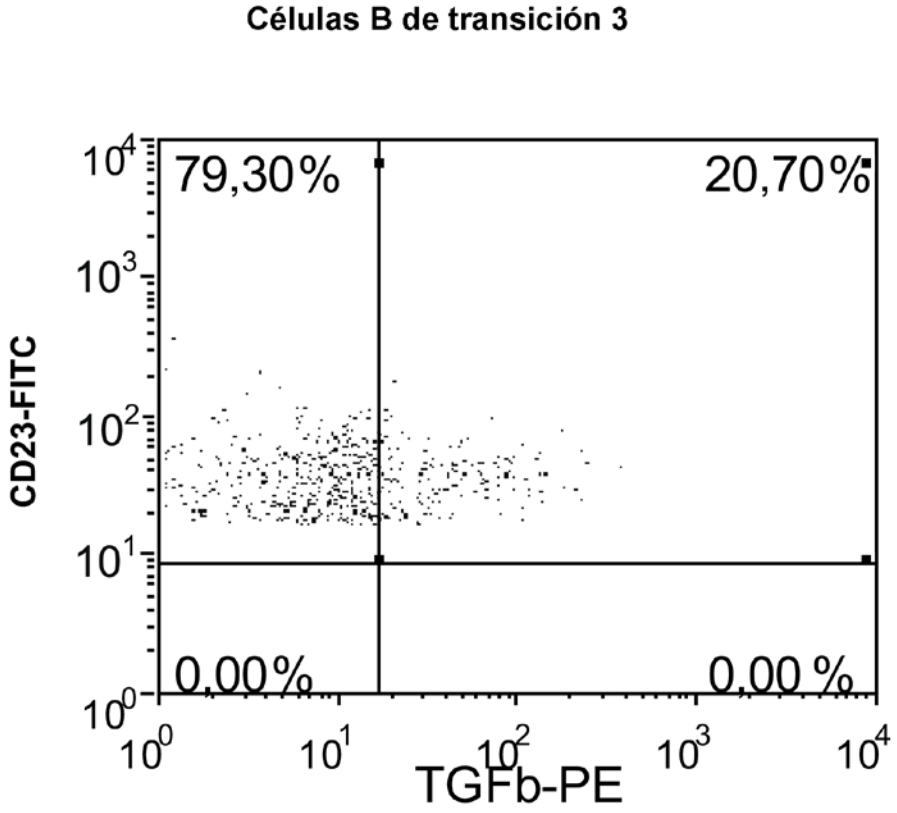


**Figura 43B**

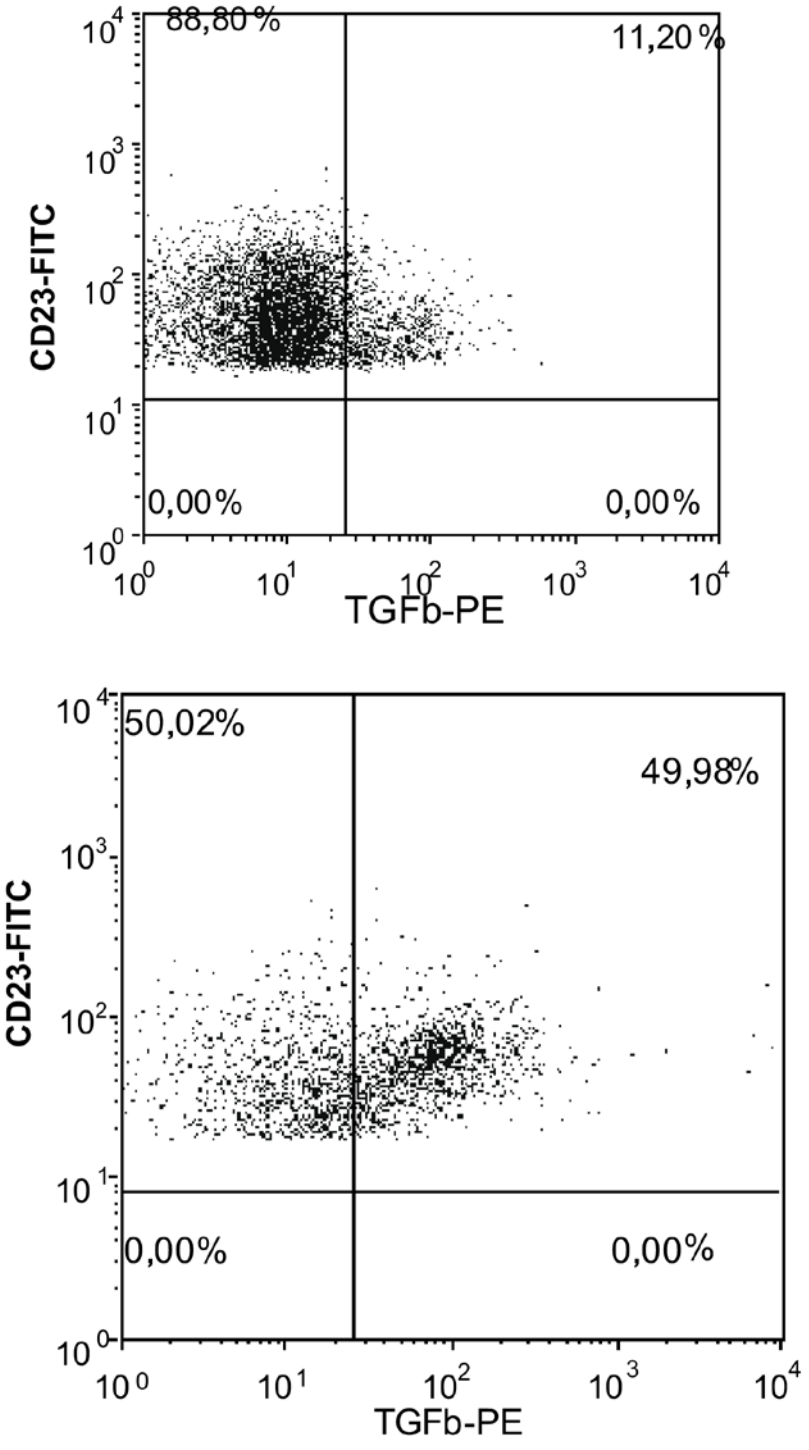

88,80%
11,20%
0,00%
0,00%
CD23-FITC
TGFb-PE
50,02%
49,98%
0,00%
0,00%
CD23-FITC
TGFb-PE

**Figura 43B, cont.**

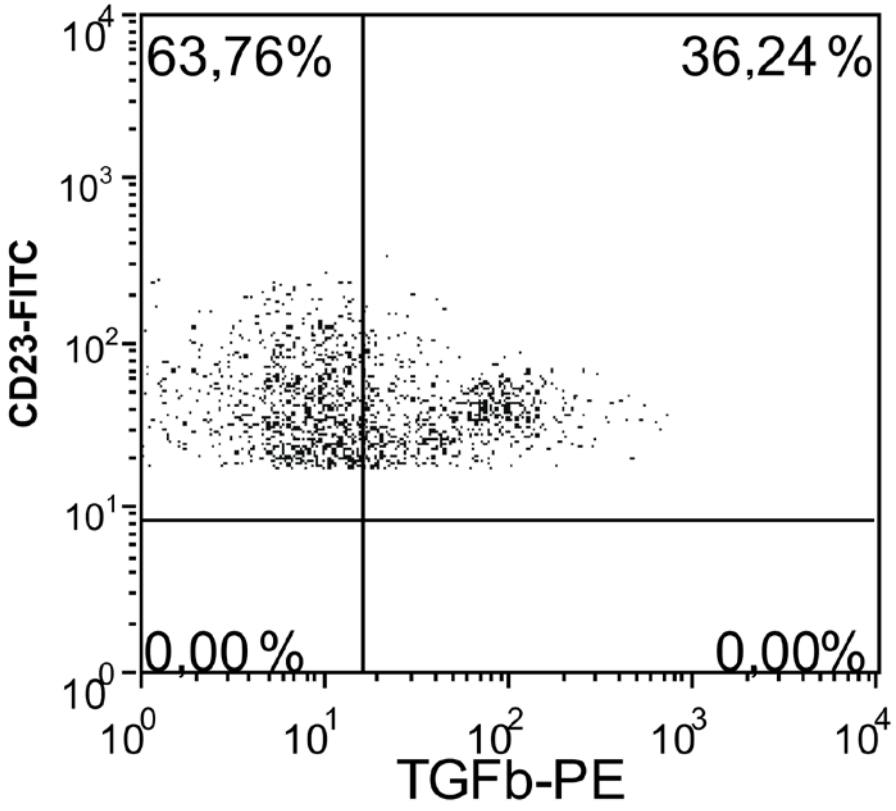
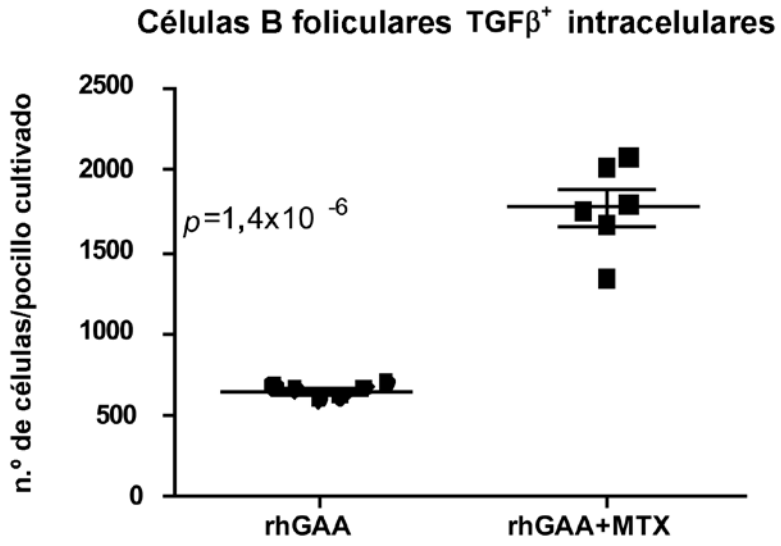


Figura 43C


Células B foliculares TGFβ+ intracelulares
n.º de células/pocillo cultivado
2500
2000
1500
1000
500
0
p=1,4x10 -6
rhGAA
rhGAA+MTX

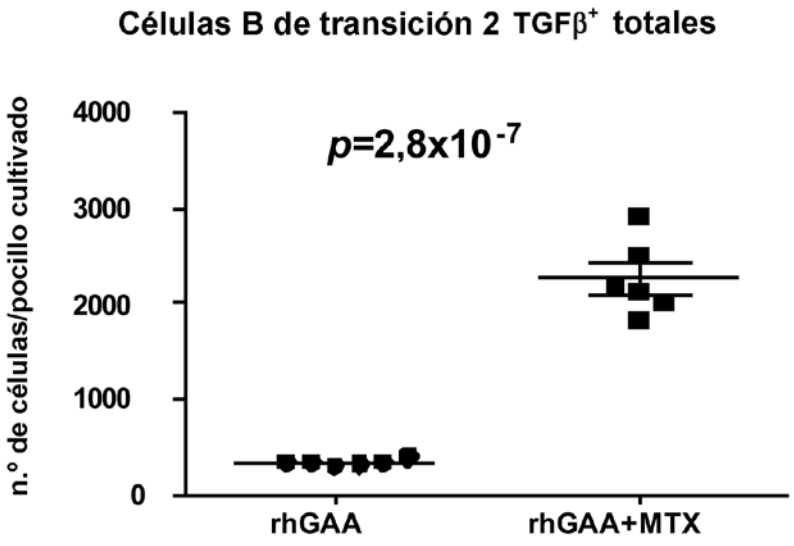

Células B de transición 2 TGFβ+ totales
n.º de células/pocillo cultivado
4000
3000
2000
1000
0
p=2,8x10-7
rhGAA
rhGAA+MTX

Figura 43C, cont.

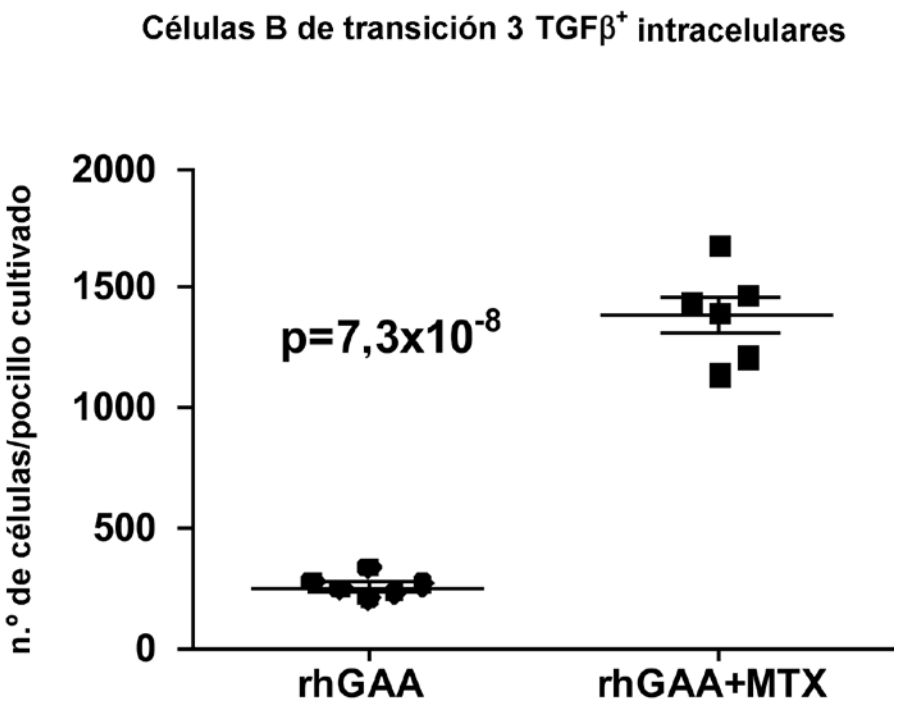


Figura 44A

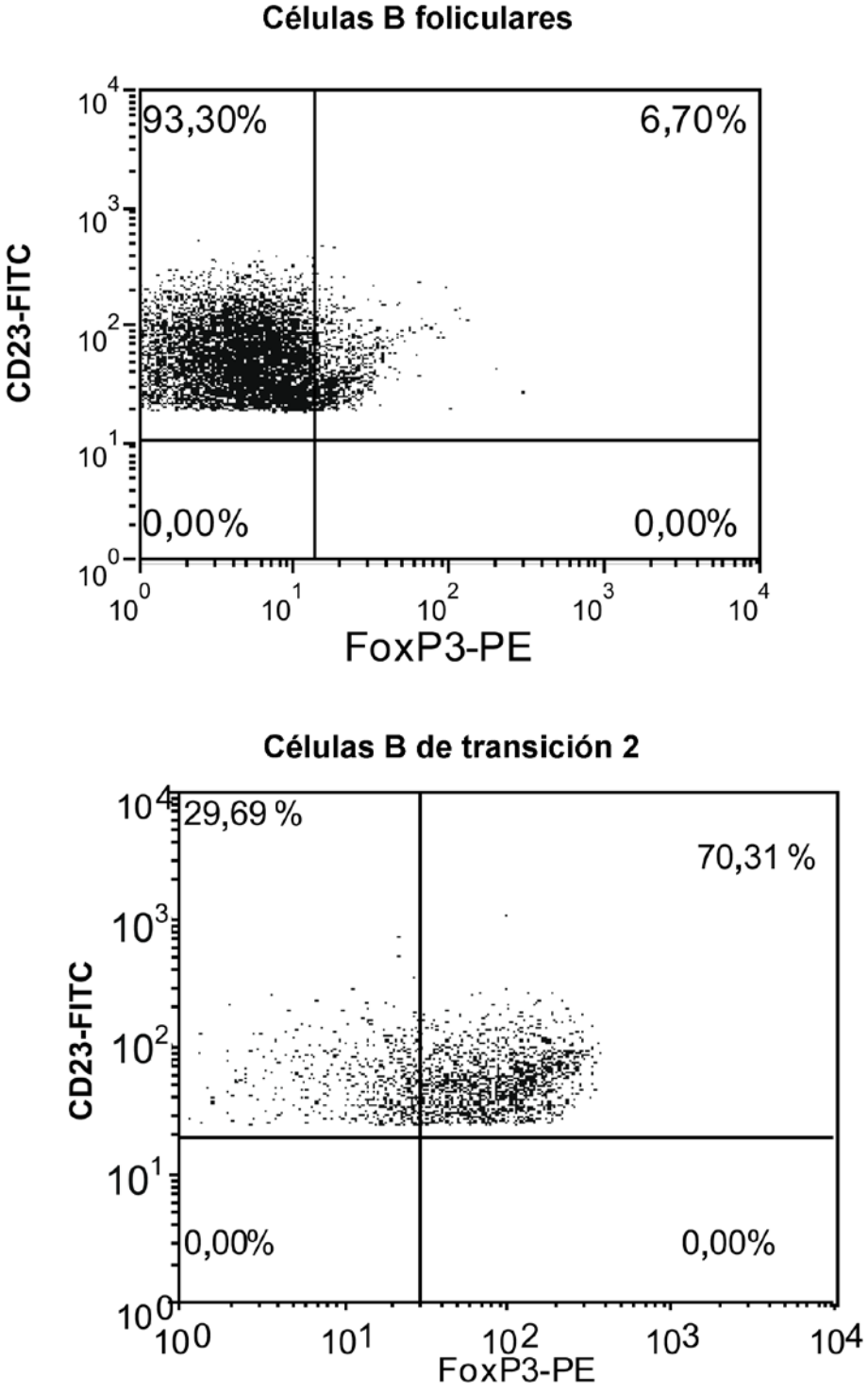

Células B foliculares
93,30%
6,70%
0,00%
0,00%
CD23-FITC
FoxP3-PE
Células B de transición 2
29,69 %
70,31 %
0,00%
0,00%
CD23-FITC
FoxP3-PE

**Figura 44A, cont.**

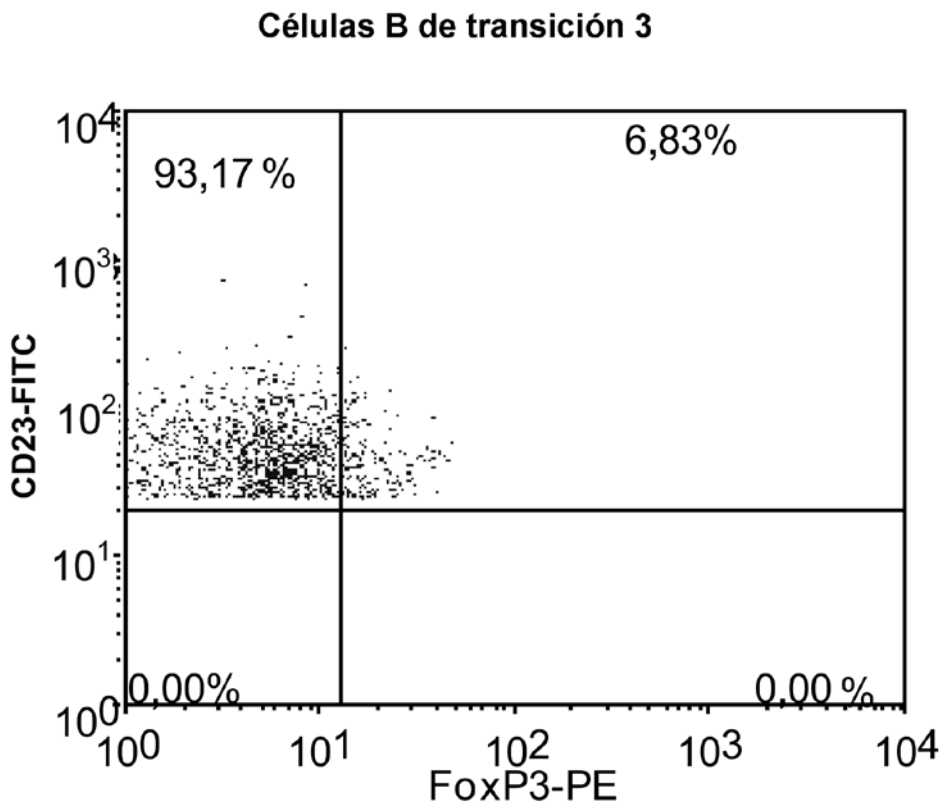
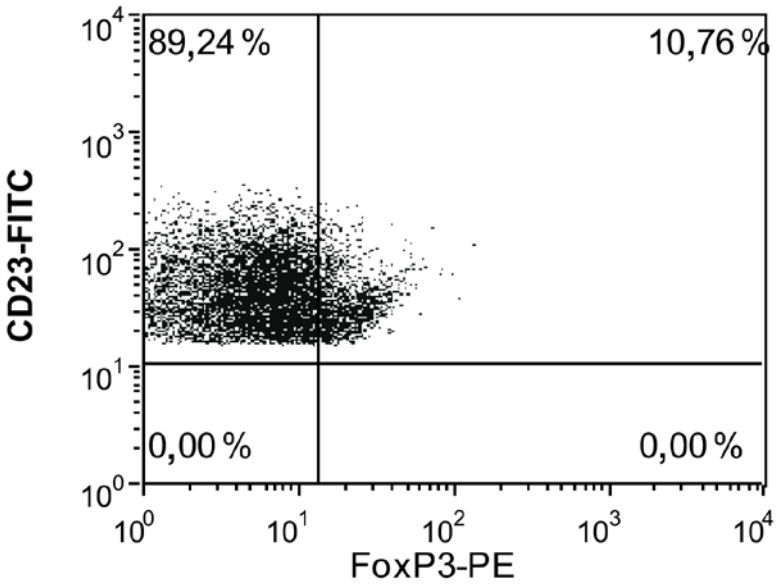


**Figura 44B**


89,24 %
10,76 %
0,00 %
0,00 %
CD23-FITC
FoxP3-PE

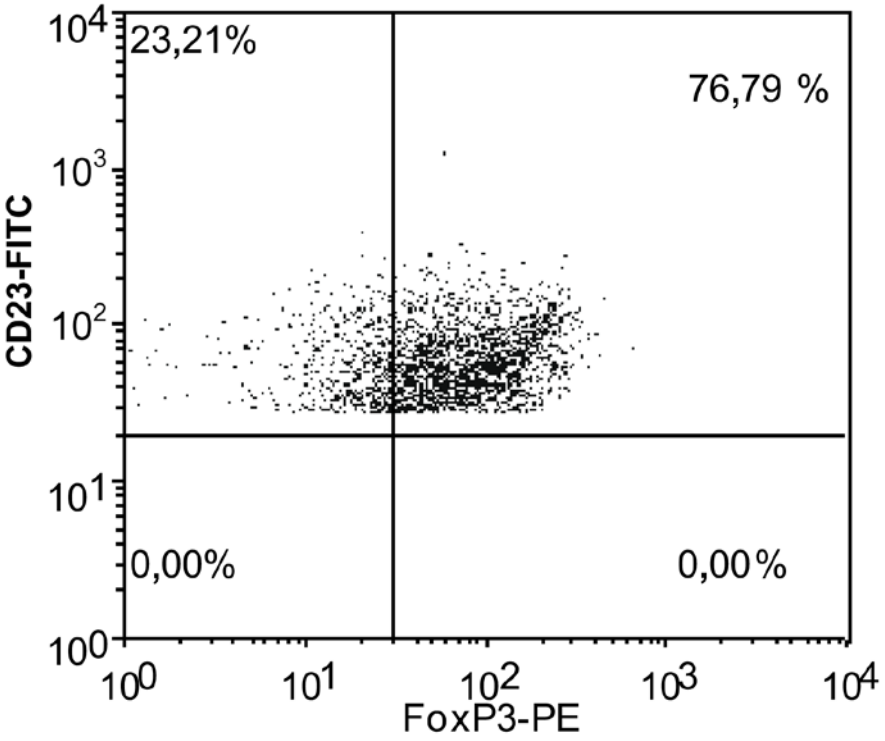

23,21%
76,79 %
0,00%
0,00 %
CD23-FITC
FoxP3-PE

**Figura 44B, cont.**

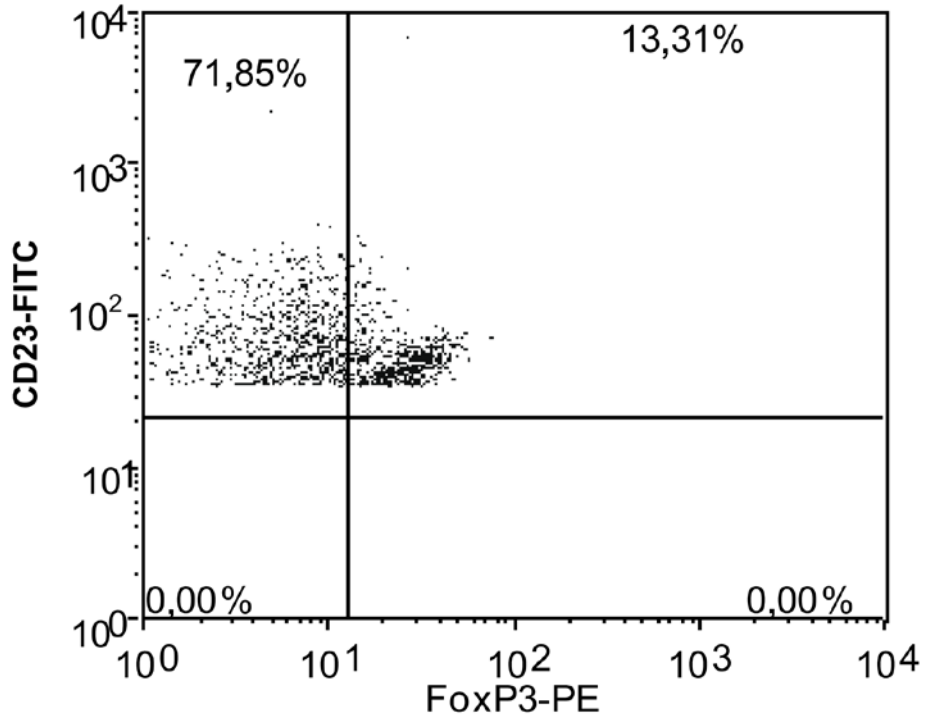
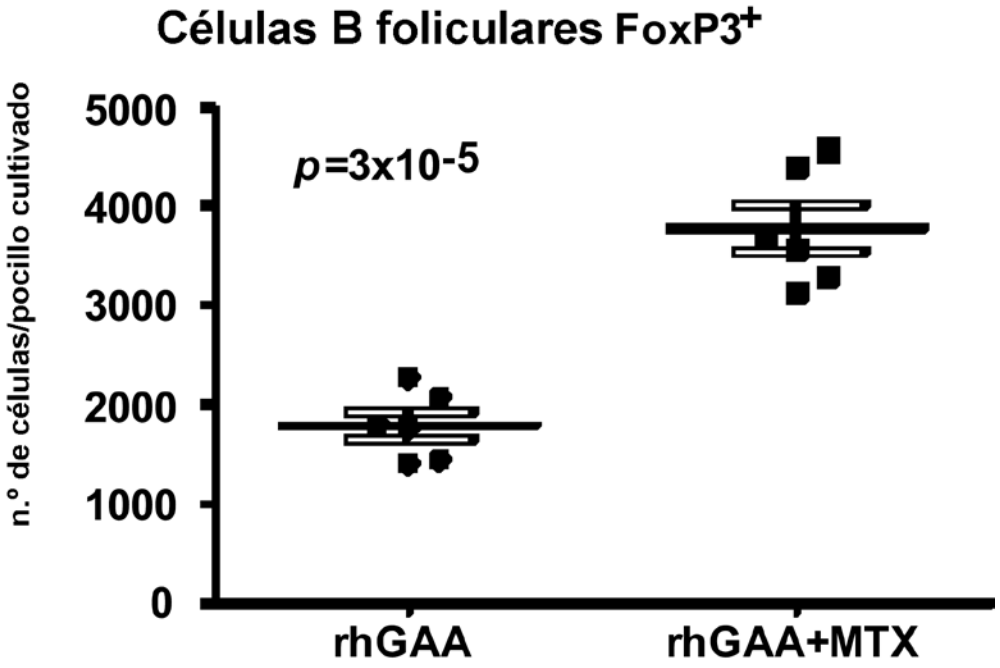


Figura 44C


Células B foliculares FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
5000
4000
3000
2000
1000
0
p=3x10-5
rhGAA
rhGAA+MTX

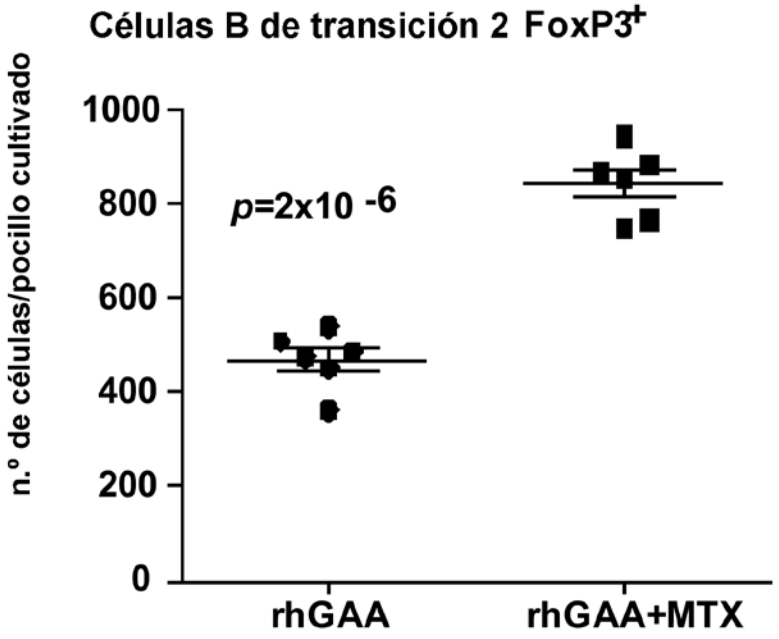

Células B de transición 2 FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
1000
800
600
400
200
0
p=2x10 -6
rhGAA
rhGAA+MTX

Figura 44C, cont.

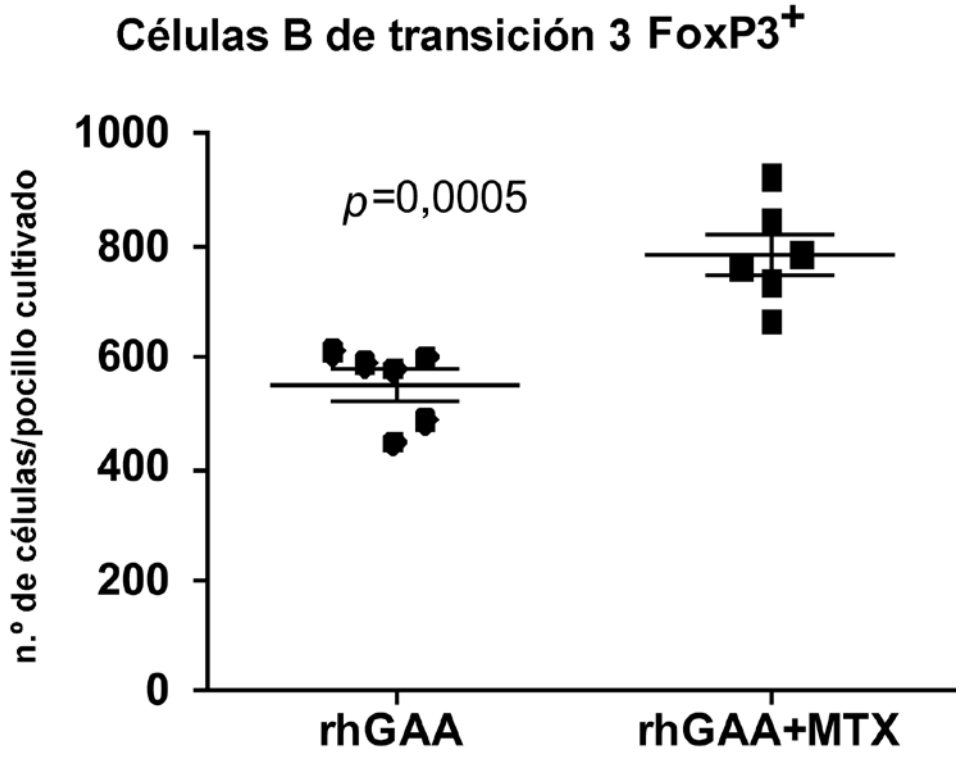


Figura 45

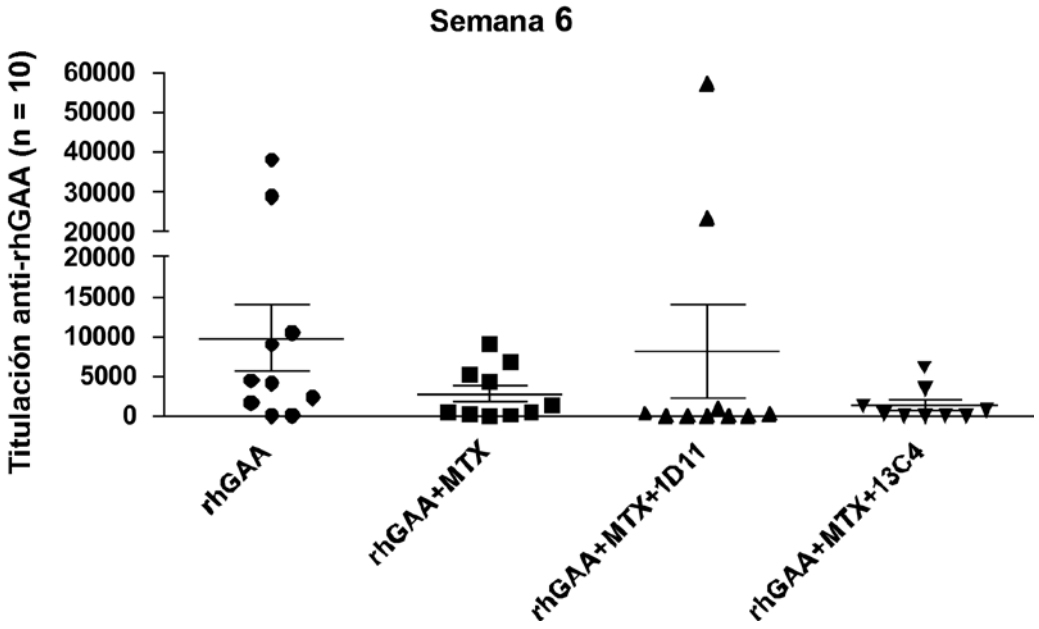

Semana 6
Titulación anti-rhGAA (n = 10)
60000
50000
40000
30000
20000
20000
15000
10000
5000
0
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX+1D11
rhGAA+MTX+13C4

Figura 46A

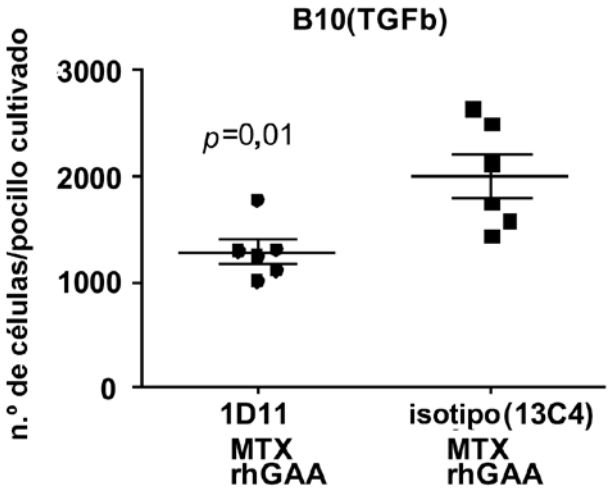



Figura 46B

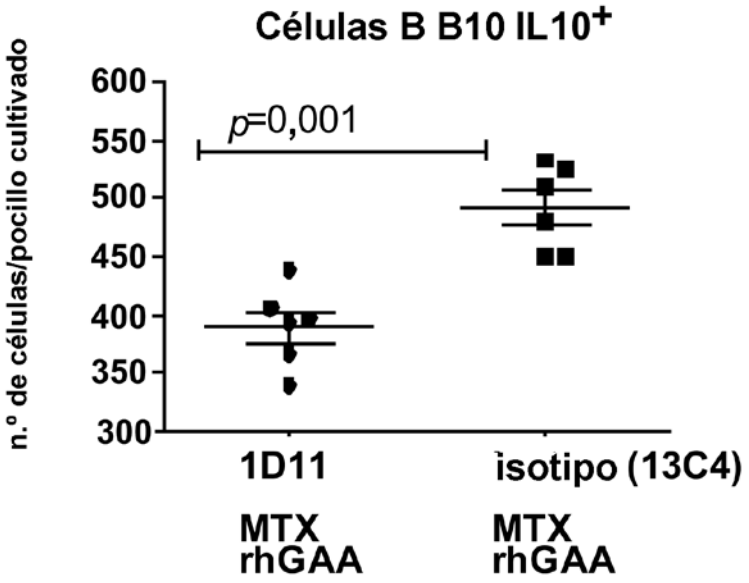


**Figura 46C**

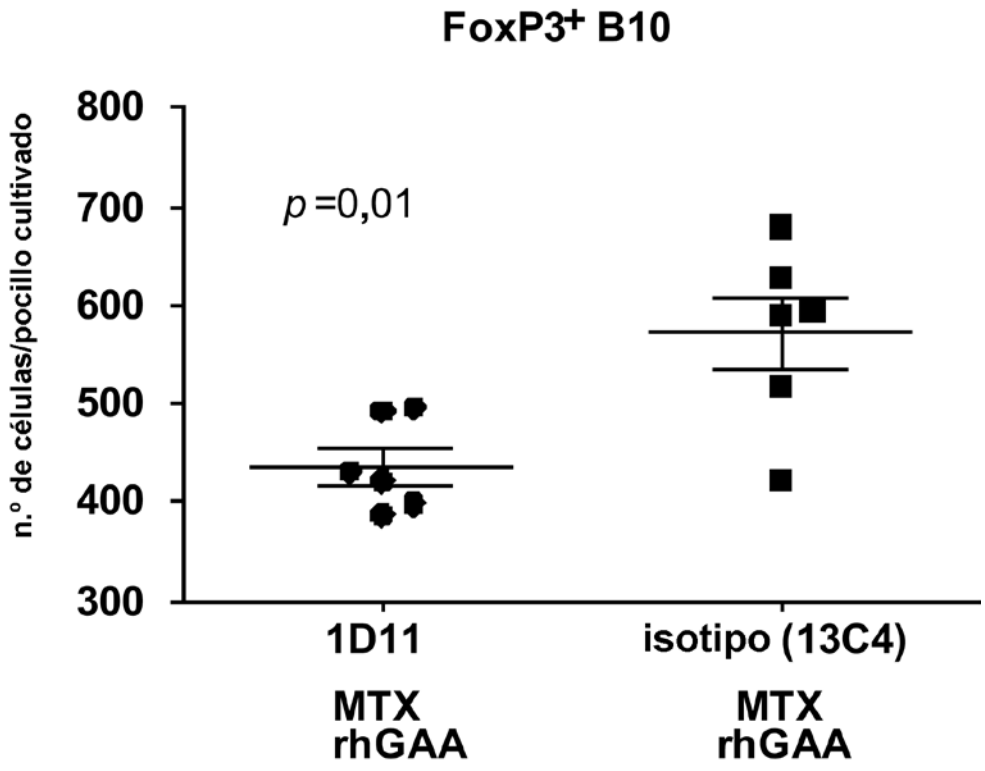

FoxP3+ B10
n.º de células/pocillo cultivado
800
700
600
500
400
300
p =0,01
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA

Figura 47A

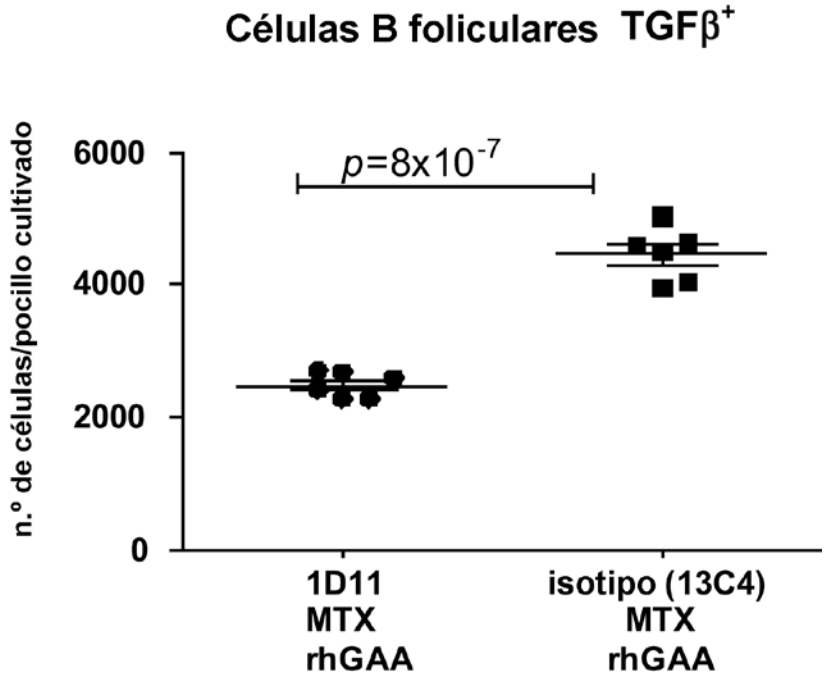



Figura 47B

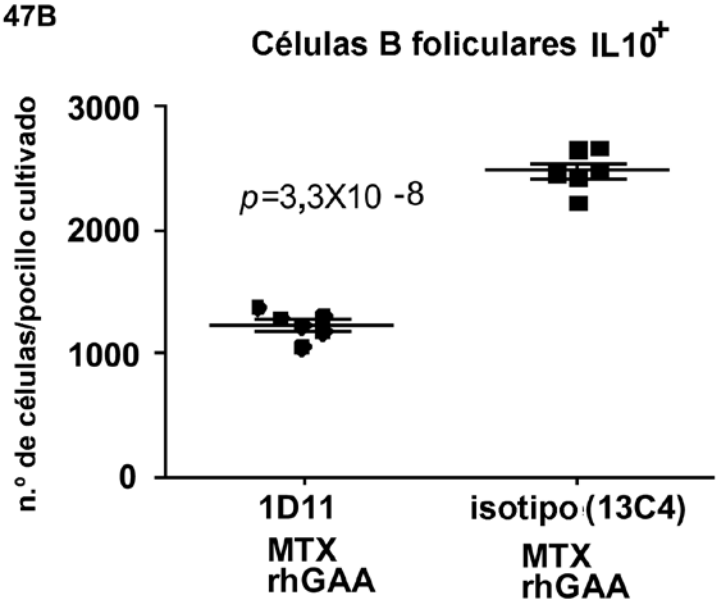


Figura 47C

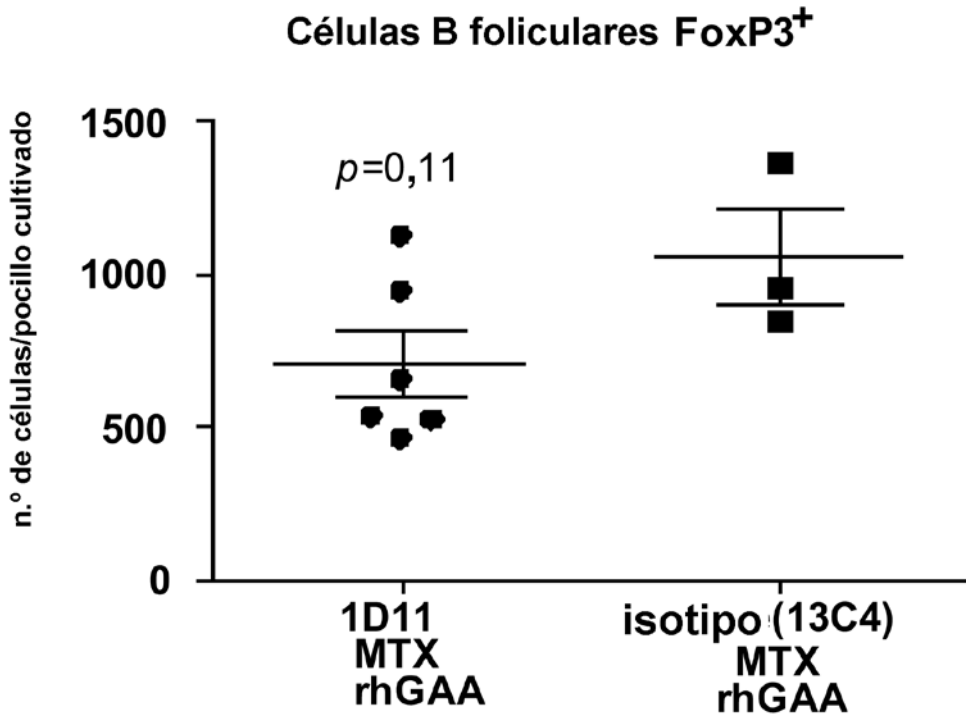

Células B foliculares FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
1500
1000
500
0
p=0,11
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA

Figura 48A

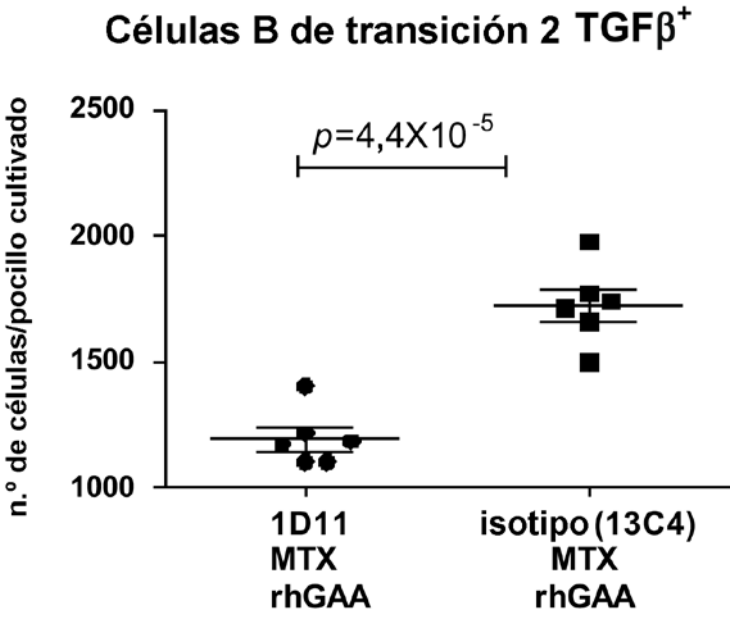



Figura 48B

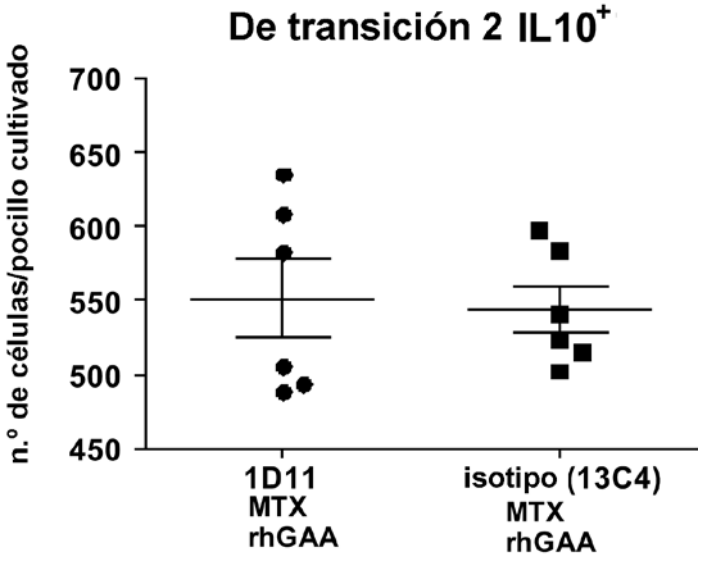
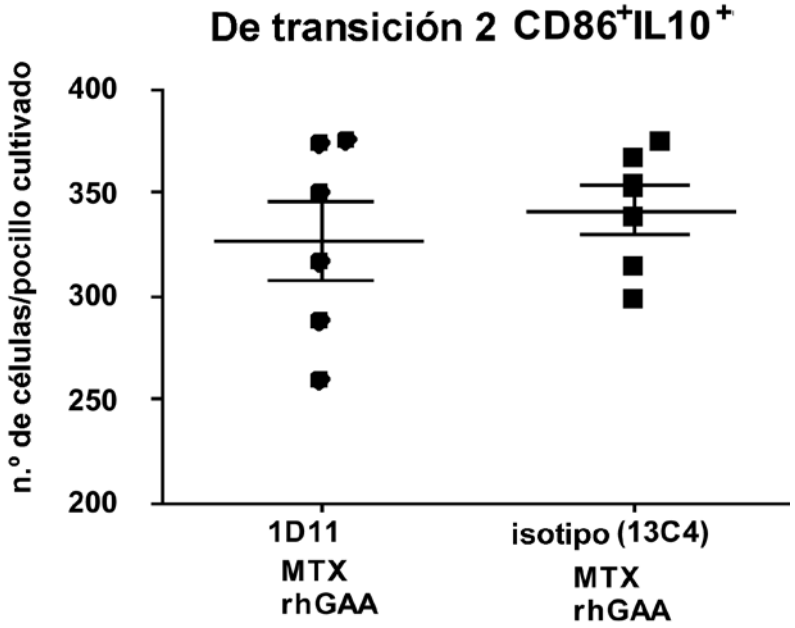


Figura 48B, cont.



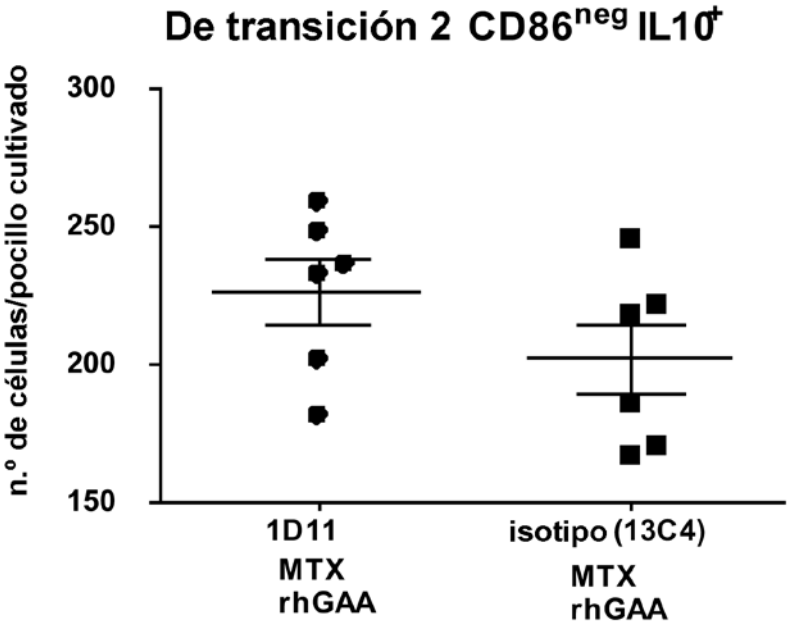



Figura 48C

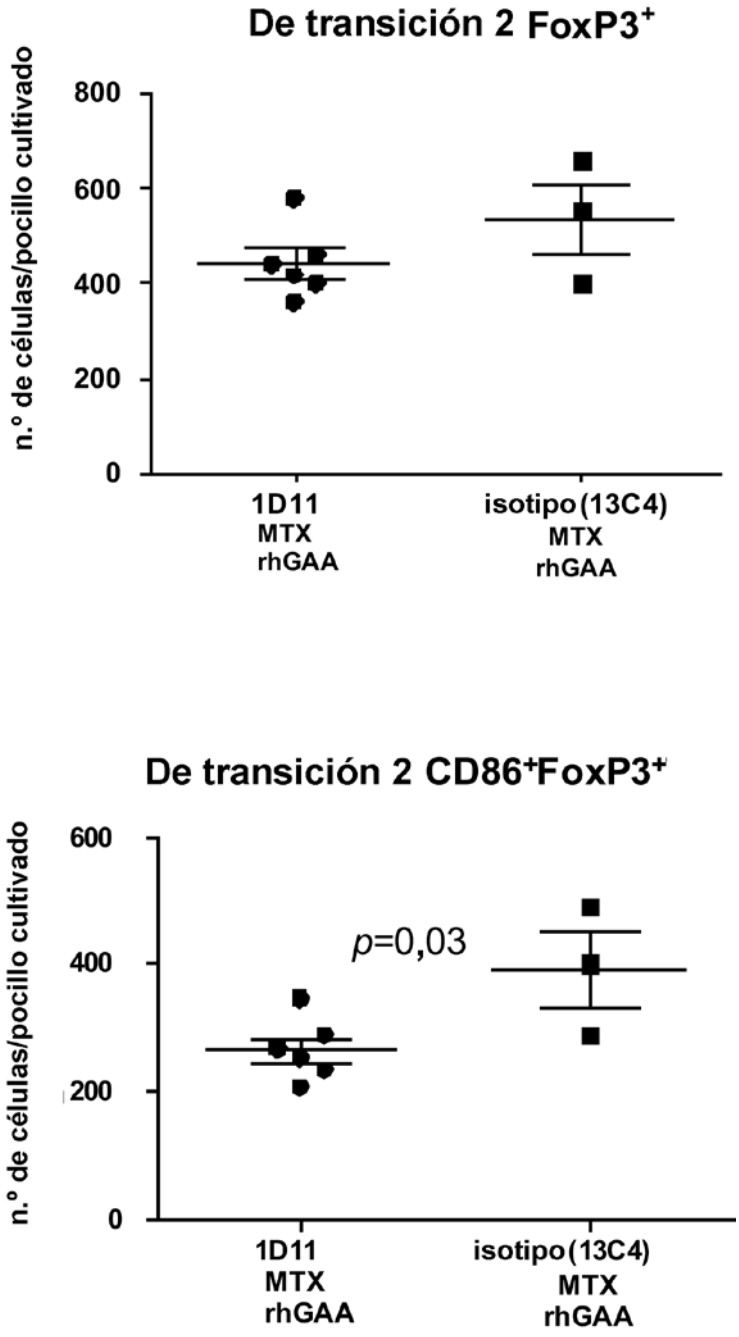

De transición 2 FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
800
600
400
200
0
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA
De transición 2 CD86+FoxP3+
n.º de células/pocillo cultivado
600
400
200
0
p=0,03
1D11
MTX
rhGAA
isotipo (13C4)
MTX
rhGAA

**Figura** 48C, cont.

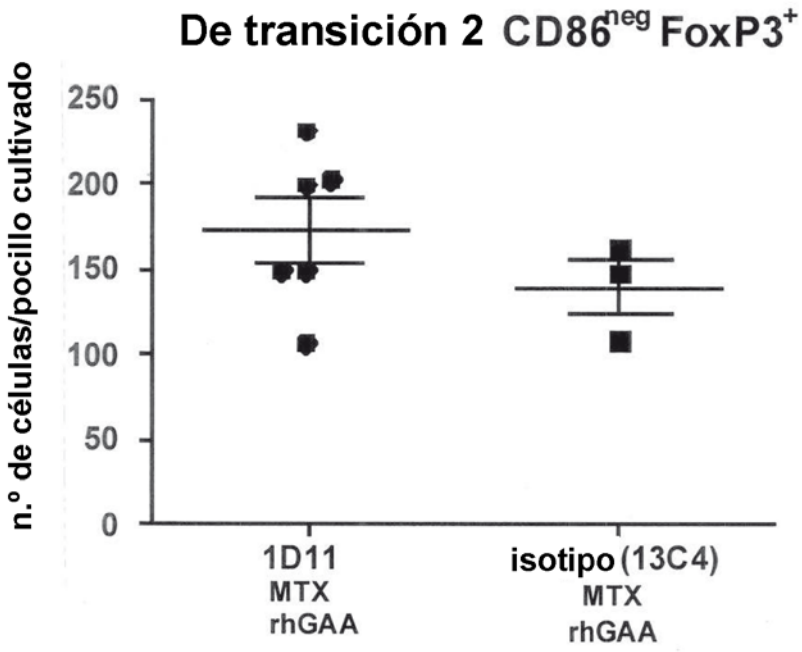


FIG. 23

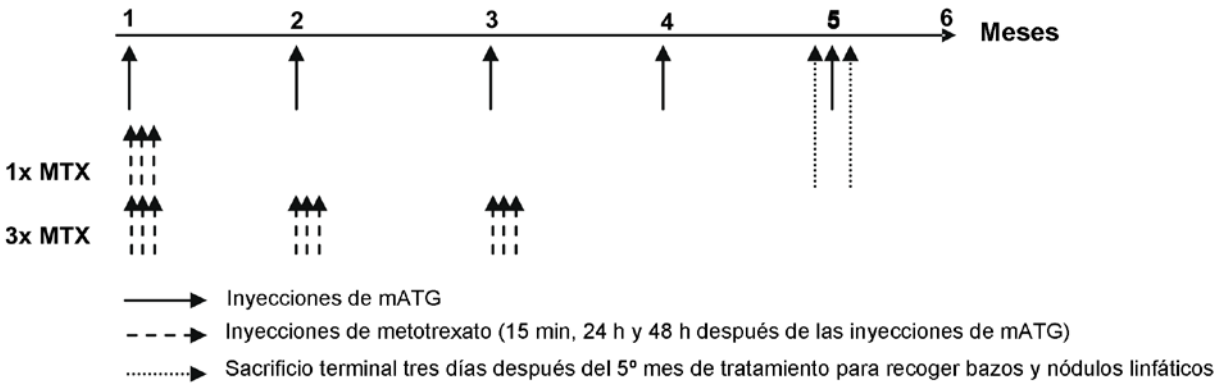

1
2
3
4
5
6
Meses
1x MTX
3x MTX
Inyecciones de mATG
Inyecciones de metotrexato (15 min, 24 h y 48 h después de las inyecciones de mATG)
Sacrificio terminal tres días después del 5º mes de tratamiento para recoger bazos y nódulos linfáticos

FIG. 24A

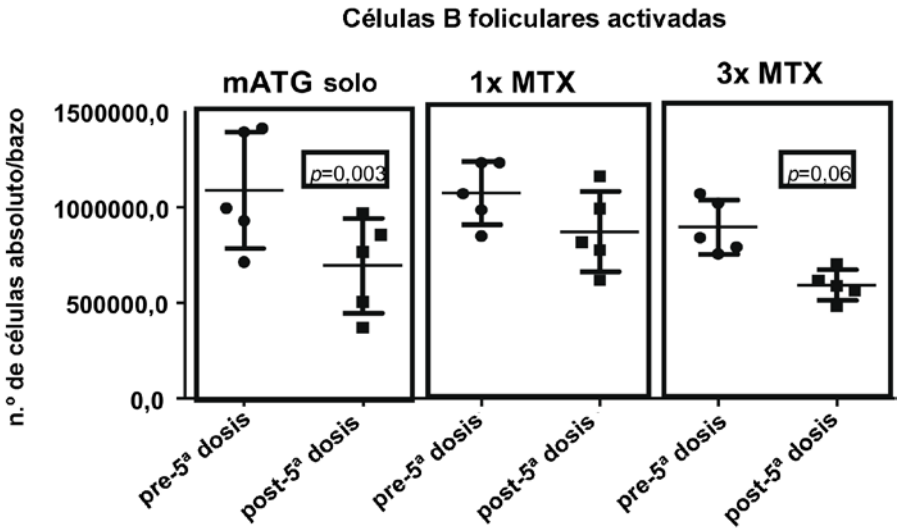



FIG. 24B

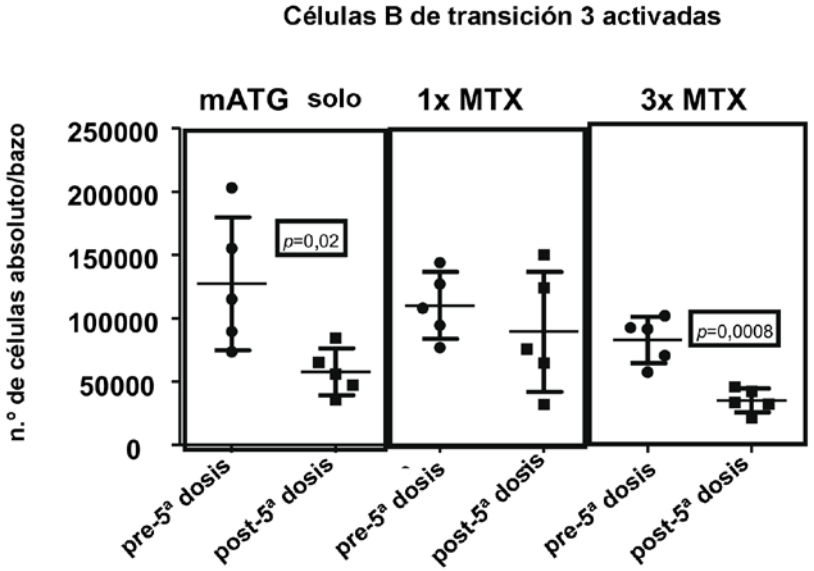


FIG. 25A

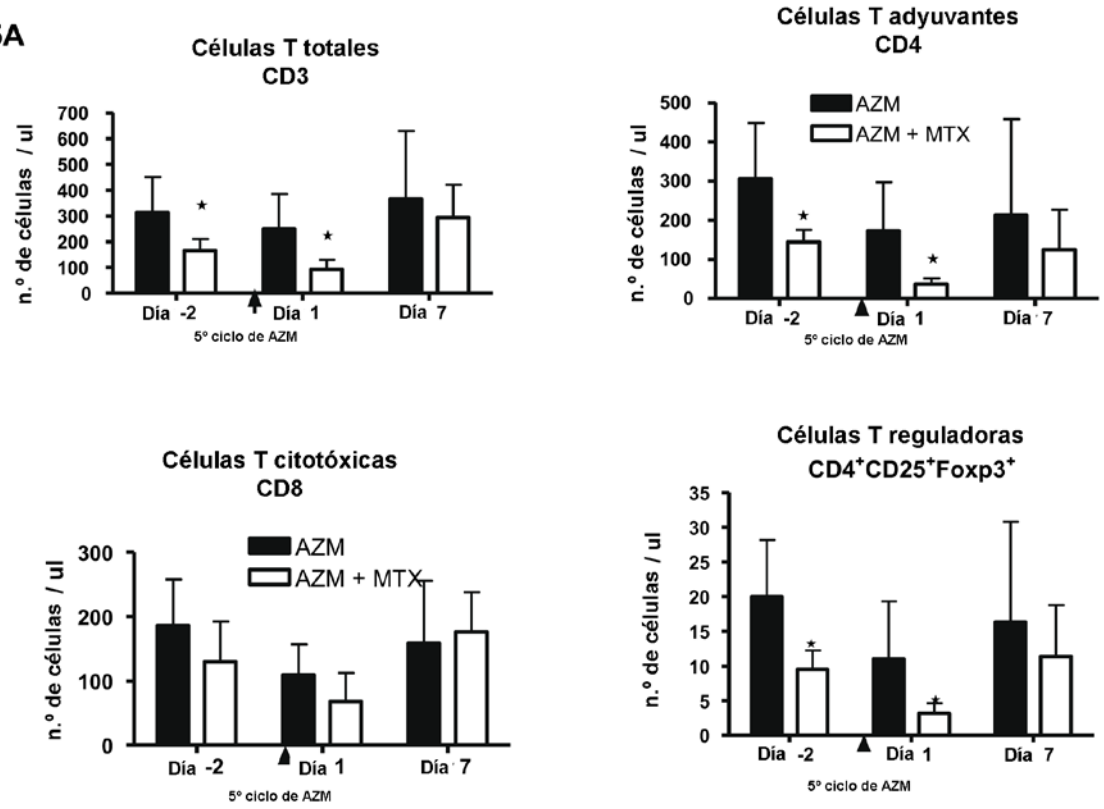



FIG. 25B

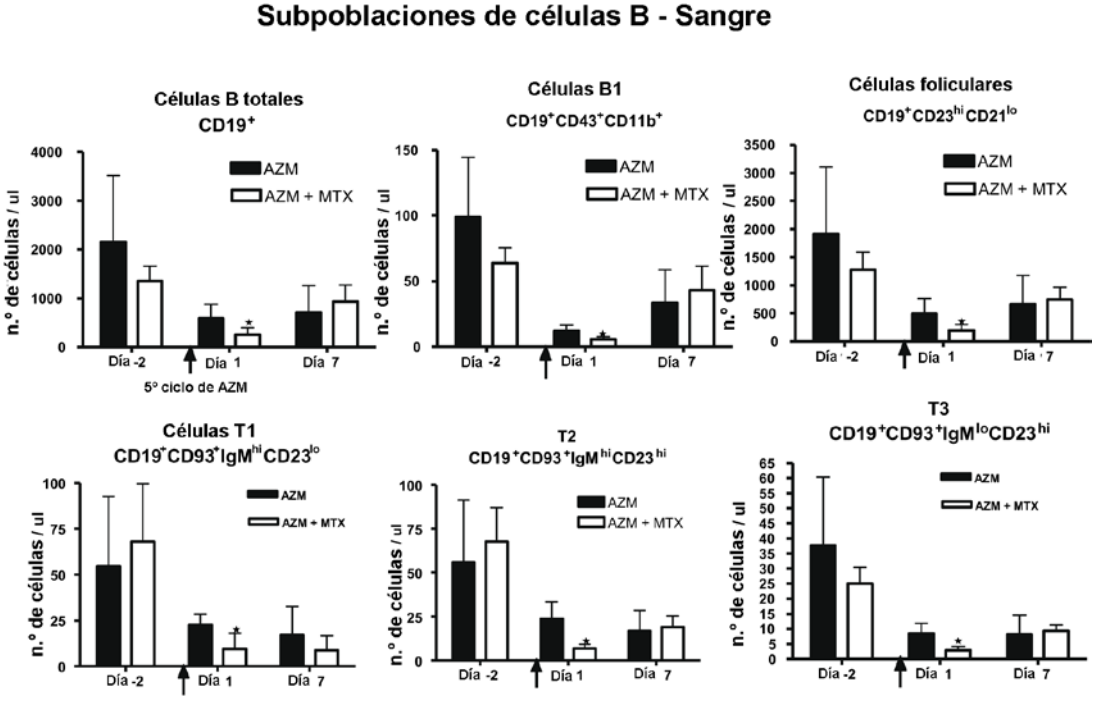
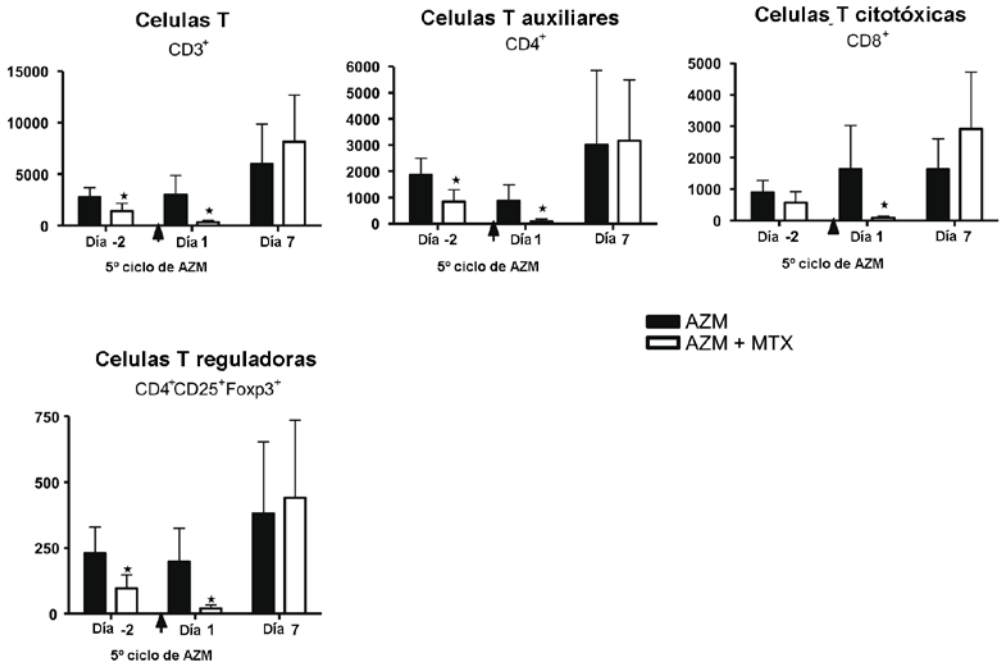


FIG. 26

# Células T - bazo




# Células T - bazo

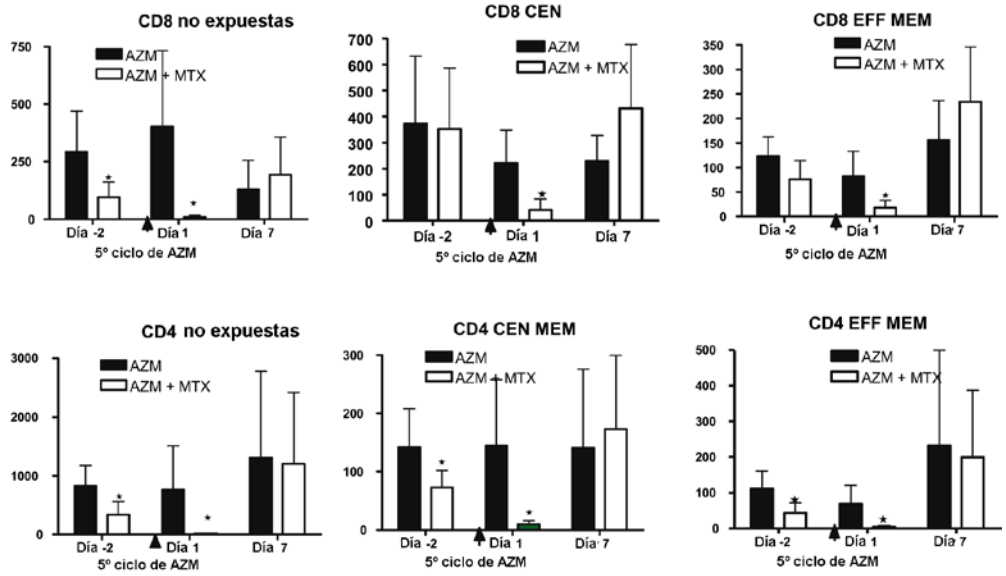


FIG. 27A

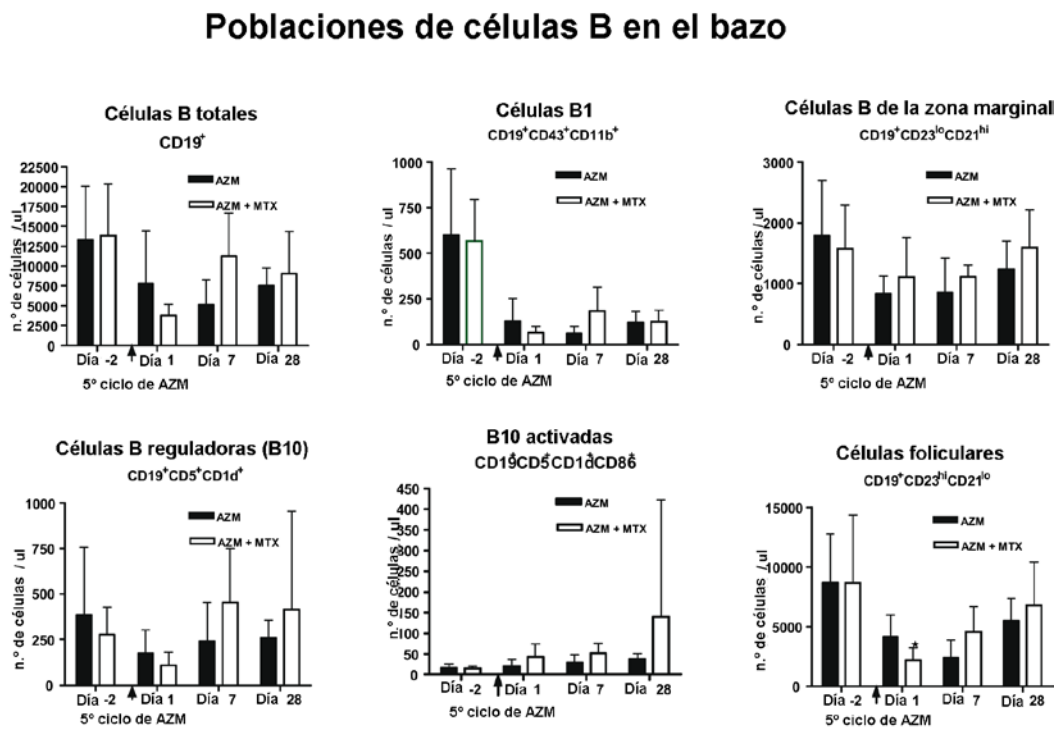



FIG. 27B

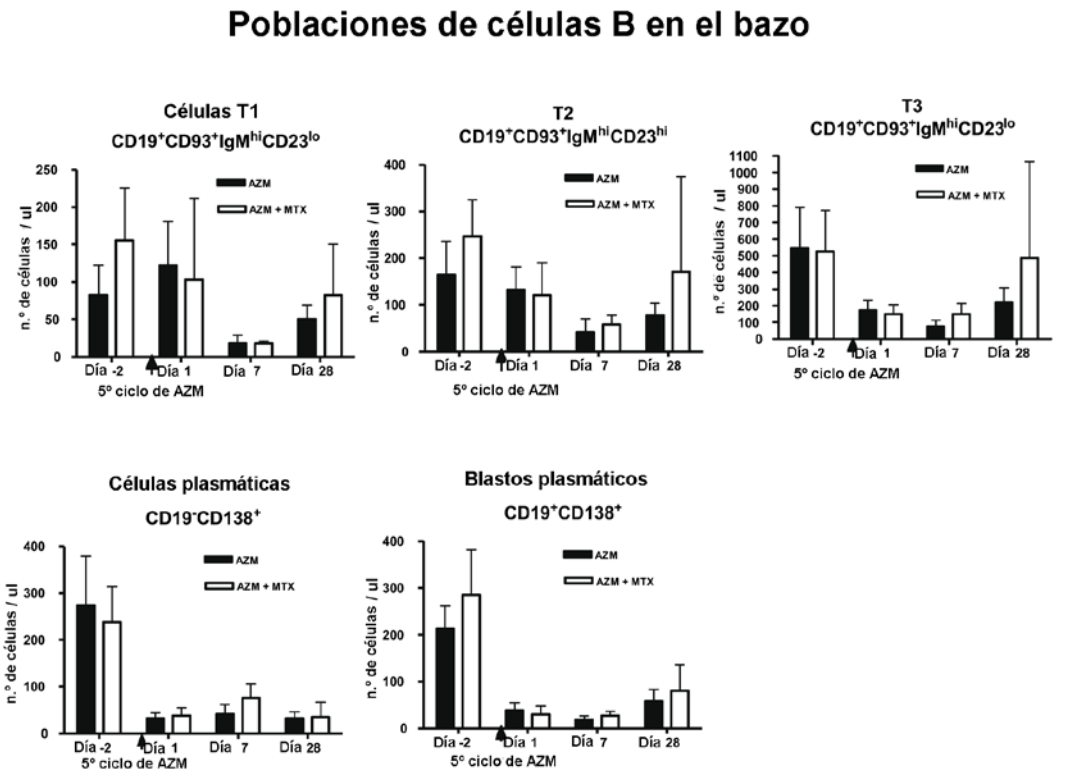


FIG. 28A

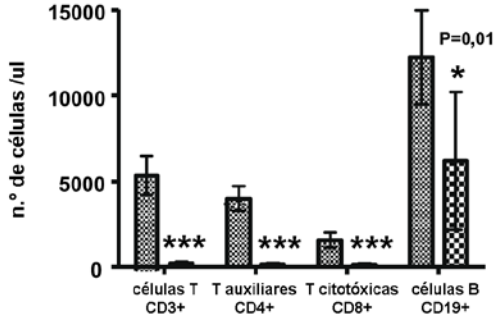



FIG. 28B

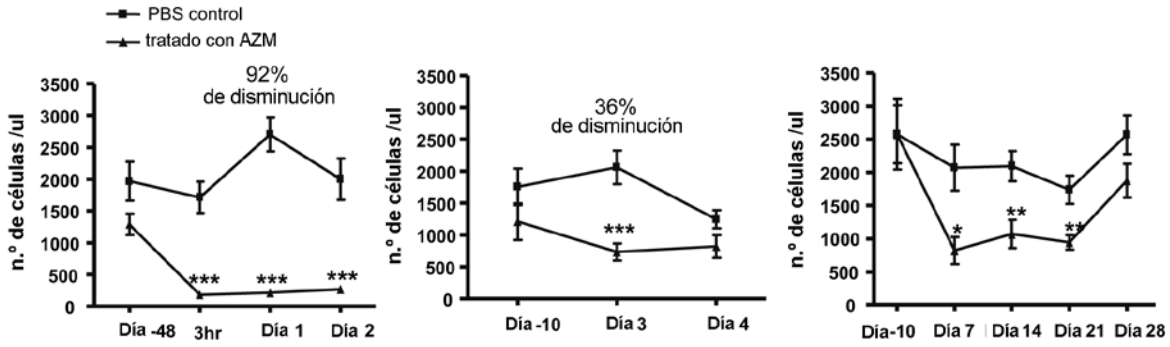


FIG. 29A

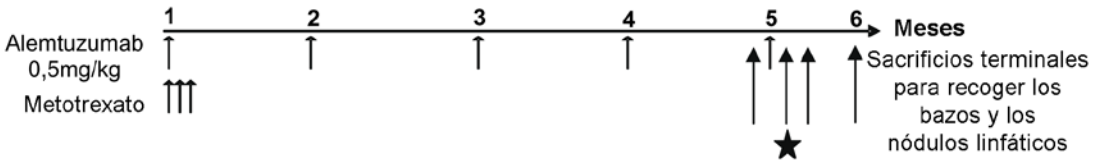



FIG. 29B

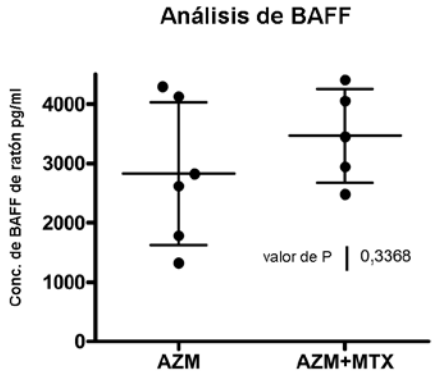


FIG. 30A

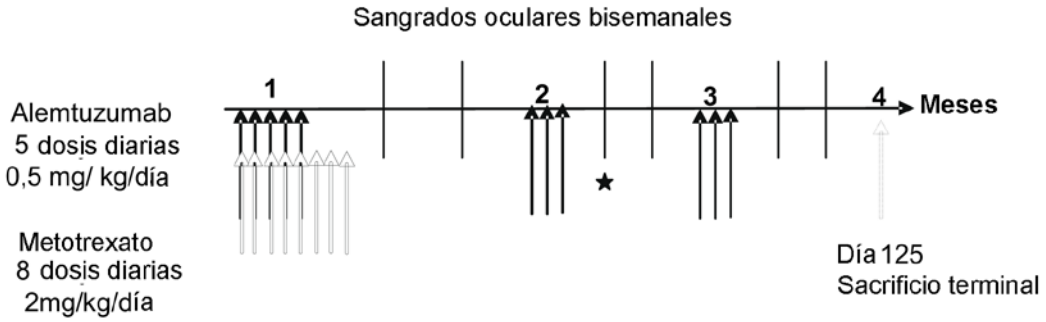

Sangrados oculares bisemanales
1
2
3
4
Meses
Alemtuzumab
5 dosis diarias
0,5 mg/ kg/día
Metotrexato
8 dosis diarias
2mg/kg/día
Día 125
Sacrificio terminal

FIG. 30B

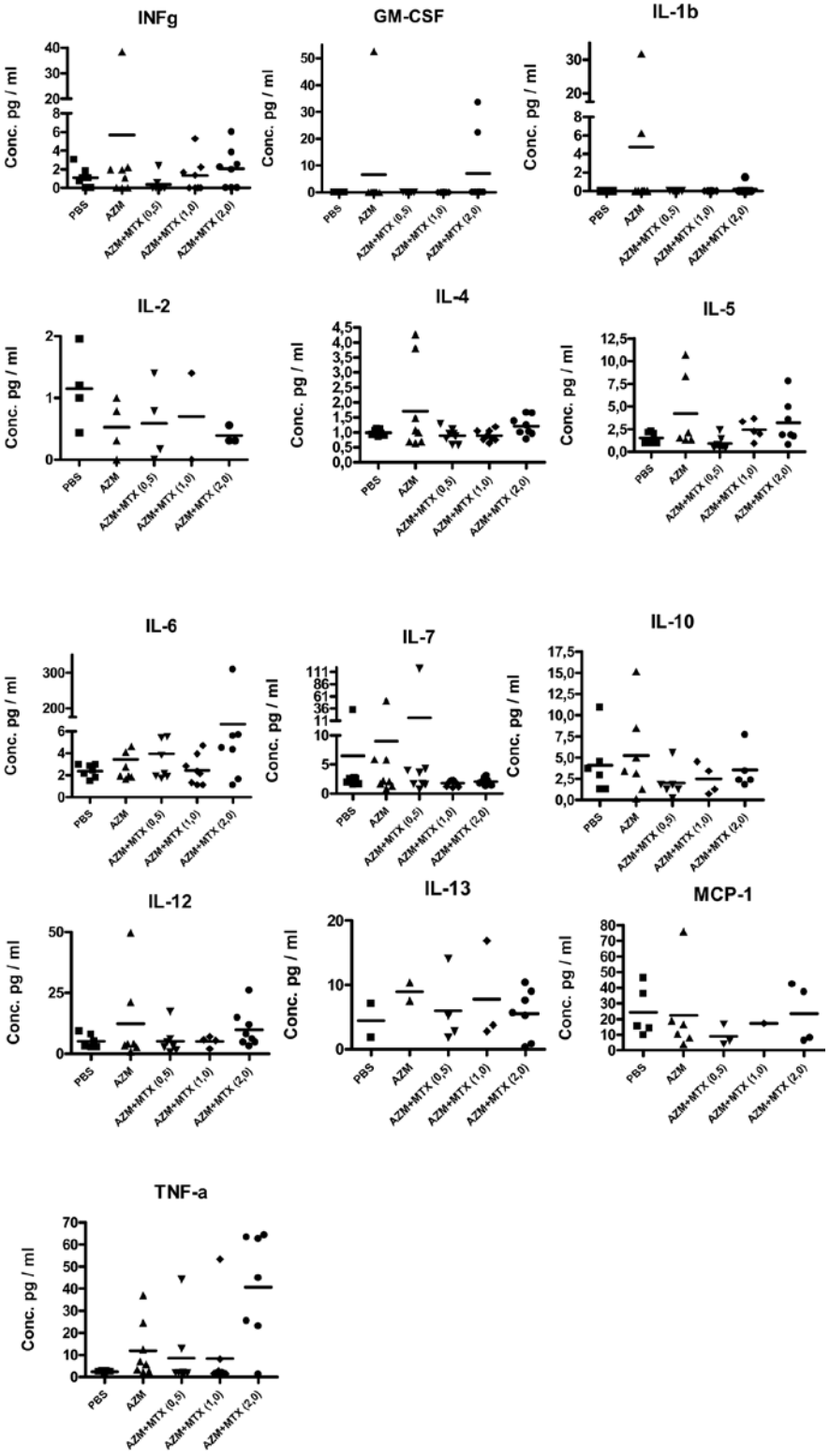

INFg
GM-CSF
IL-1b
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-7
IL-10
IL-12
IL-13
MCP-1
TNF-a
Conc. pg / ml
PBS
AZM
AZM+MTX (0,5)
AZM+MTX (1,0)
AZM+MTX (2,0)

FIG. 31

Evaluación del efecto del metotrexato sobre las titulaciones anti-Myozyme en IL-10 -/- y C57BL/6 WT

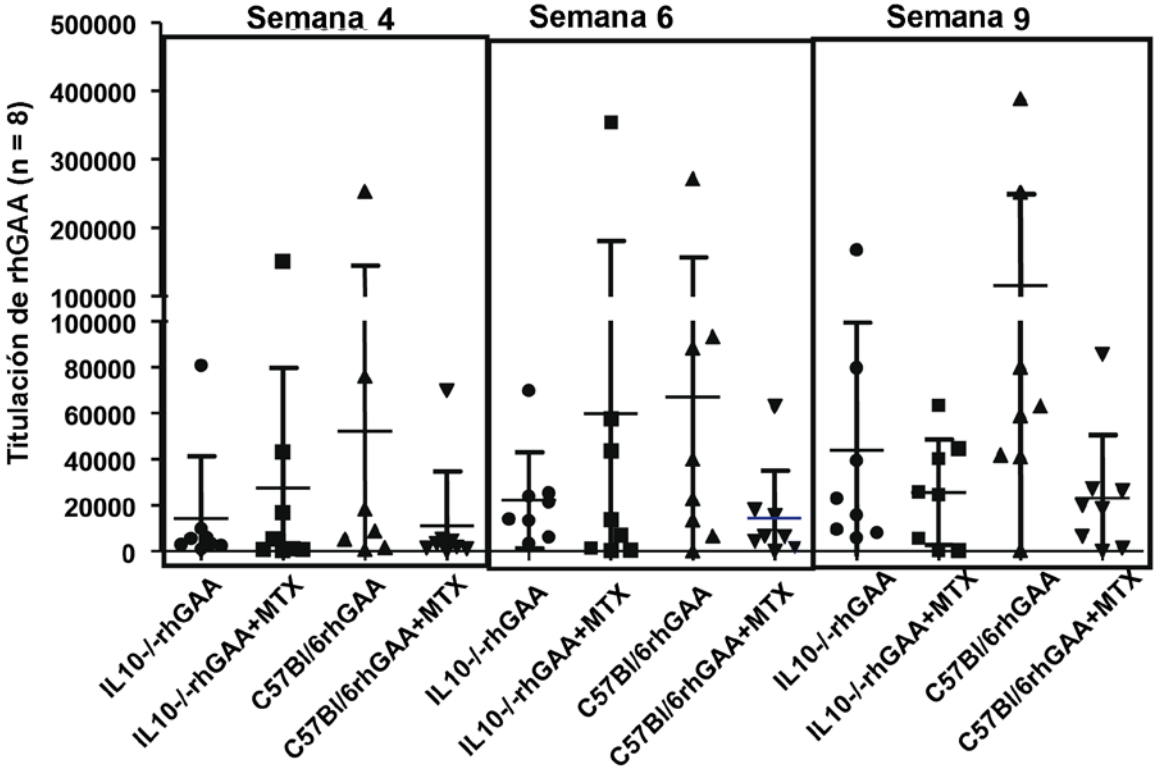


FIG. 32

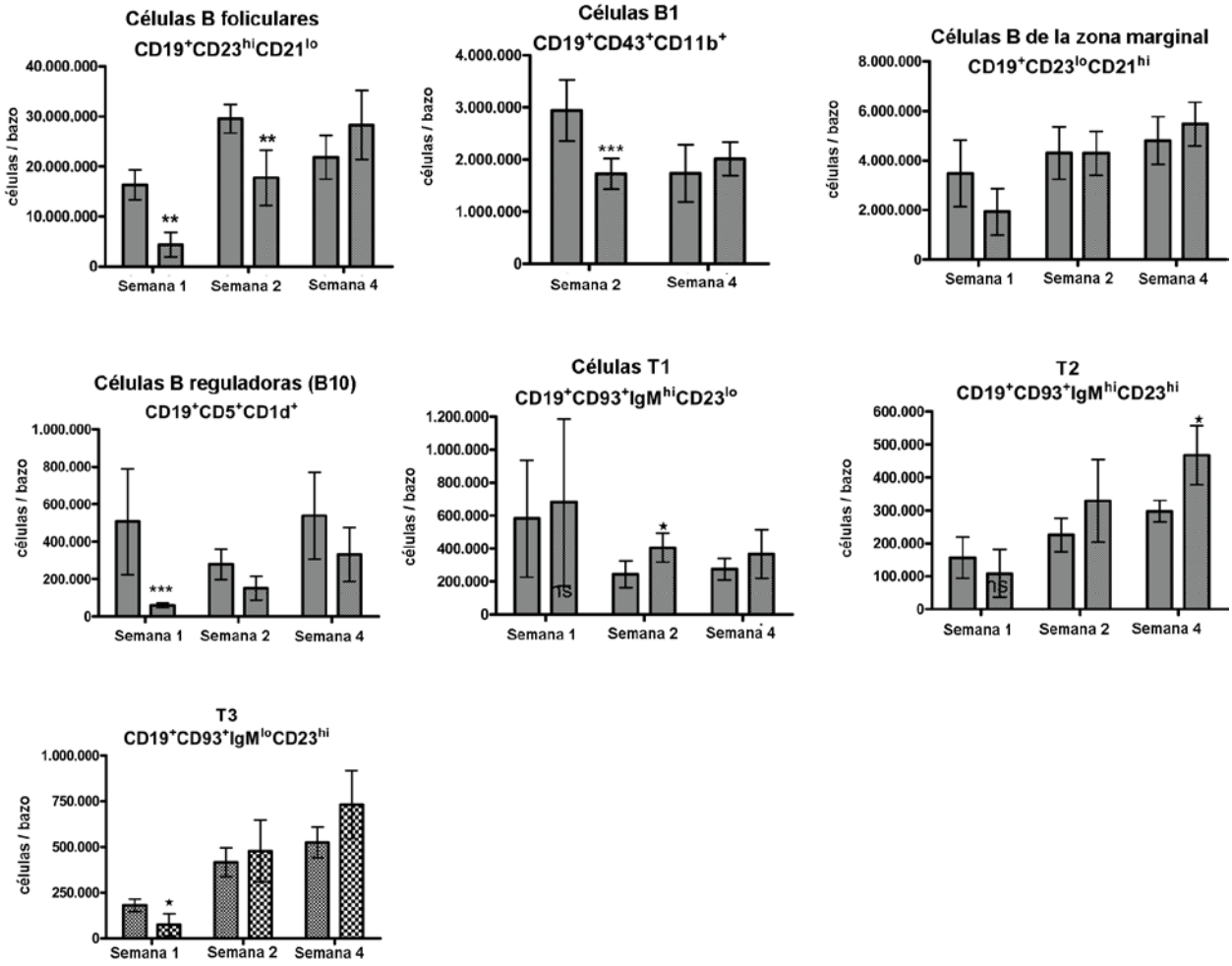

Células B foliculares
CD19+CD23hiCD21lo
células / bazo
40.000.000
30.000.000
20.000.000
10.000.000
0
**
**
Semana 1
Semana 2
Semana 4
Células B1
CD19+CD43+CD11b+
células / bazo
4.000.000
3.000.000
2.000.000
1.000.000
0
***
Semana 2
Semana 4
Células B de la zona marginal
CD19+CD23loCD21hi
células / bazo
8.000.000
6.000.000
4.000.000
2.000.000
0
Semana 1
Semana 2
Semana 4
Células B reguladoras (B10)
CD19+CD5+CD1d+
células / bazo
1.000.000
800.000
600.000
400.000
200.000
0
***
Semana 1
Semana 2
Semana 4
Células T1
CD19+CD93+IgMhiCD23lo
células / bazo
1.200.000
1.000.000
800.000
600.000
400.000
200.000
0
ns
*
Semana 1
Semana 2
Semana 4
T2
CD19+CD93+IgMhiCD23hi
células / bazo
600.000
500.000
400.000
300.000
200.000
100.000
0
ns
*
Semana 1
Semana 2
Semana 4
T3
CD19+CD93+IgMloCD23hi
células / bazo
1.000.000
750.000
500.000
250.000
0
*
Semana 1
Semana 2
Semana 4

FIG. 33

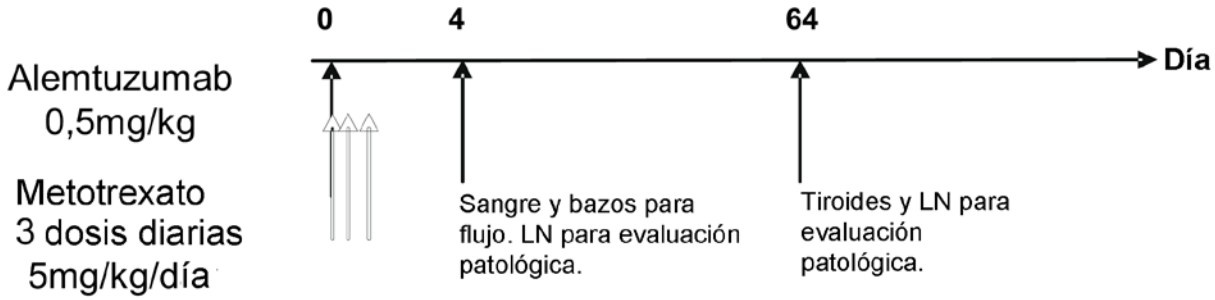
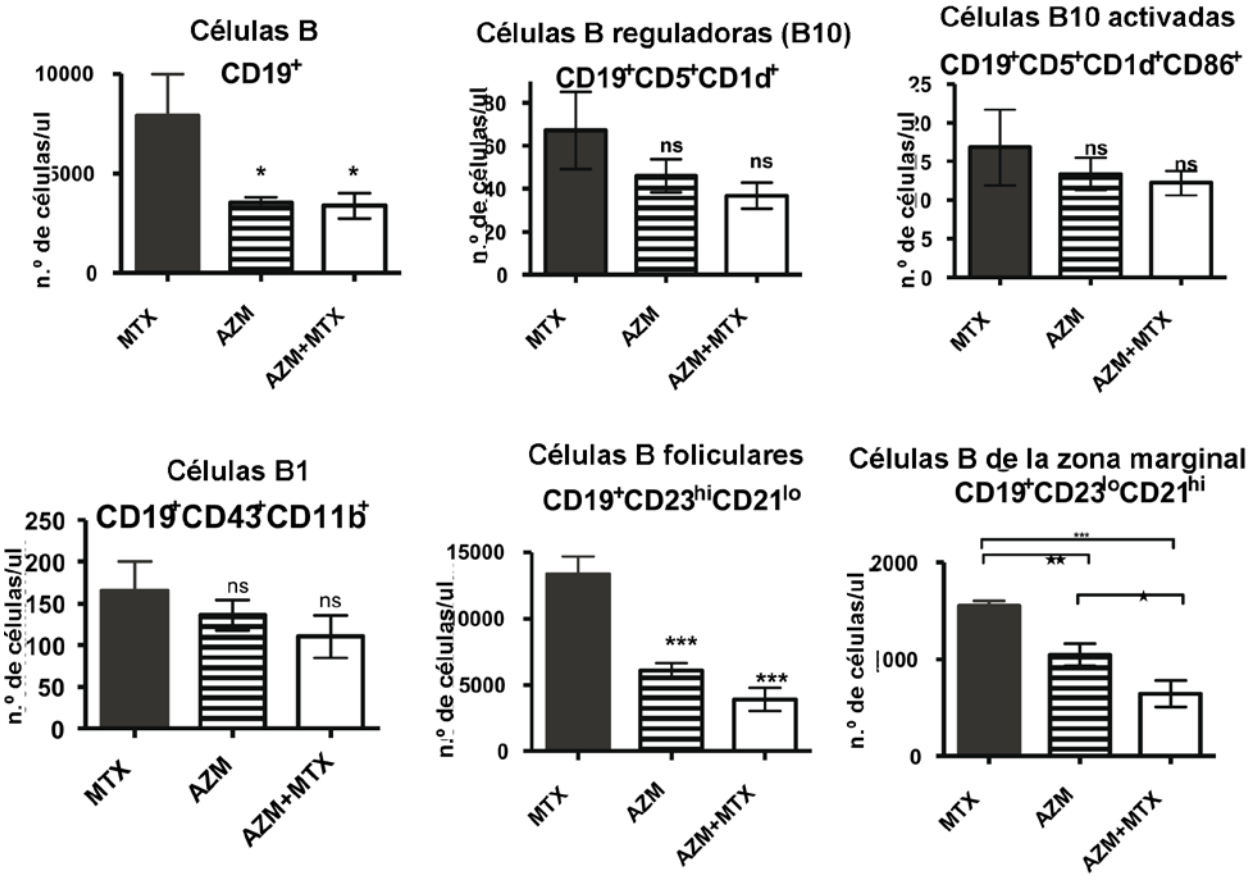

0
4
64
Día
Alemtuzumab
0,5mg/kg
Metotrexato
3 dosis diarias
5mg/kg/día
Sangre y bazos para flujo. LN para evaluación patológica.
Tiroides y LN para evaluación patológica.

FIG. 34


Células B
CD19+
n.º de células/ul
10000
0
*
*
MTX
AZM
AZM+MTX
Células B reguladoras (B10)
CD19+CD5+CD1d+
n.º de células/ul
ns
ns
MTX
AZM
AZM+MTX
Células B10 activadas
CD19+CD5+CD1d+CD86+
n.º de células/ul
ns
ns
MTX
AZM
AZM+MTX
Células B1
CD19+CD43+CD11b+
n.º de células/ul
250
200
150
100
50
0
ns
ns
MTX
AZM
AZM+MTX
Células B foliculares
CD19+CD23hiCD21lo
n.º de células/ul
15000
10000
5000
0
***
***
MTX
AZM
AZM+MTX
Células B de la zona marginal
CD19+CD23loCD21hi
n.º de células/ul
2000
1000
0
***
**
*
MTX
AZM
AZM+MTX

# FIG. 35

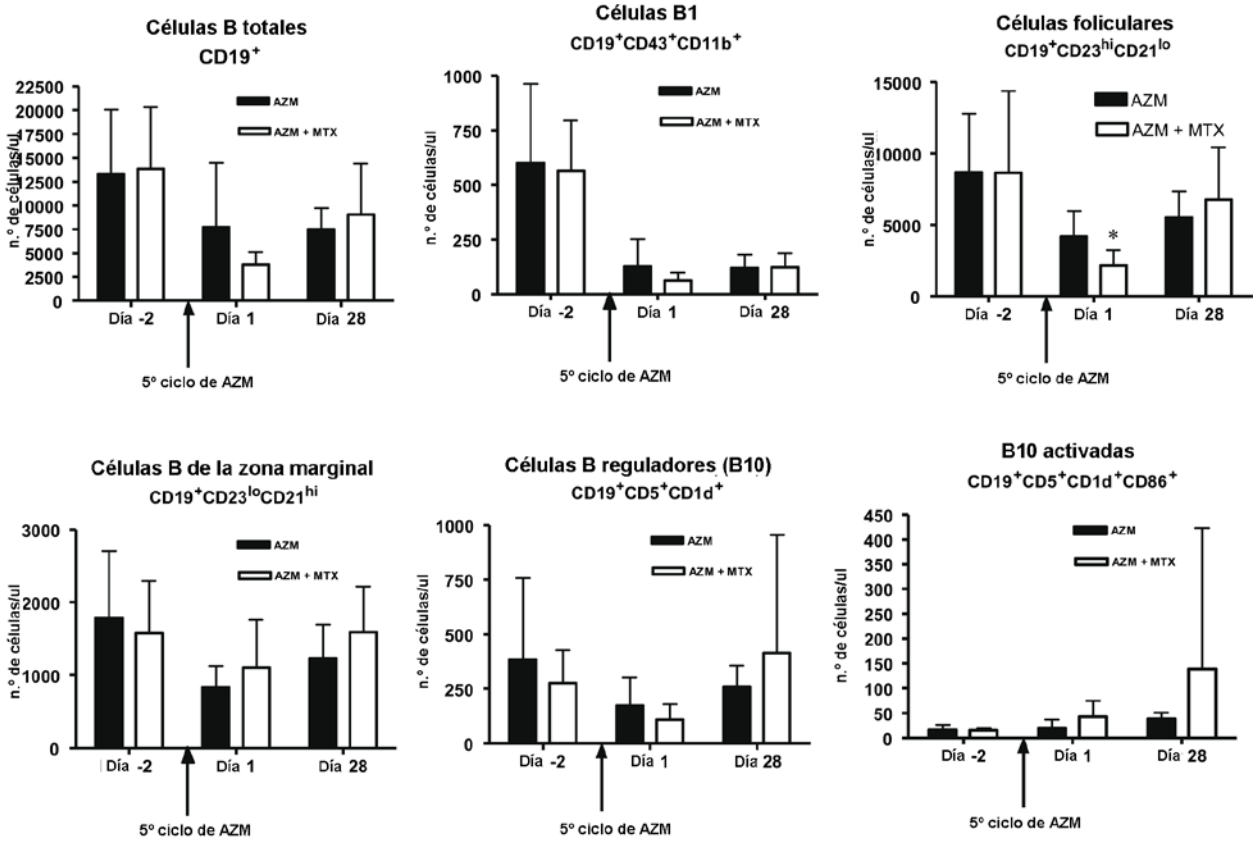

Células B totales
CD19+
n.º de células/ul
AZM
AZM + MTX
Día -2
Día 1
Día 28
5º ciclo de AZM
Células B1
CD19+CD43+CD11b+
Células foliculares
CD19+CD23hiCD21lo
*
Células B de la zona marginal
CD19+CD23loCD21hi
Células B reguladores (B10)
CD19+CD5+CD1d+
B10 activadas
CD19+CD5+CD1d+CD86+

FIG. 36

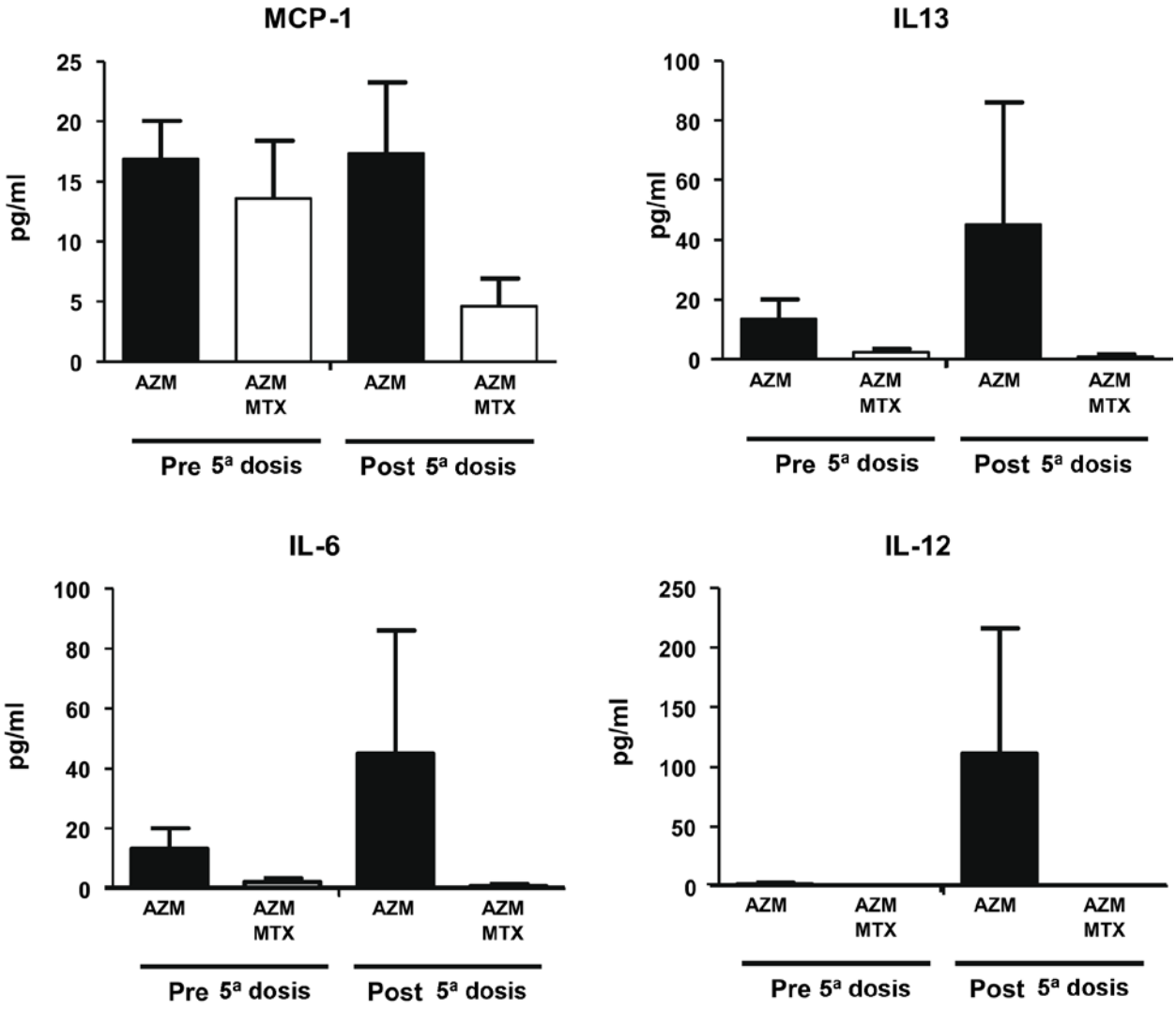

MCP-1
pg/ml
25
20
15
10
5
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5ª dosis
Post 5ª dosis
IL13
pg/ml
100
80
60
40
20
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5ª dosis
Post 5ª dosis
IL-6
pg/ml
100
80
60
40
20
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5ª dosis
Post 5ª dosis
IL-12
pg/ml
250
200
150
100
50
0
AZM
AZM MTX
AZM
AZM MTX
Pre 5ª dosis
Post 5ª dosis

FIG. 37A

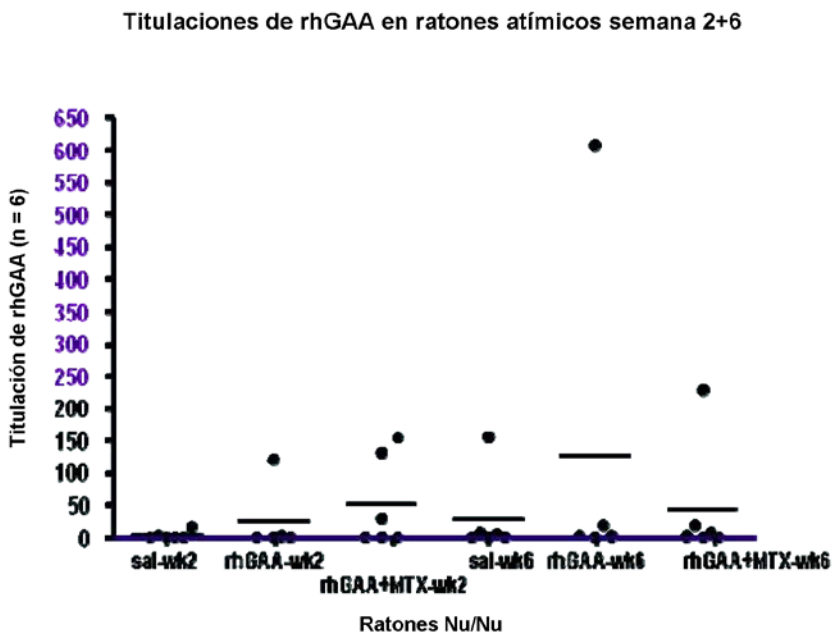



FIG. 37B

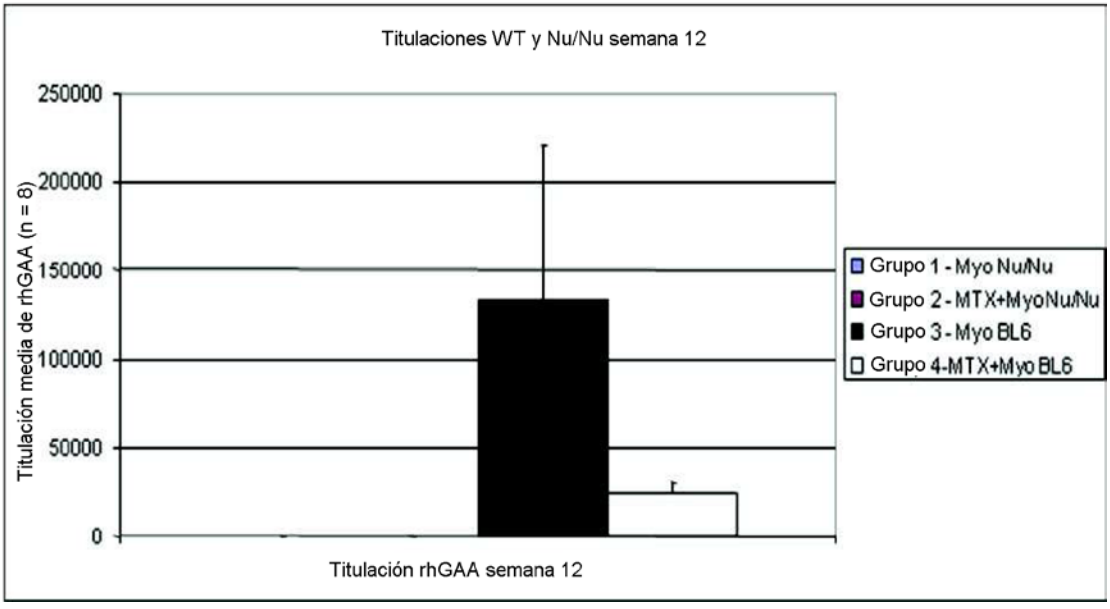


**Figura 38A**

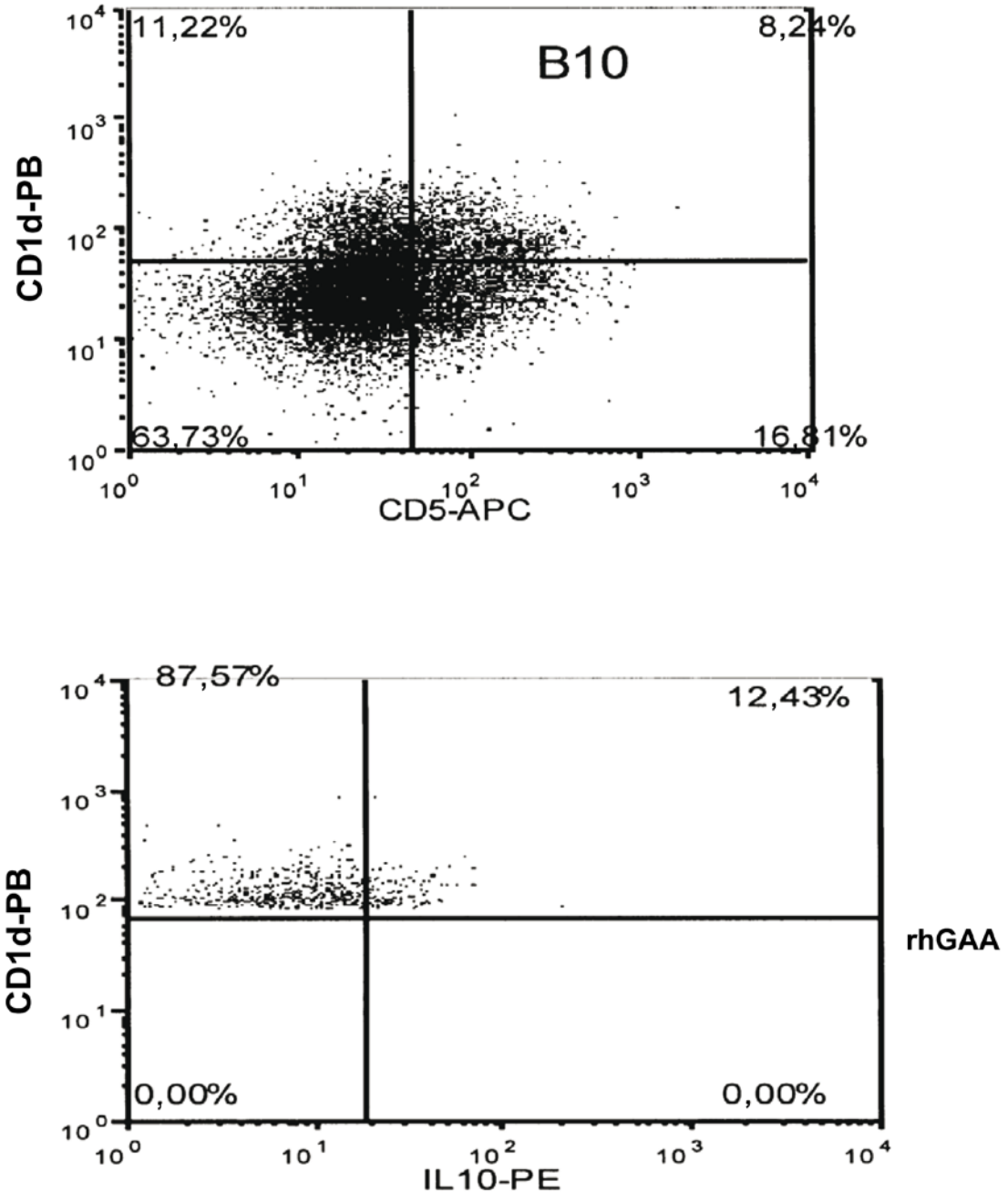
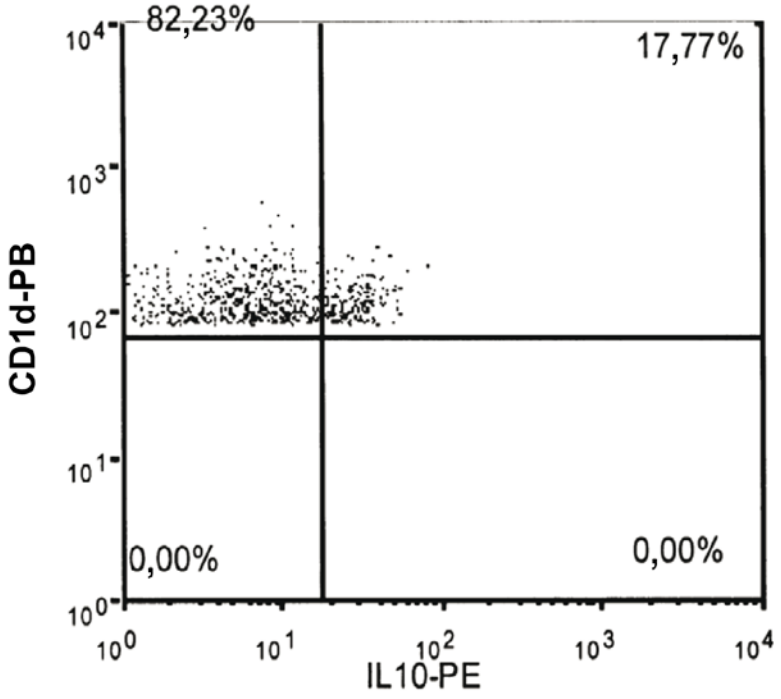

B10
11,22%
8,24%
63,73%
16,81%
CD1d-PB
CD5-APC
87,57%
12,43%
0,00%
0,00%
CD1d-PB
IL10-PE
rhGAA

**Figura 38A, cont.**




rhGAA + MTX

**Figura 38B**

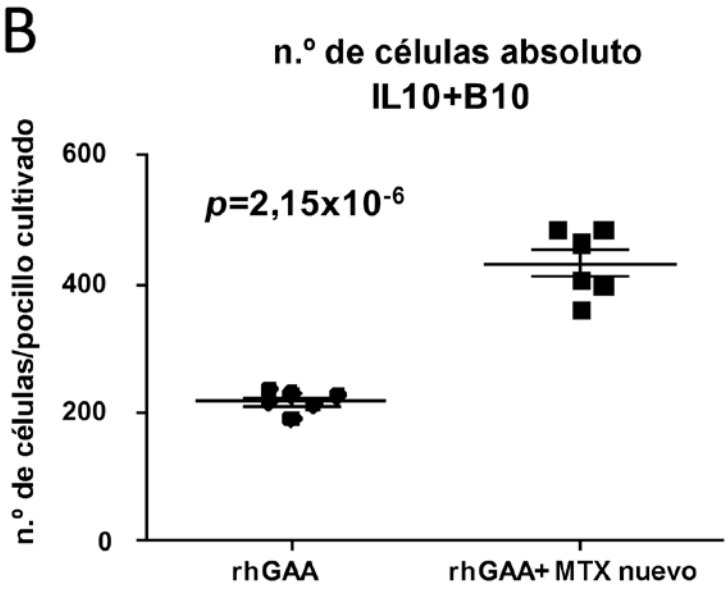


**Figura 39A**

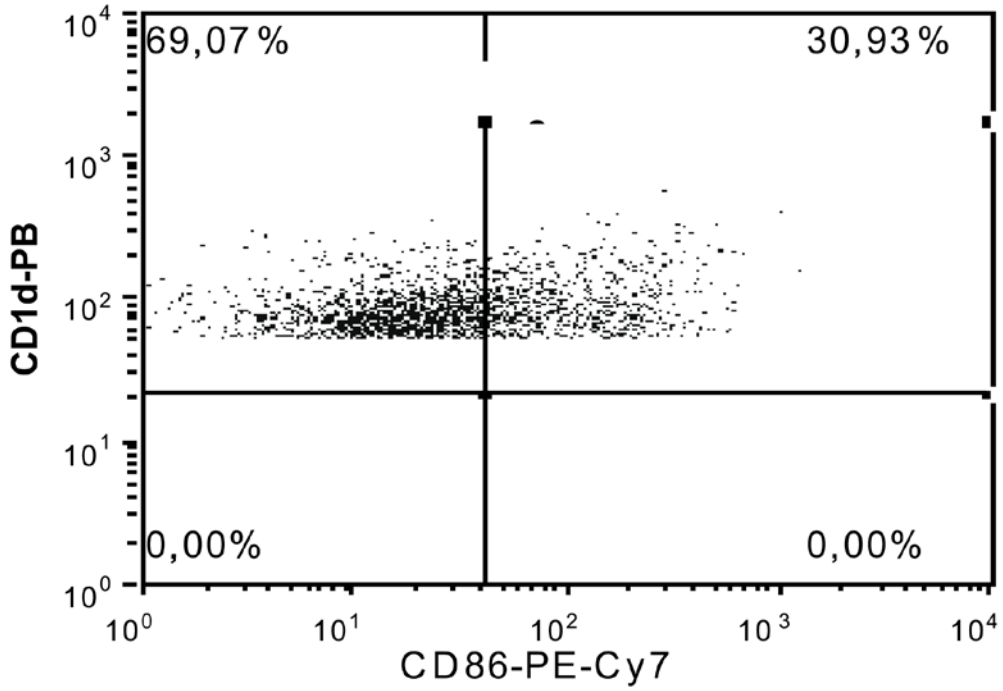



**Figura 39B**

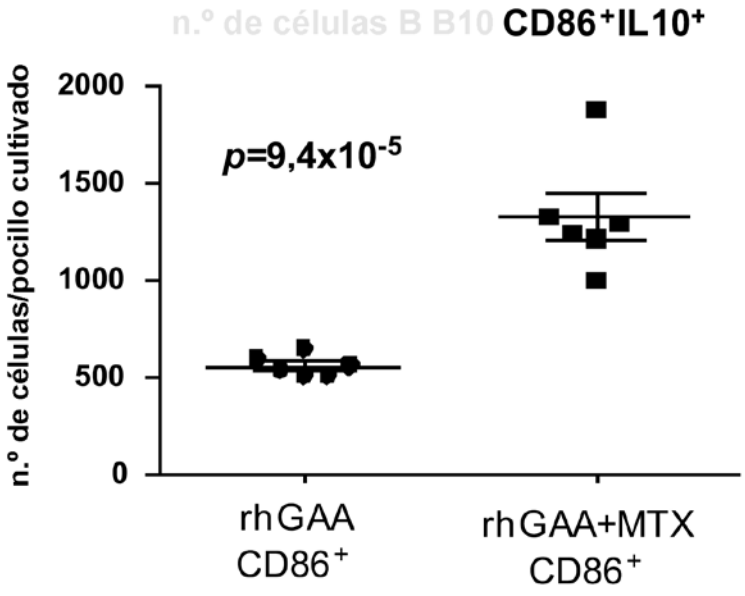


Figura 39B, cont.

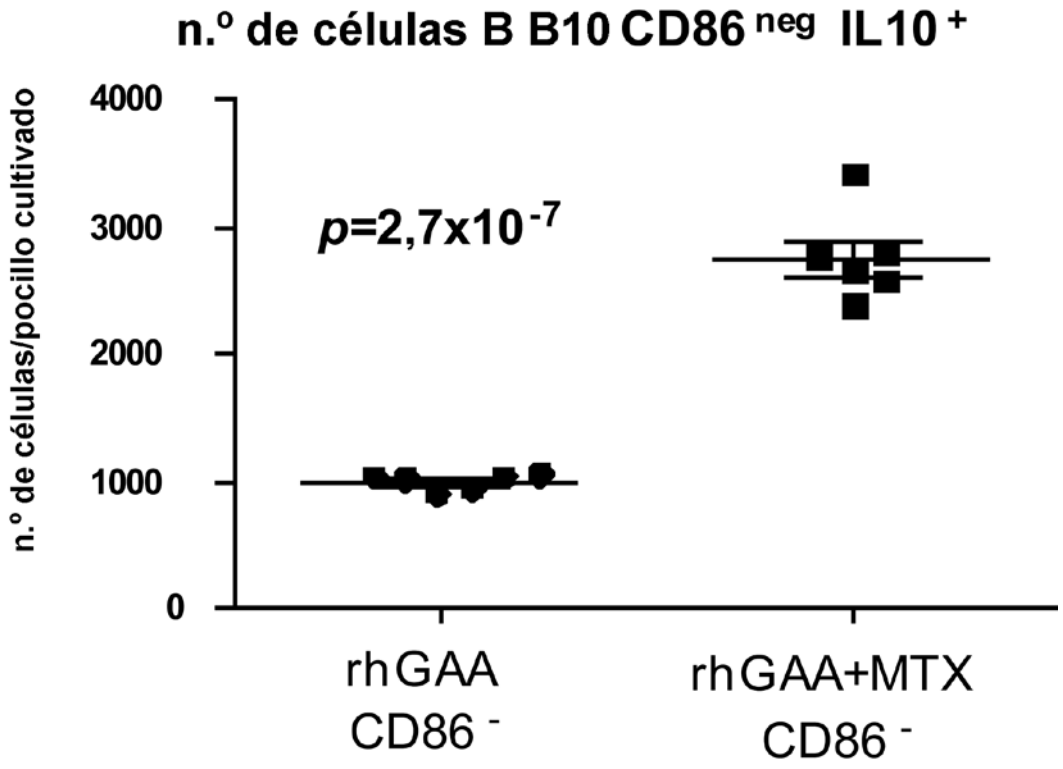
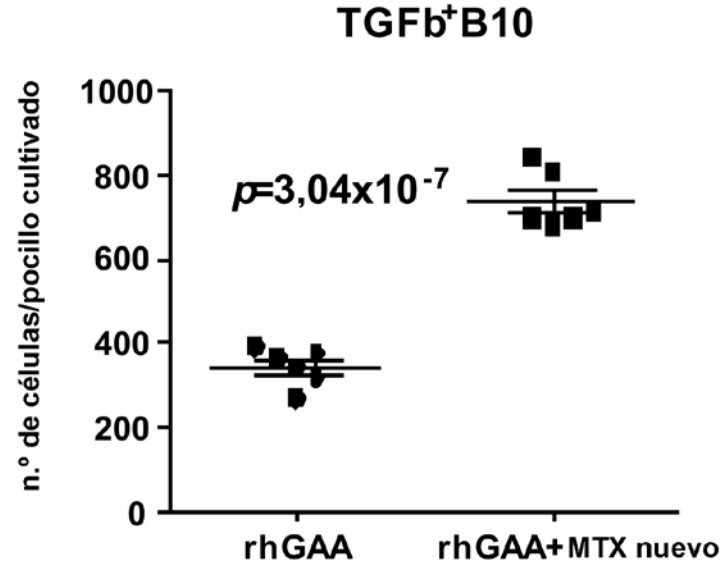


**Figura 40A**


TGFb+B10
n.º de células/pocillo cultivado
1000
800
600
400
200
0
p=3,04x10-7
rhGAA
rhGAA+MTX nuevo

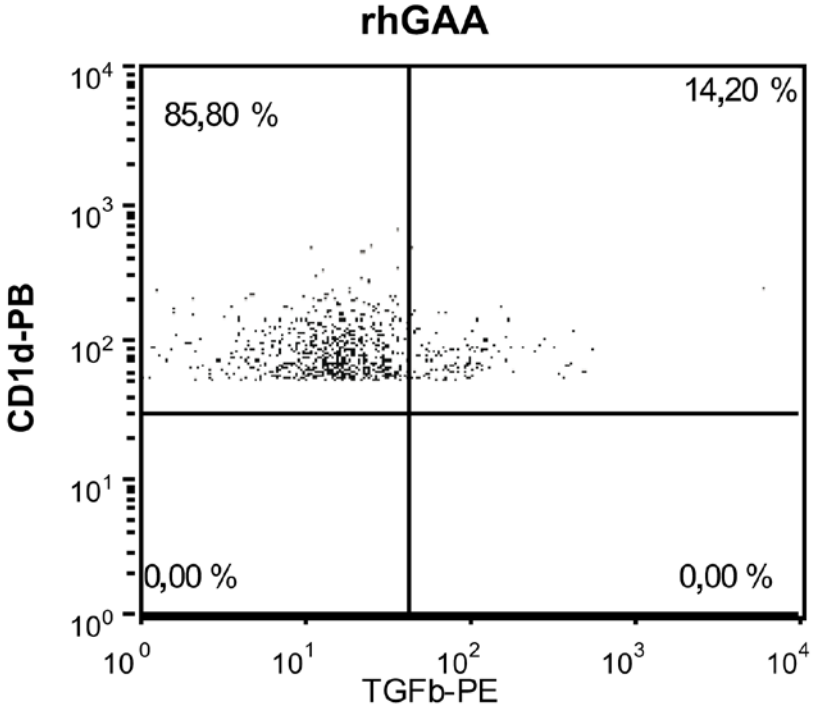

rhGAA
CD1d-PB
85,80 %
14,20 %
0,00 %
0,00 %
TGFb-PE

**Figura 40A, cont.**

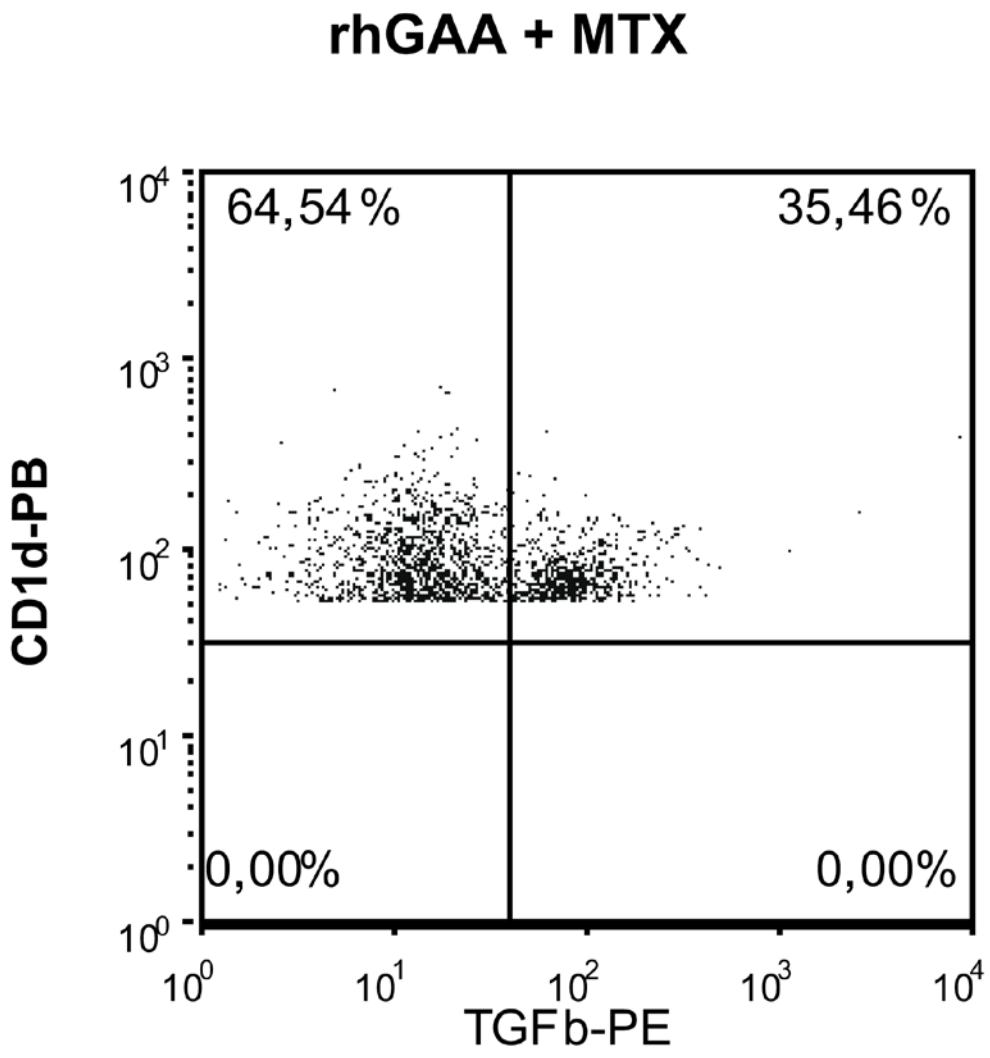


**Figura 40B**

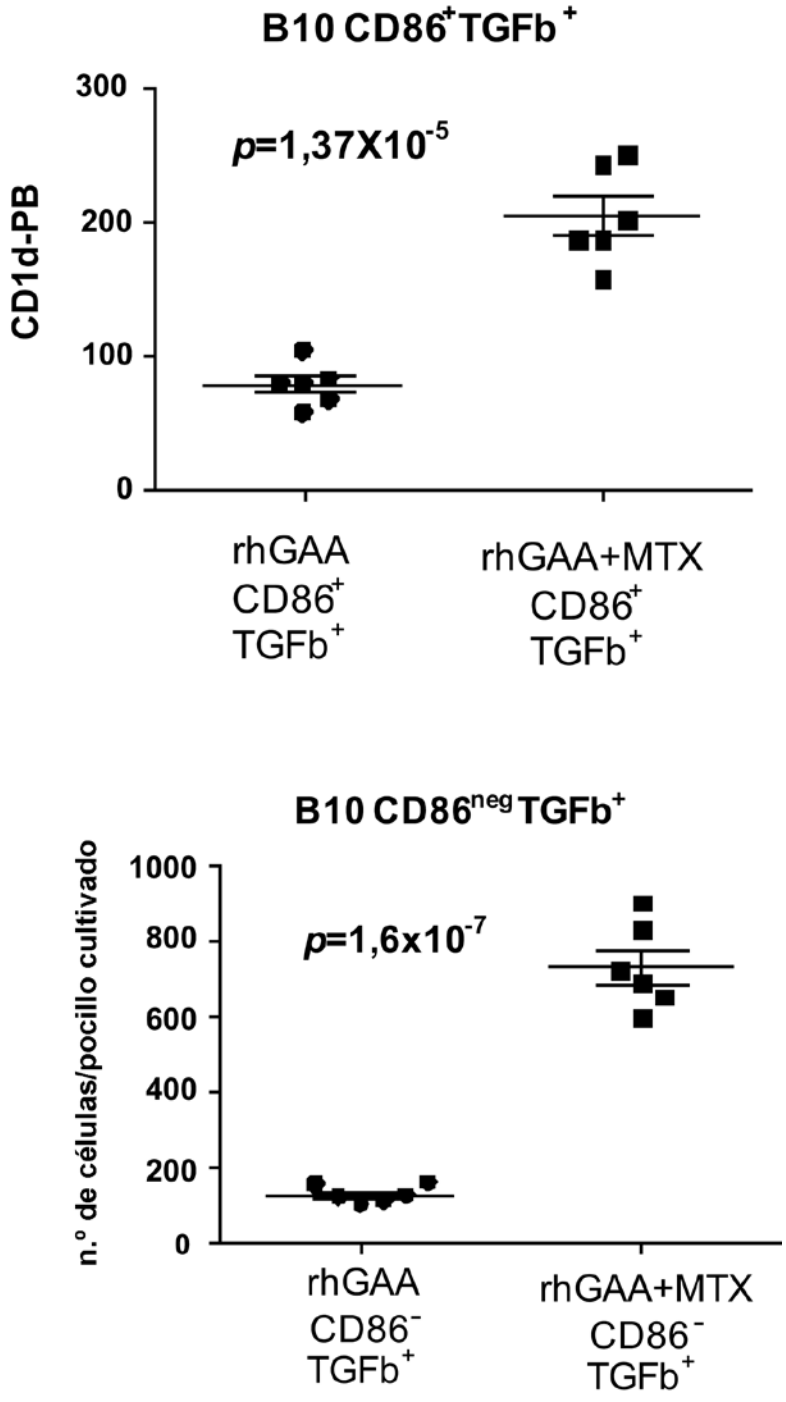

B10 CD86+TGFb+
CD1d-PB
300
200
100
0
p=1,37X10-5
rhGAA
CD86+
TGFb+
rhGAA+MTX
CD86+
TGFb+
B10 CD86neg TGFb+
n.º de células/pocillo cultivado
1000
800
600
400
200
0
p=1,6x10-7
rhGAA
CD86-
TGFb+
rhGAA+MTX
CD86-
TGFb+

**Figura 41A**

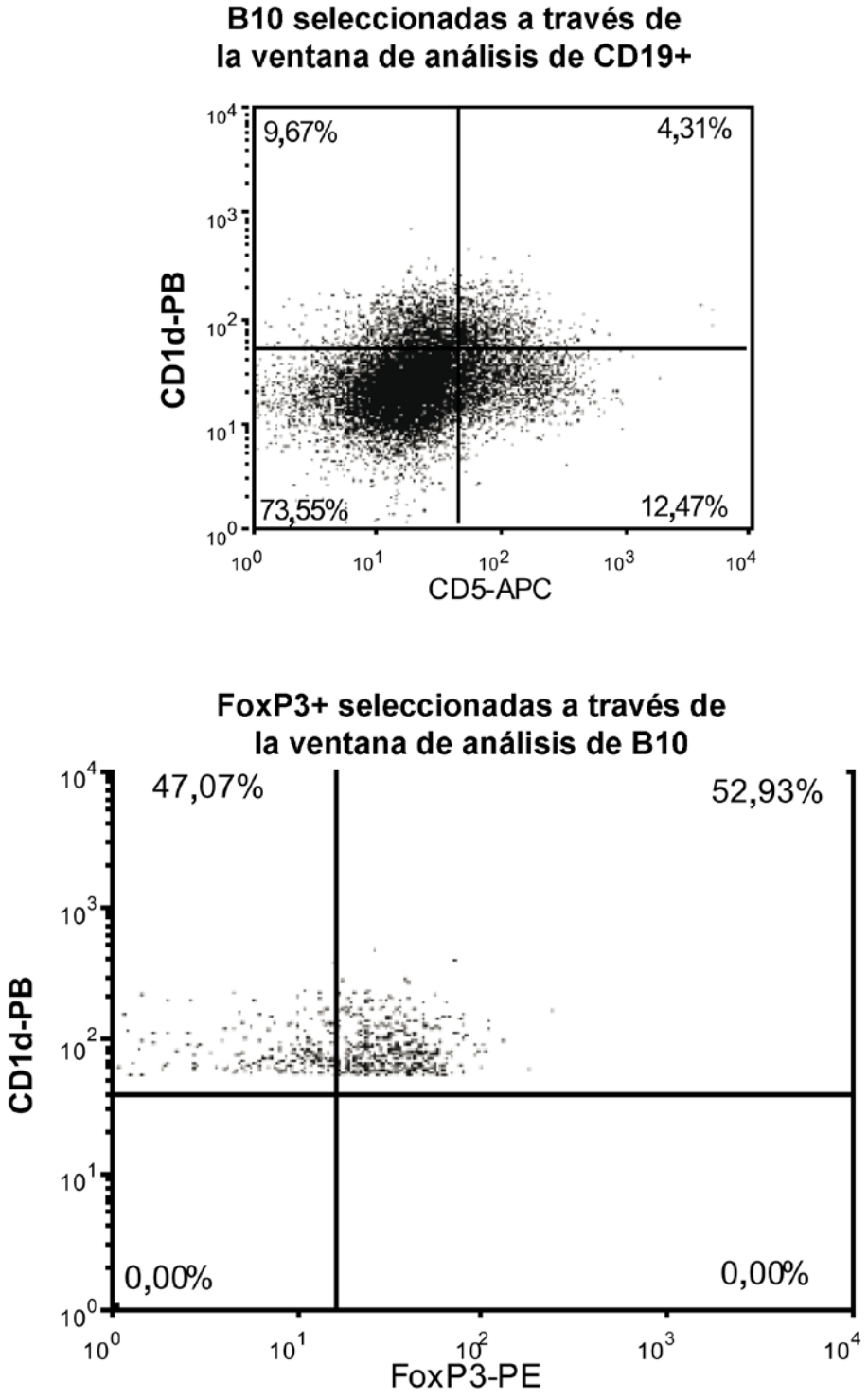

B10 seleccionadas a través de
la ventana de análisis de CD19+
9,67%
4,31%
73,55%
12,47%
CD1d-PB
CD5-APC
FoxP3+ seleccionadas a través de
la ventana de análisis de B10
47,07%
52,93%
0,00%
0,00%
CD1d-PB
FoxP3-PE

**Figura 41A, cont.**

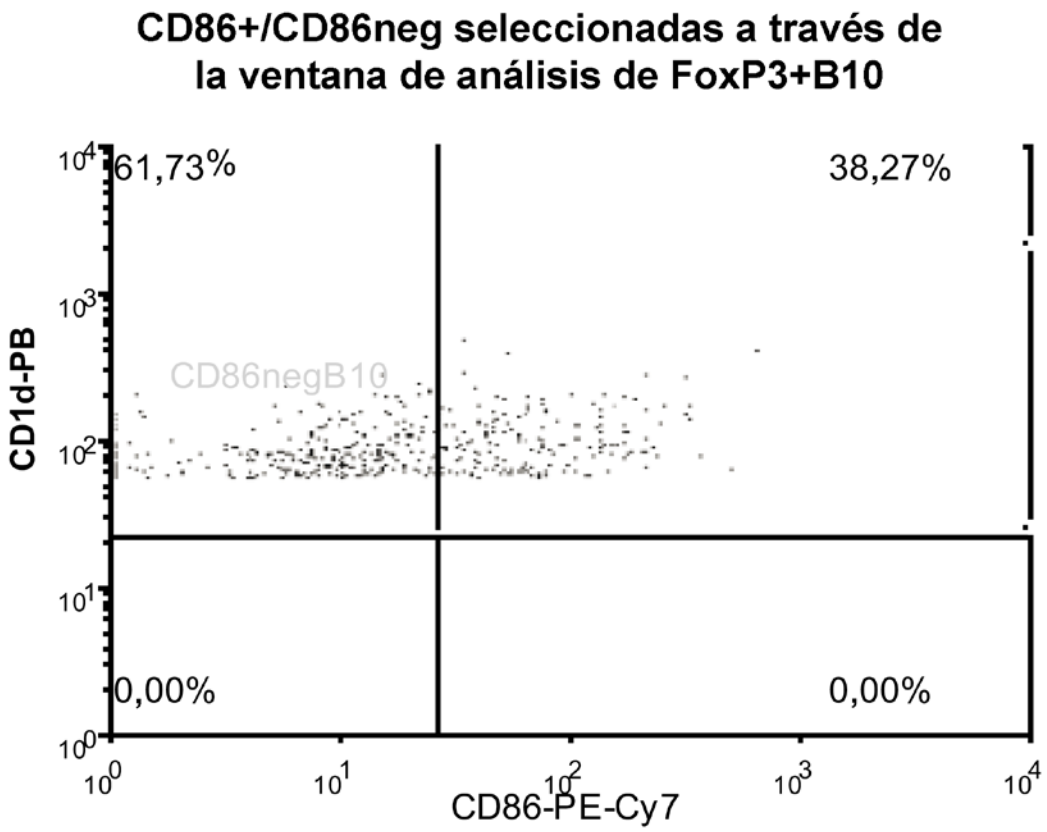


Figura 41B

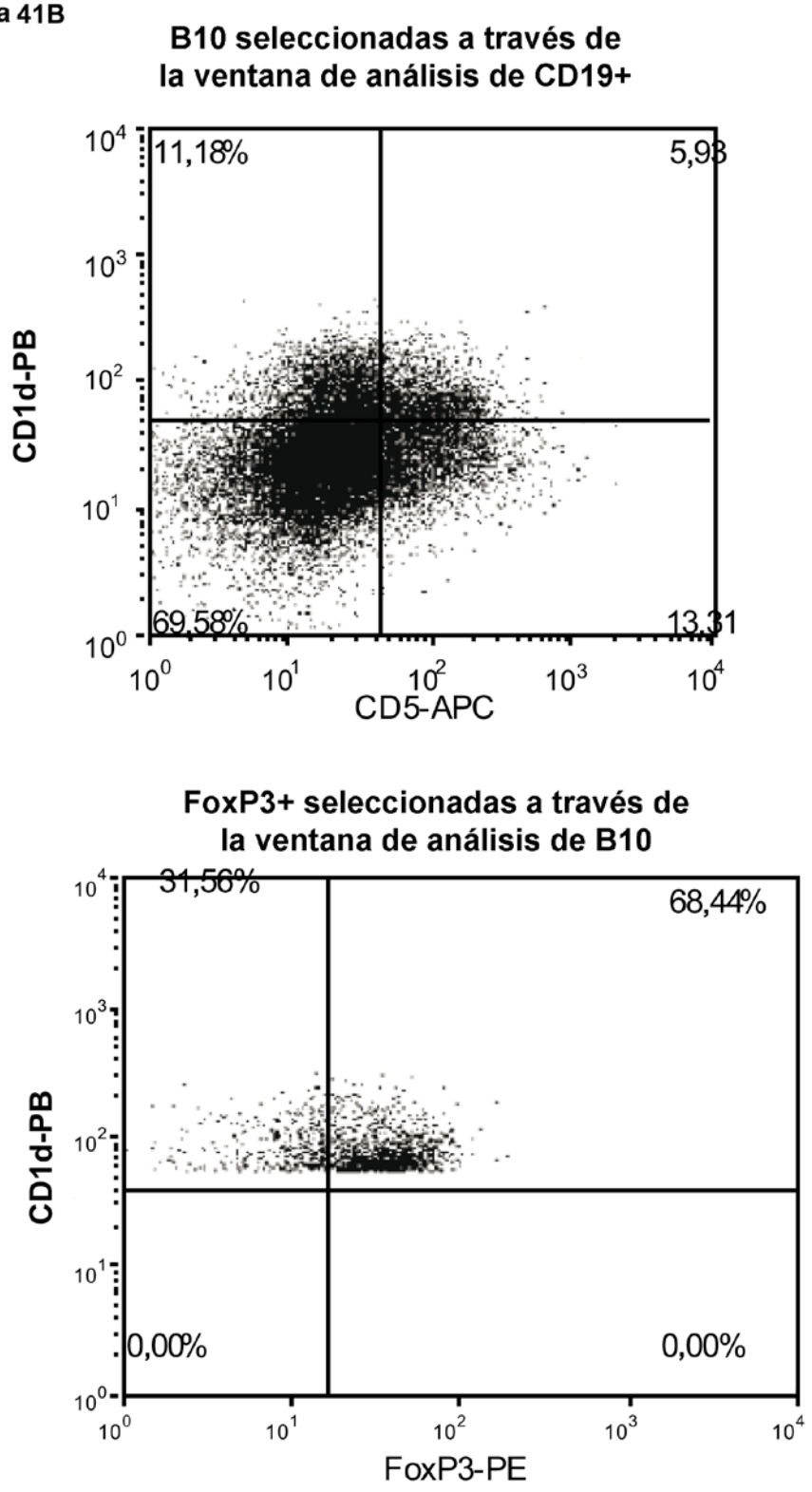

B10 seleccionadas a través de
la ventana de análisis de CD19+
11,18%
5,93
69,58%
13,31
CD1d-PB
CD5-APC
FoxP3+ seleccionadas a través de
la ventana de análisis de B10
31,56%
68,44%
0,00%
0,00%
CD1d-PB
FoxP3-PE

**Figura 41B, cont.**

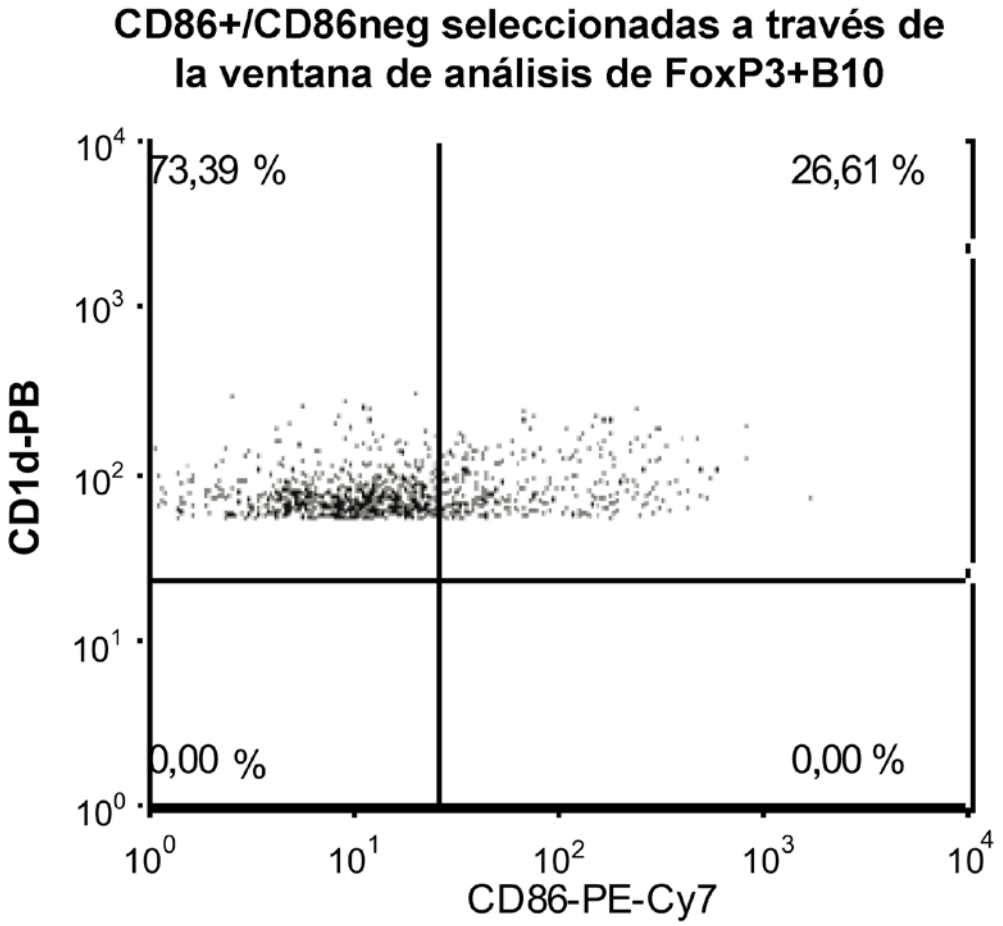


Figura 41C

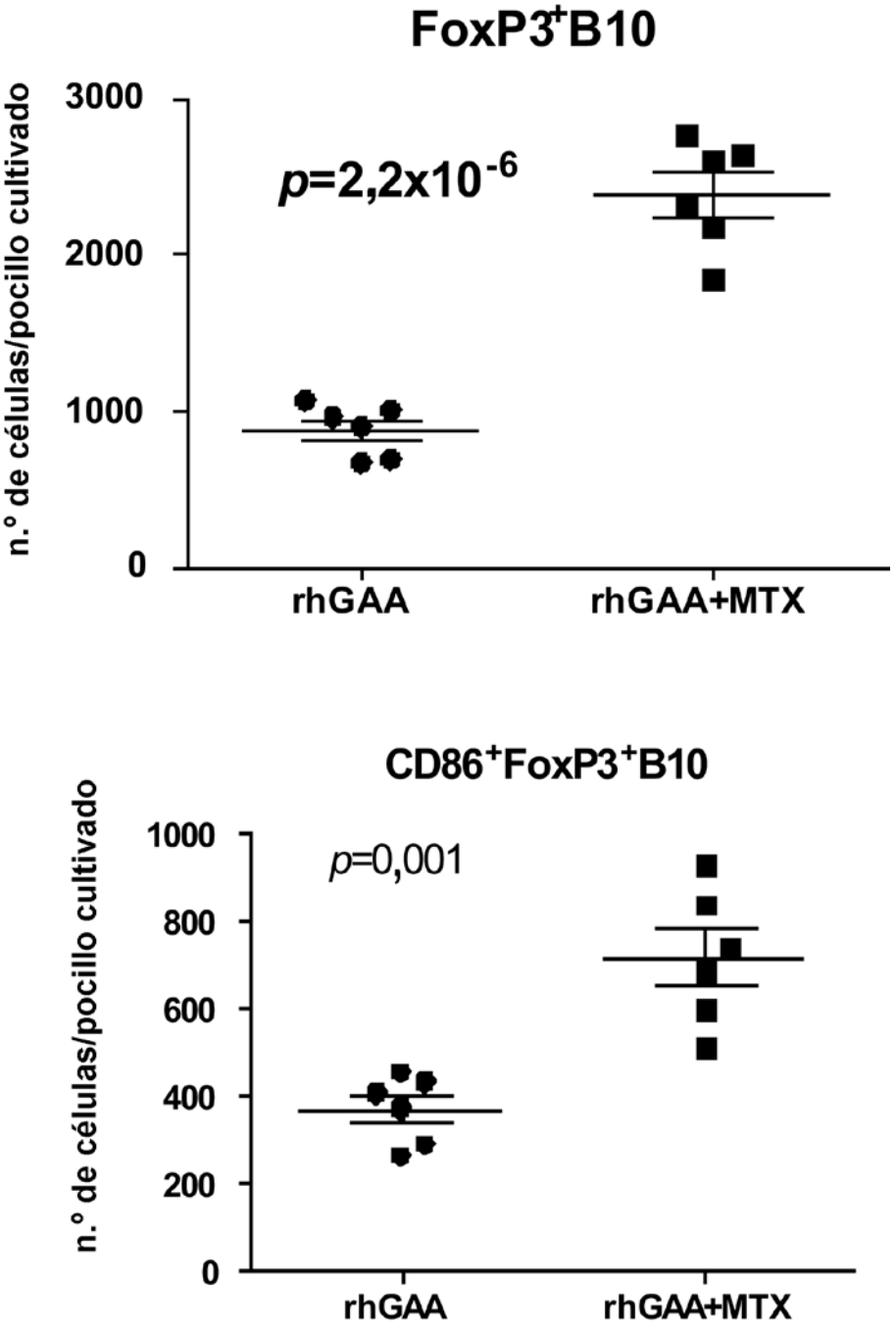

FoxP3+B10
n.º de células/pocillo cultivado
3000
2000
1000
0
p=2,2x10-6
rhGAA
rhGAA+MTX
CD86+FoxP3+B10
n.º de células/pocillo cultivado
1000
800
600
400
200
0
p=0,001
rhGAA
rhGAA+MTX

Figura 41C, cont.

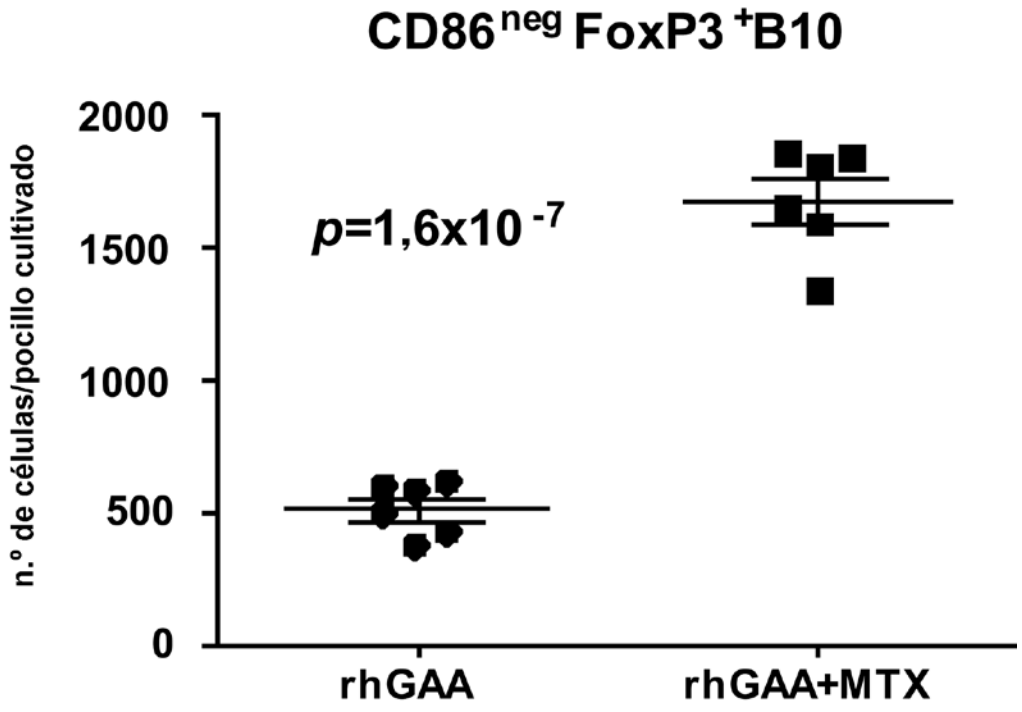


FIG. 1A

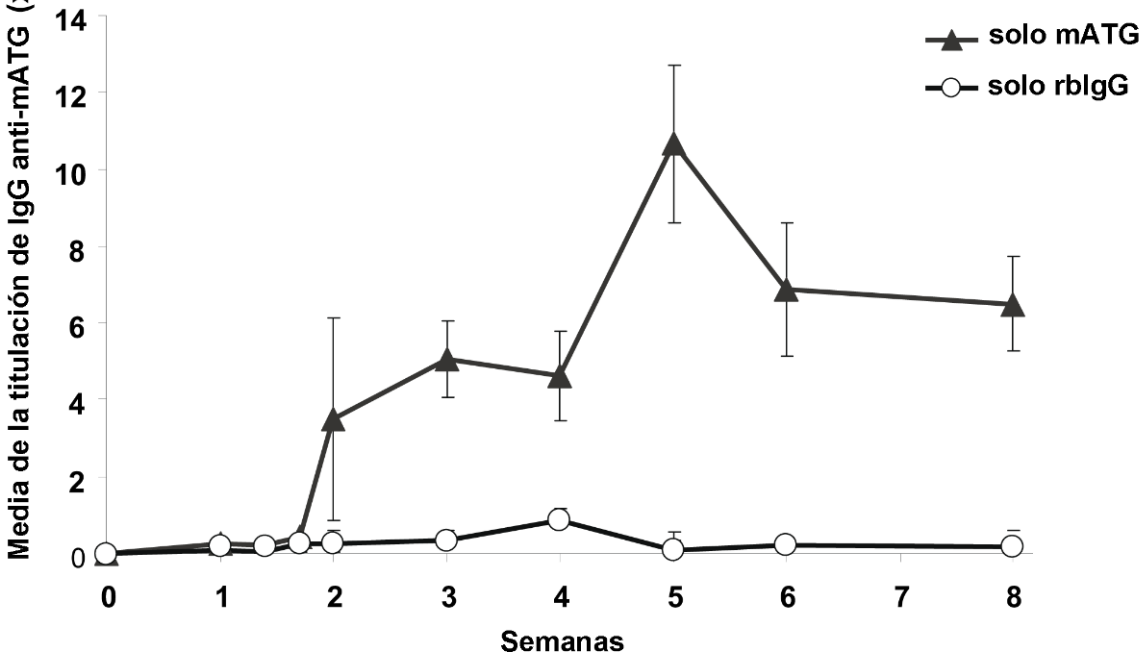

Media de la titulación de IgG anti-mATG (x10⁴)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Semanas
solo mATG
solo rblgG

FIG. 1B

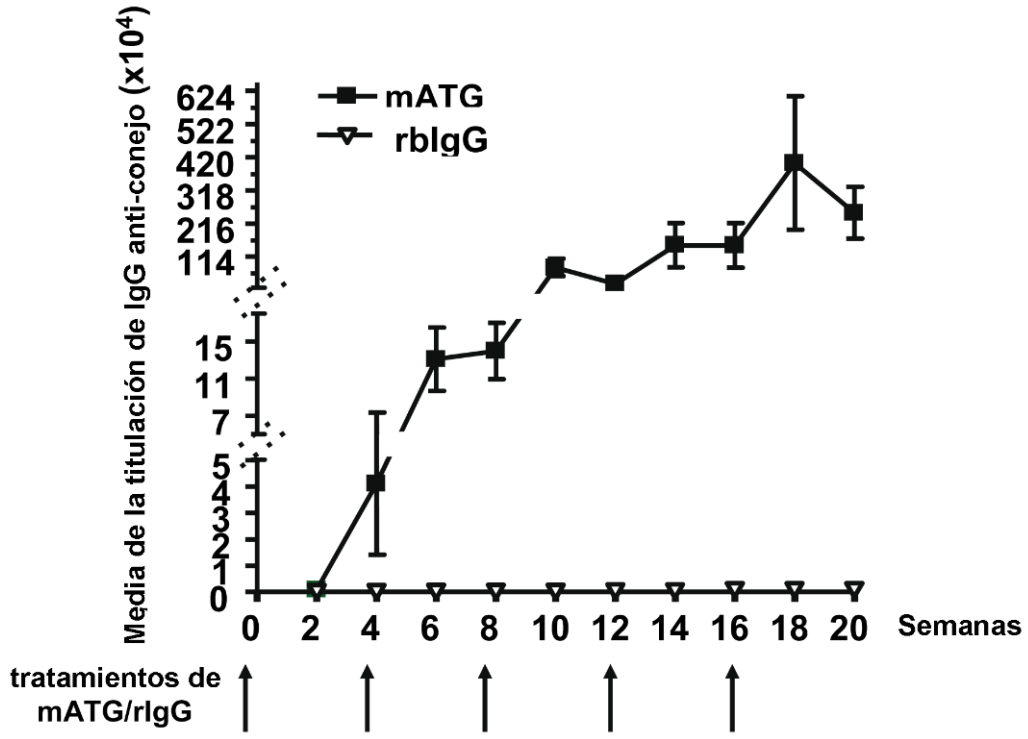

Media de la titulación de IgG anti-conejo (x10⁴)
624
522
420
318
216
114
15
11
7
5
4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Semanas
mATG
rblgG
tratamientos de
mATG/rlgG

FIG. 2

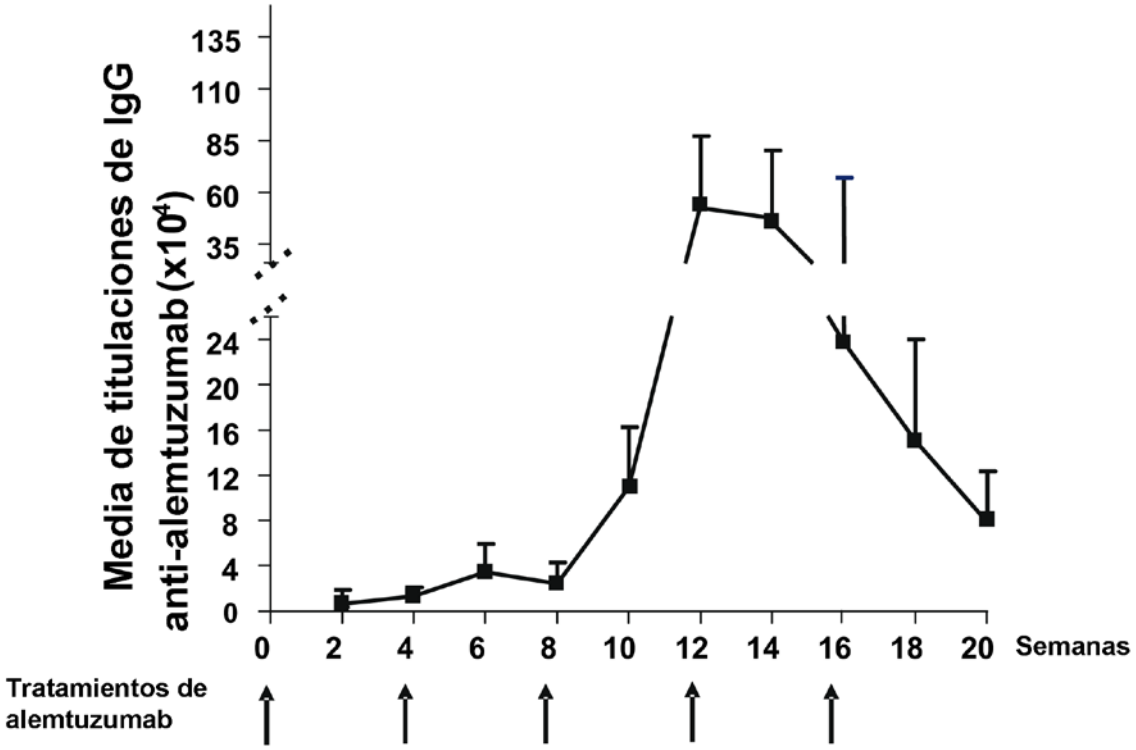

Media de titulaciones de IgG anti-alemtuzumab (x10⁴)
135
110
85
60
35
24
20
16
12
8
4
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Semanas
Tratamientos de alemtuzumab

FIG 3

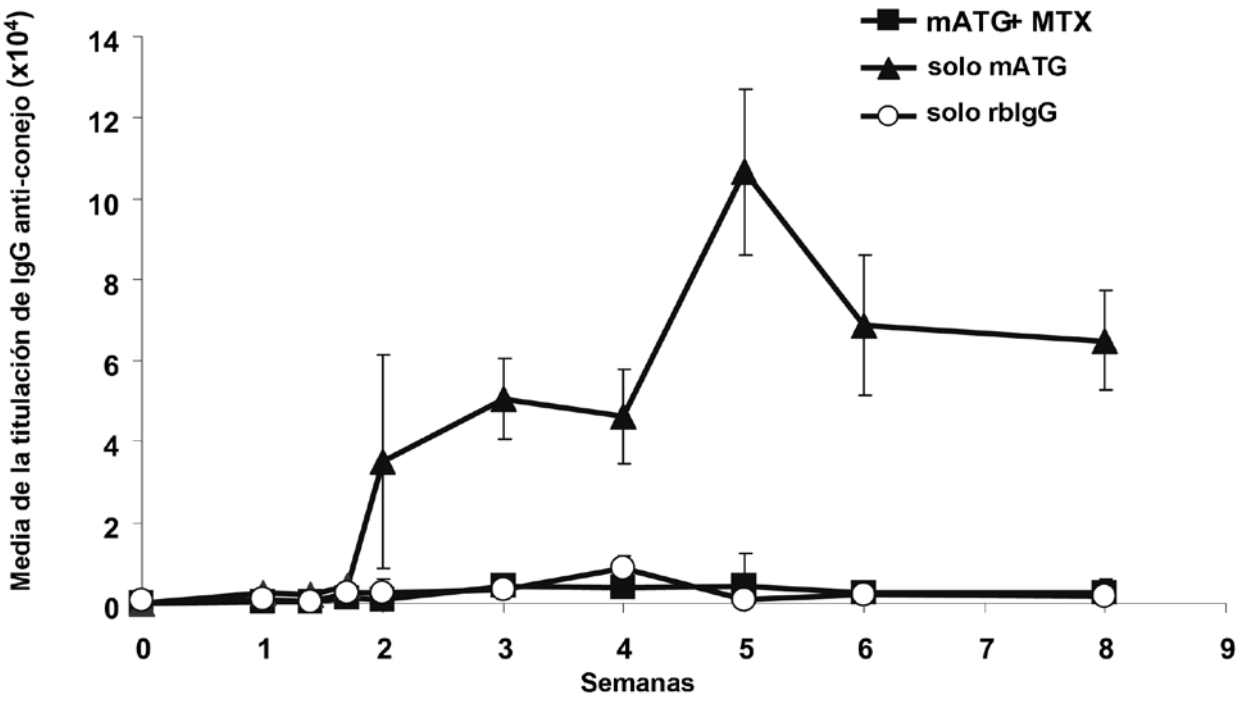

mATG+ MTX
solo mATG
solo rbIgG
Media de la titulación de IgG anti-conejo (x10⁴)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Semanas

FIG. 4A

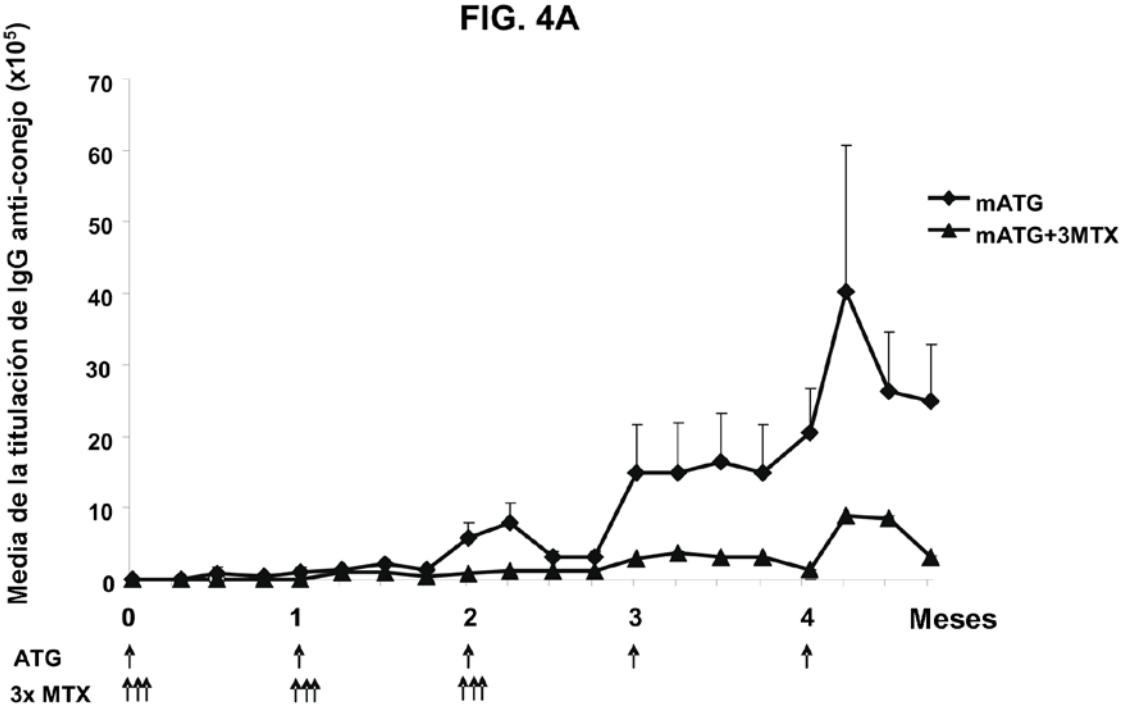

Media de la titulación de IgG anti-conejo (x10$^5$)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
Meses
mATG
mATG+3MTX
ATG
3x MTX

FIG. 4B

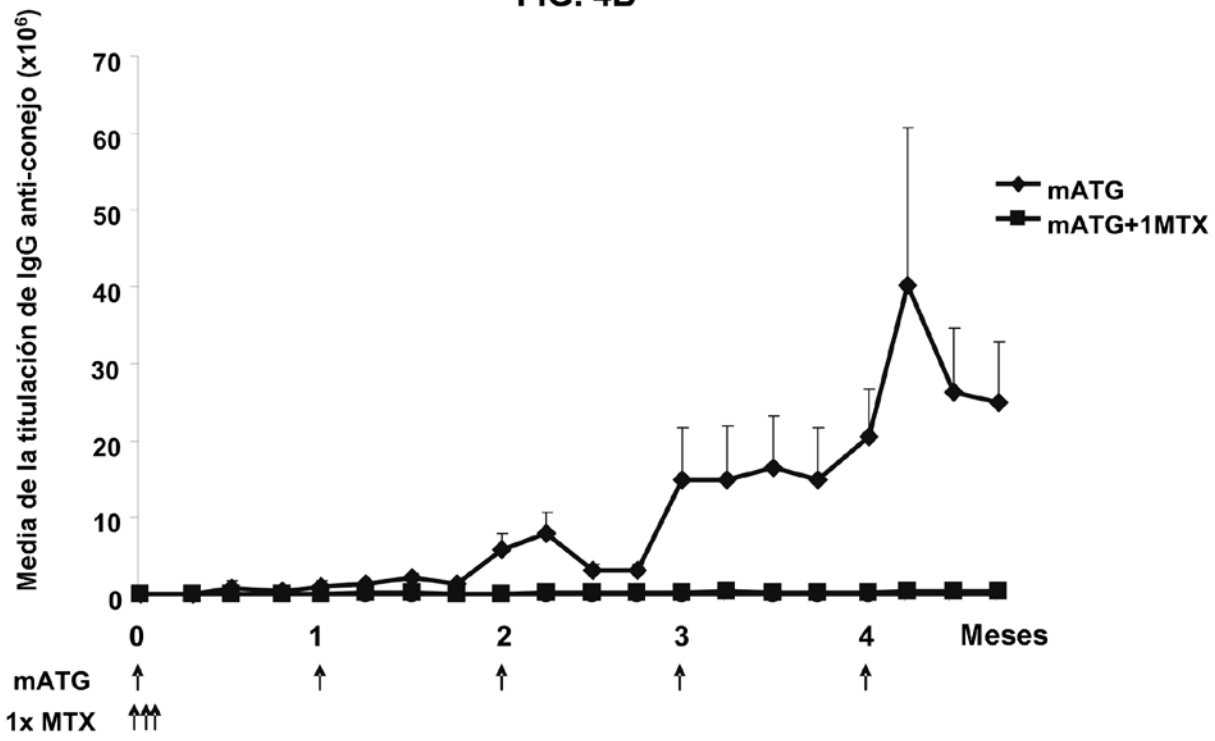

Media de la titulación de IgG anti-conejo (x10$^6$)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
Meses
mATG
mATG+1MTX
mATG
1x MTX

FIG. 4C

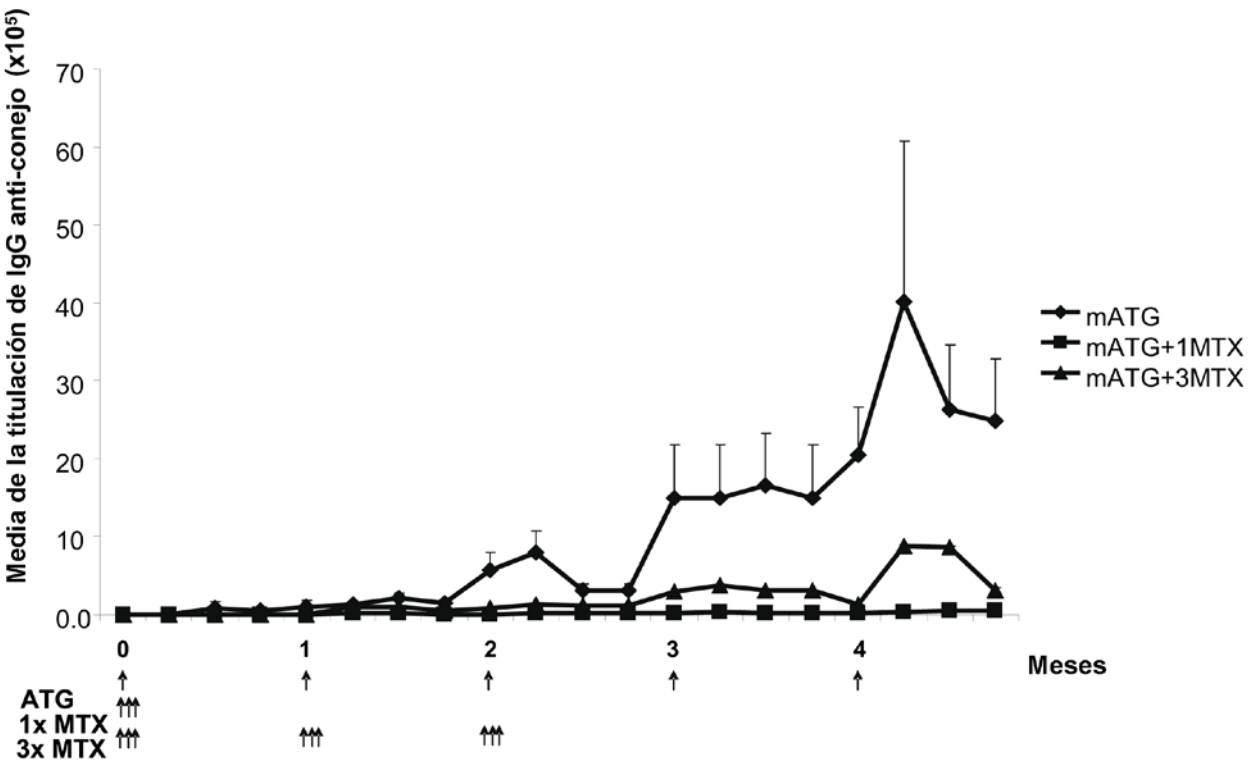

Media de la titulación de IgG anti-conejo (x10⁵)
70
60
50
40
30
20
10
0.0
0
1
2
3
4
Meses
ATG
1x MTX
3x MTX
mATG
mATG+1MTX
mATG+3MTX

FIG. 5

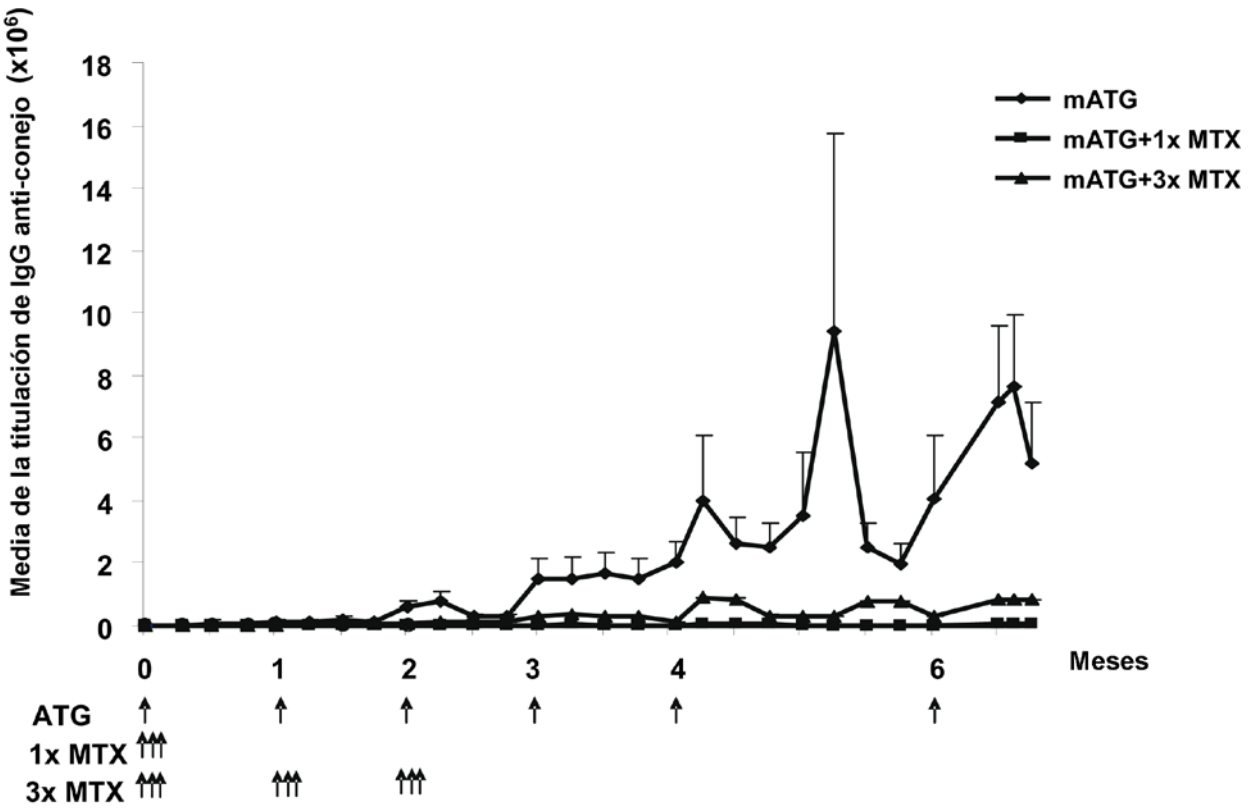

Media de la titulación de IgG anti-conejo (x10⁶)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
mATG
mATG+1x MTX
mATG+3x MTX
0
1
2
3
4
6
Meses
ATG
1x MTX
3x MTX

FIG. 6

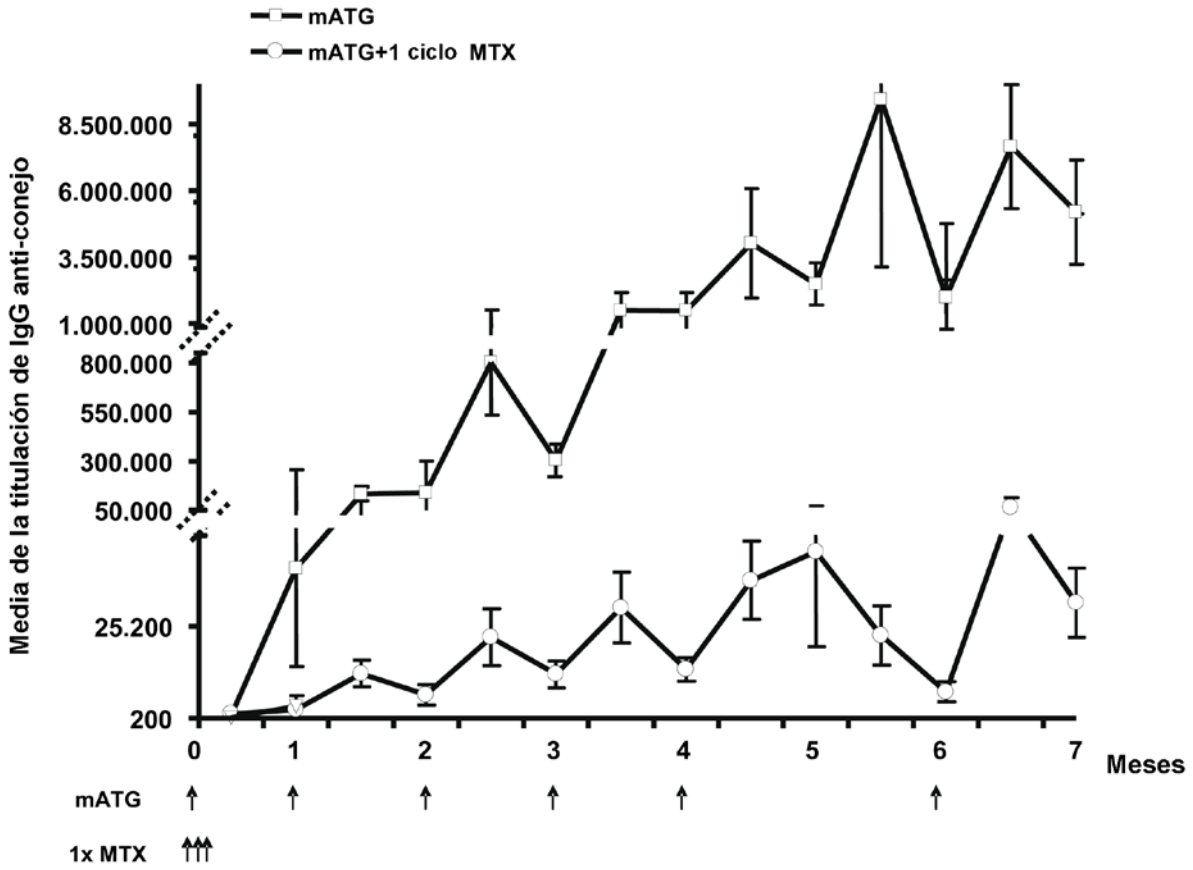

mATG
mATG+1 ciclo MTX
Media de la titulación de IgG anti-conejo
8.500.000
6.000.000
3.500.000
1.000.000
800.000
550.000
300.000
50.000
25.200
200
0
1
2
3
4
5
6
7
Meses
mATG
1x MTX

FIG. 7A

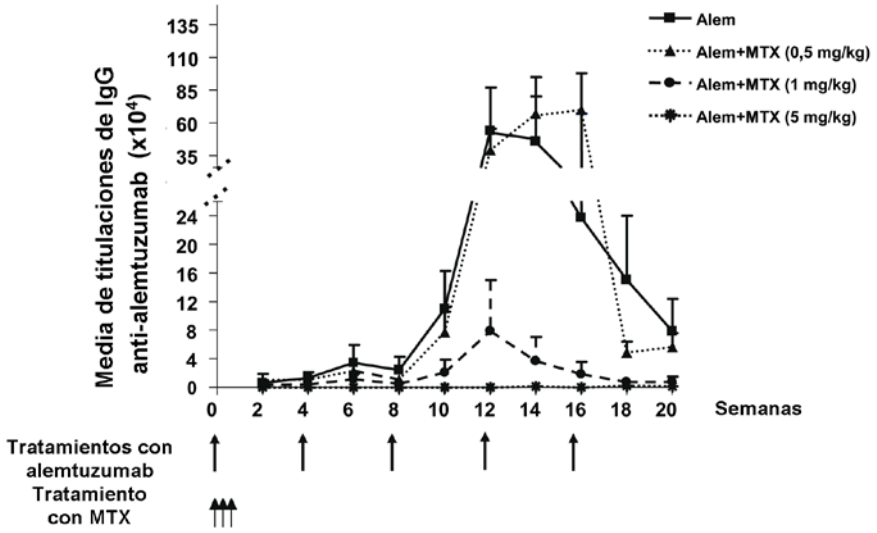



FIG. 7B

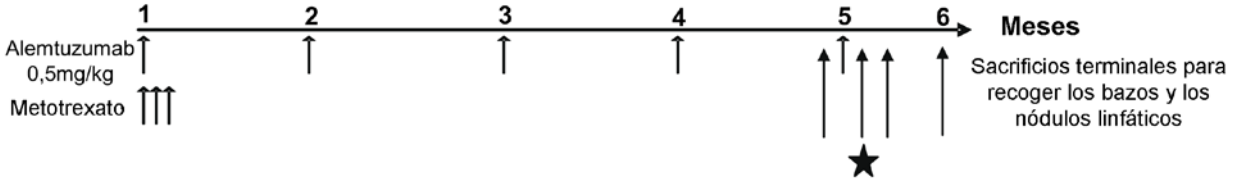



FIG. 7C

Titulaciones anti-alemtuzumab
24 horas después de la quinta dosis mensual

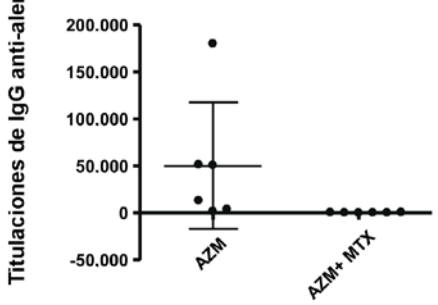


FIG. 8 A.

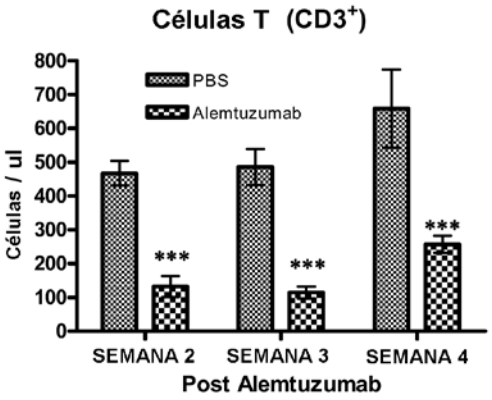



FIG. 8 B.

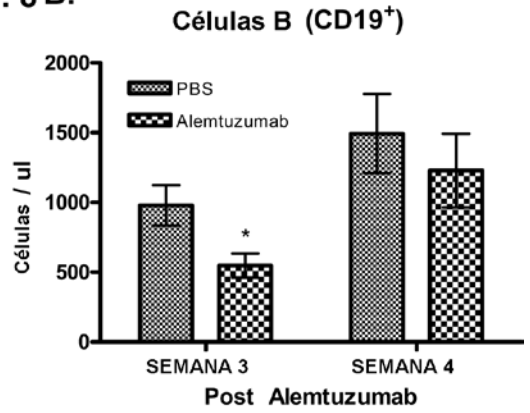



FIG. 8 C.

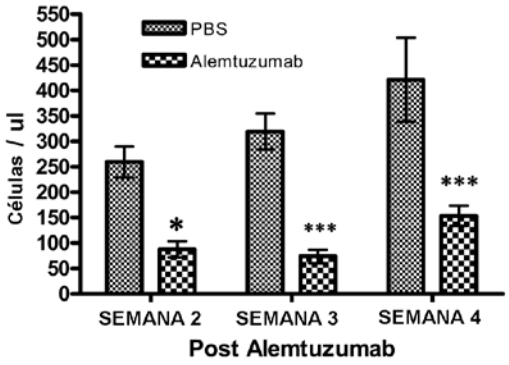



FIG. 8 D.

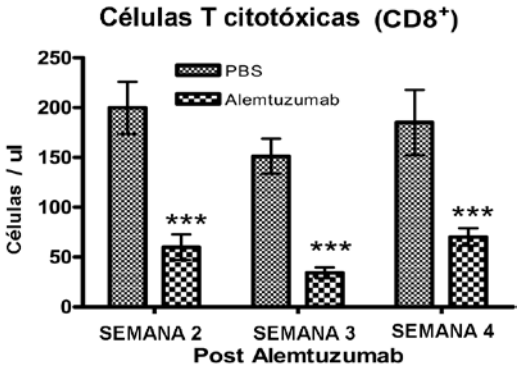


**FIG. 9** A.

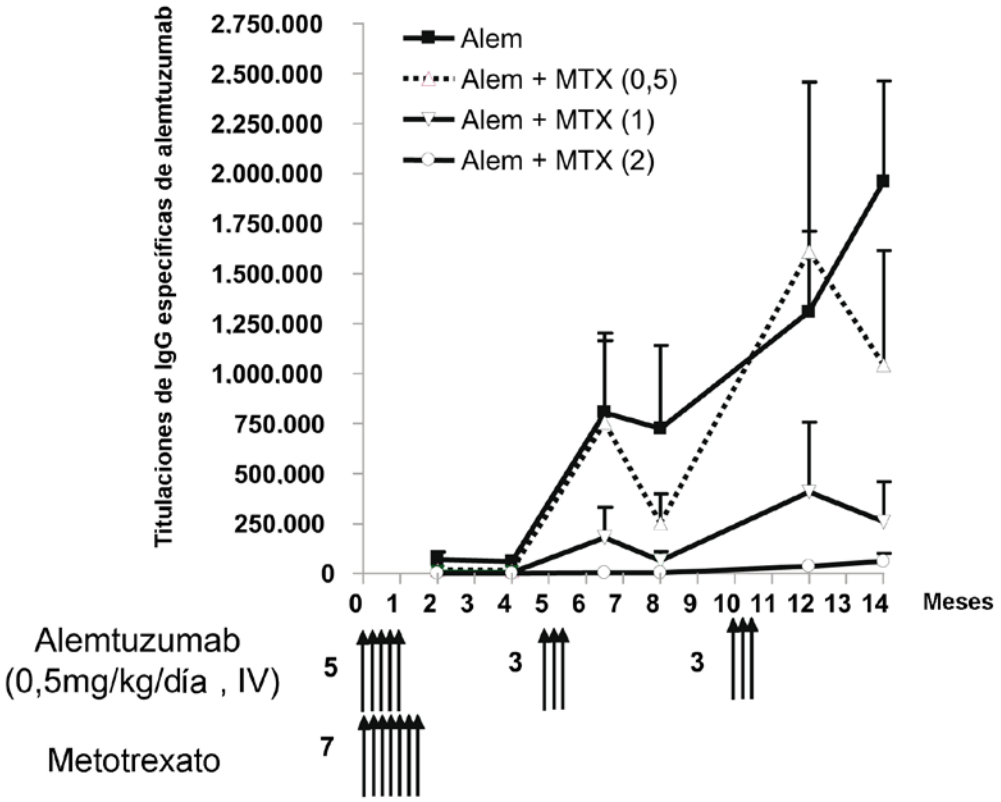

Titulaciones de IgG específicas de alemtuzumab
2.750.000
2.500.000
2.250.000
2.000.000
1.750.000
1.500.000
1.250.000
1.000.000
750.000
500.000
250.000
0
Alem
Alem + MTX (0,5)
Alem + MTX (1)
Alem + MTX (2)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Meses
Alemtuzumab
(0,5mg/kg/día , IV)
5
3
3
Metotrexato
7

**FIG. 9** B.

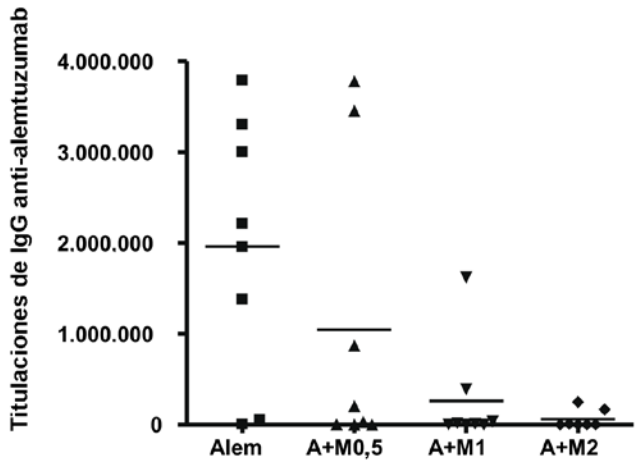

Titulaciones de IgG anti-alemtuzumab
4.000.000
3.000.000
2.000.000
1.000.000
0
Alem
A+M0,5
A+M1
A+M2

**FIG. 10**

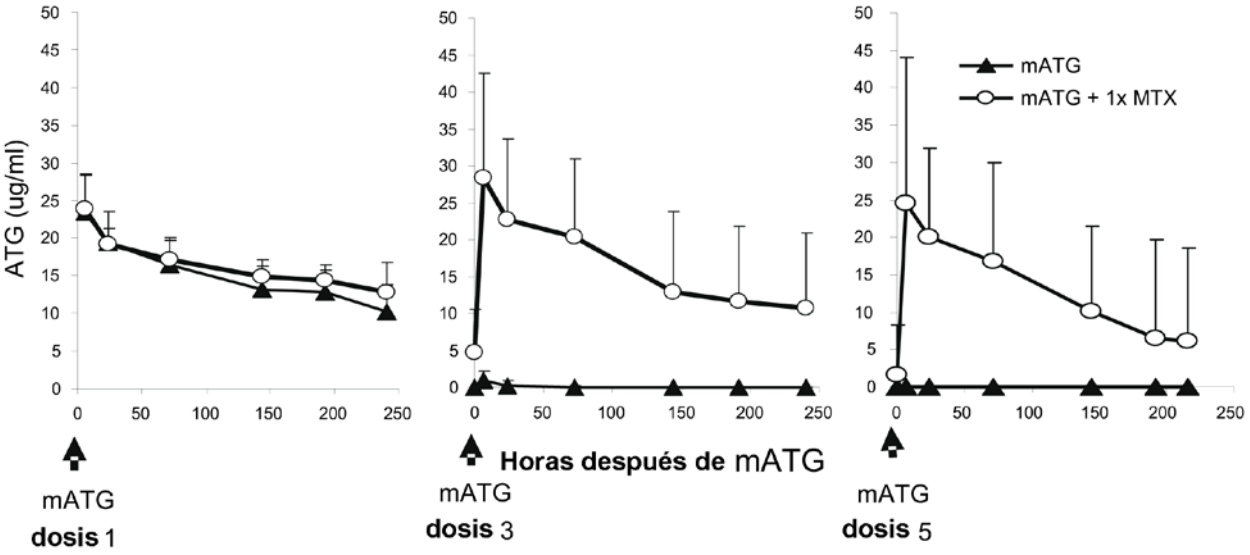

ATG (ug/ml)
mATG
mATG + 1x MTX
Horas después de mATG
mATG
dosis 1
mATG
dosis 3
mATG
dosis 5

FIG. 11

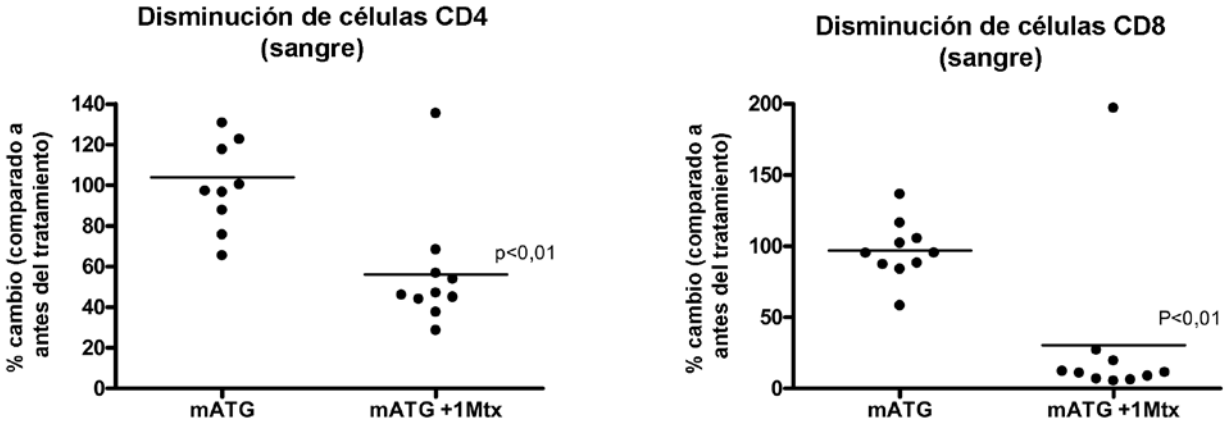

Disminución de células CD4
(sangre)
% cambio (comparado a antes del tratamiento)
140
120
100
80
60
40
20
0
p<0,01
mATG
mATG +1Mtx
Disminución de células CD8
(sangre)
% cambio (comparado a antes del tratamiento)
200
150
100
50
0
P<0,01
mATG
mATG +1Mtx

FIG. 12A

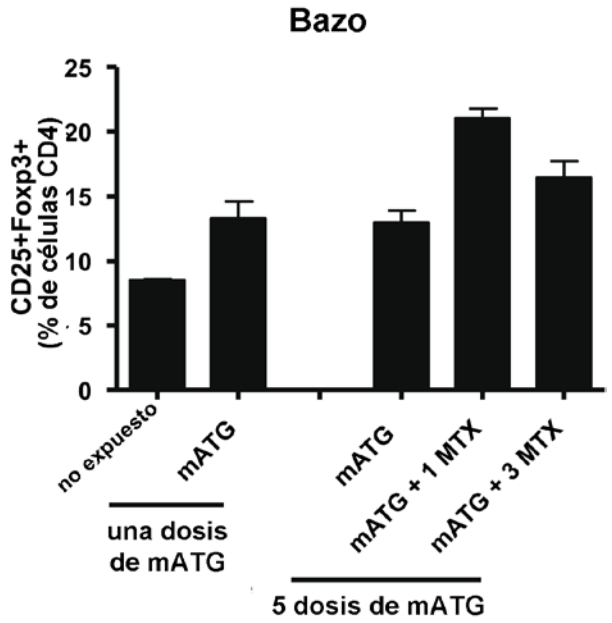



FIG. 12B

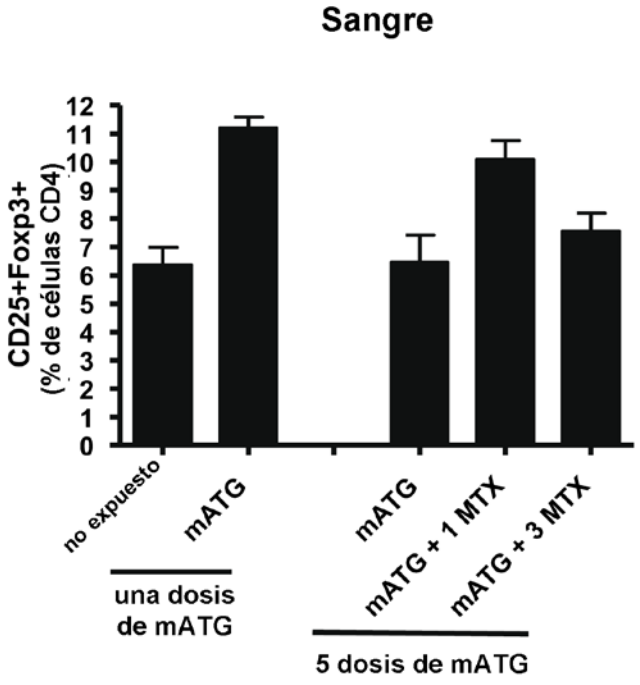


FIG. 13A

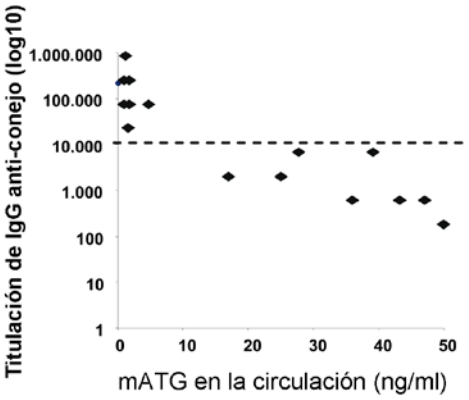
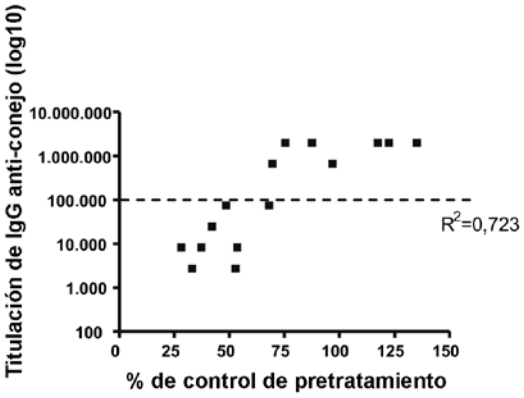



FIG. 13B



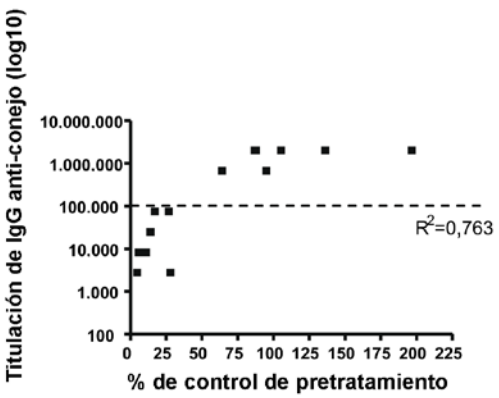



FIG. 14

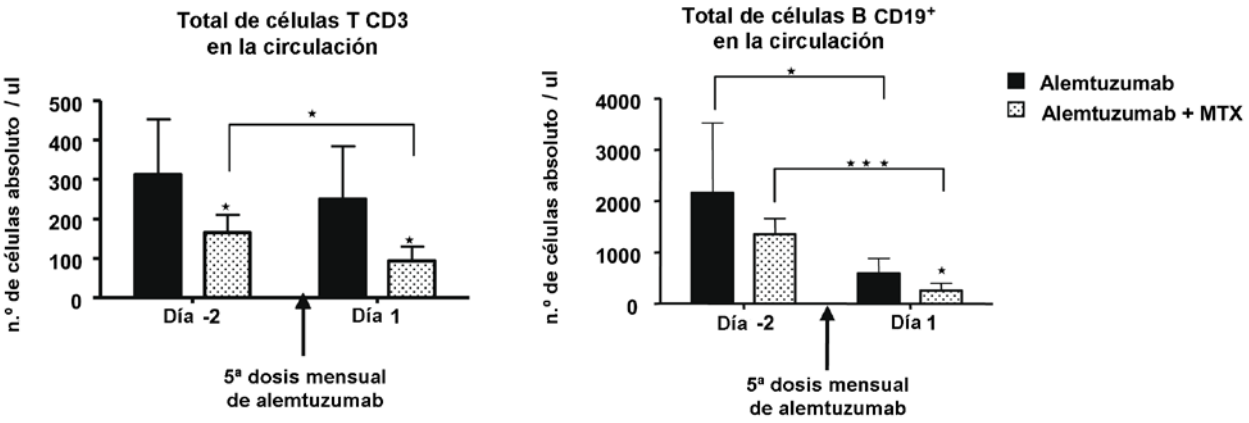

Total de células T CD3
en la circulación
n.º de células absoluto / ul
500
400
300
200
100
0
Día -2
Día 1
5ª dosis mensual
de alemtuzumab
Total de células B CD19+
en la circulación
n.º de células absoluto / ul
4000
3000
2000
1000
0
Día -2
Día 1
5ª dosis mensual
de alemtuzumab
Alemtuzumab
Alemtuzumab + MTX

FIG. 15A

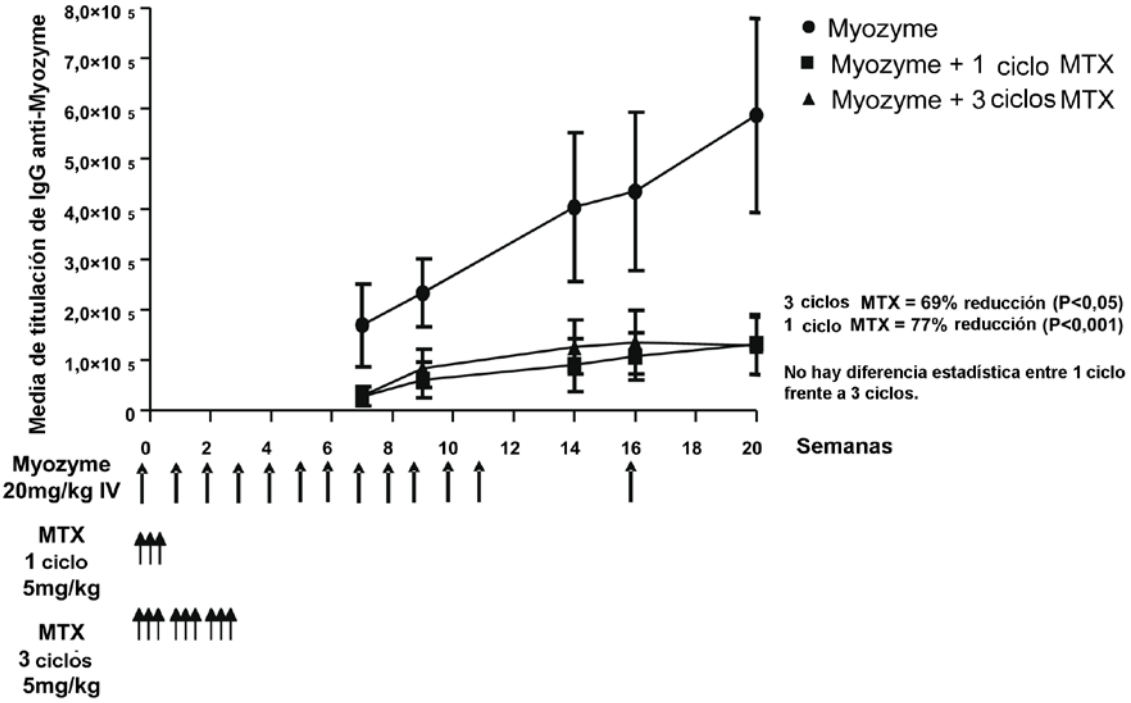



FIG. 15B

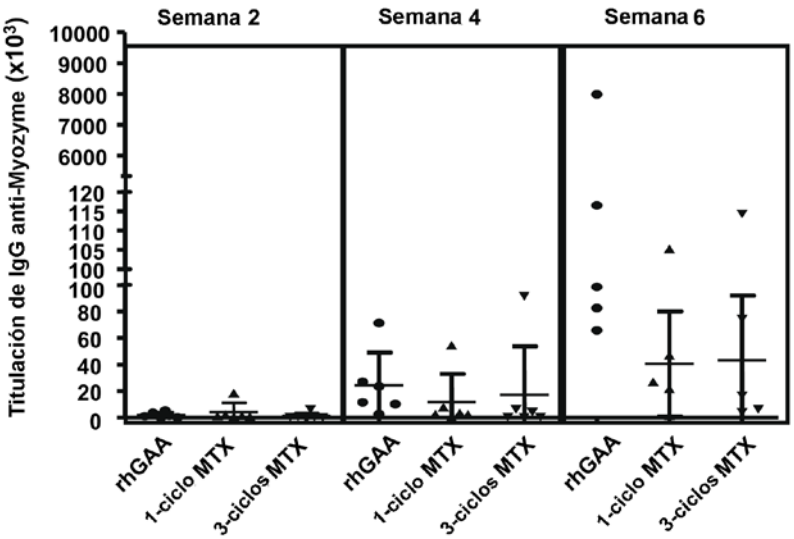


FIG. 15C

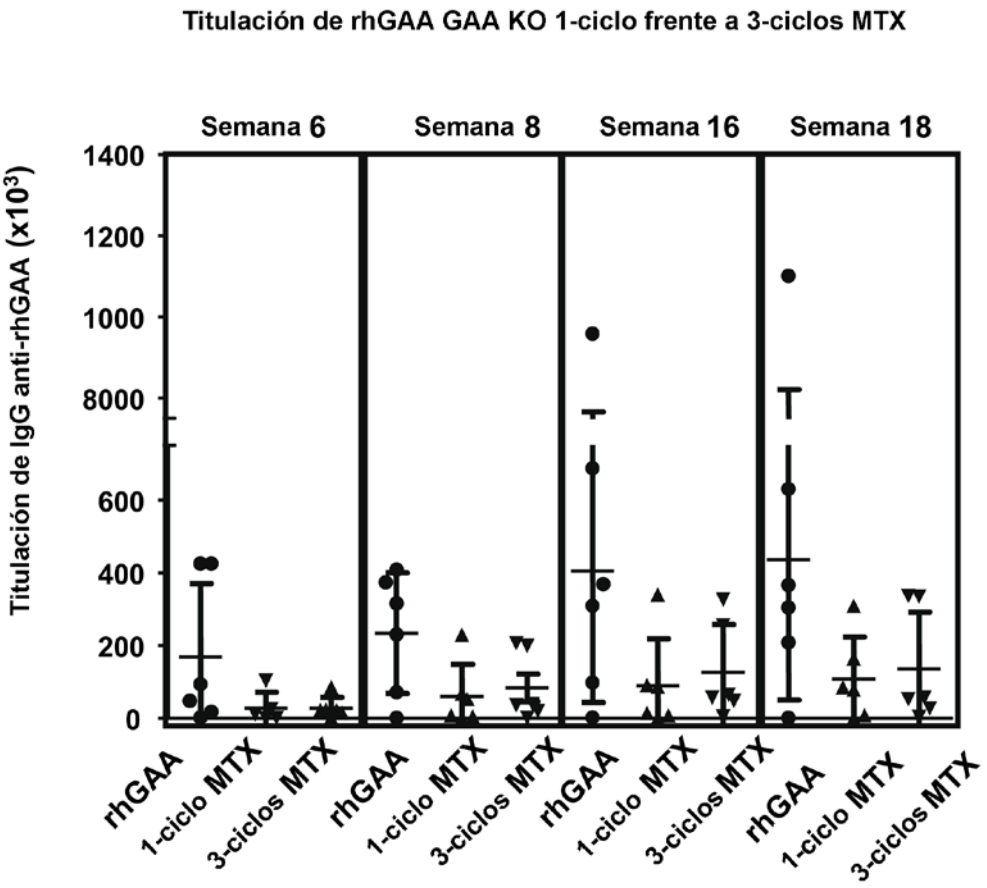

Titulación de rhGAA GAA KO 1-ciclo frente a 3-ciclos MTX
Semana 6
Semana 8
Semana 16
Semana 18
Titulación de IgG anti-rhGAA (x10³)
1400
1200
1000
8000
600
400
200
0
rhGAA
1-ciclo MTX
3-ciclos MTX

FIG. 16A

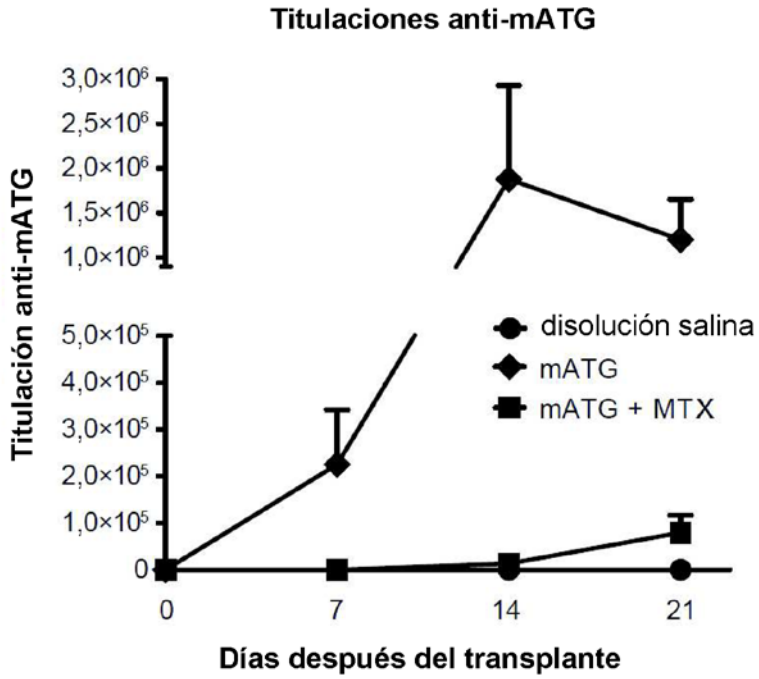



FIG. 16B

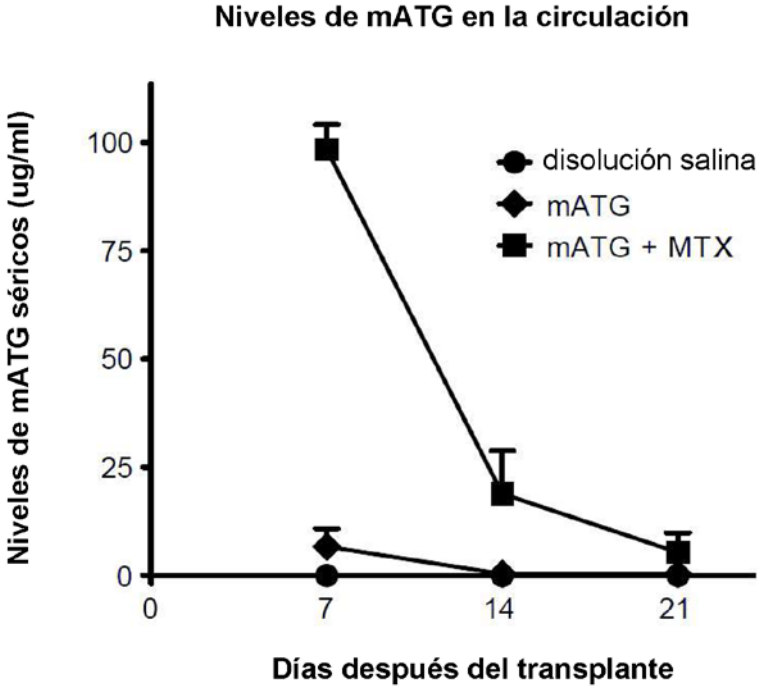


FIG. 17

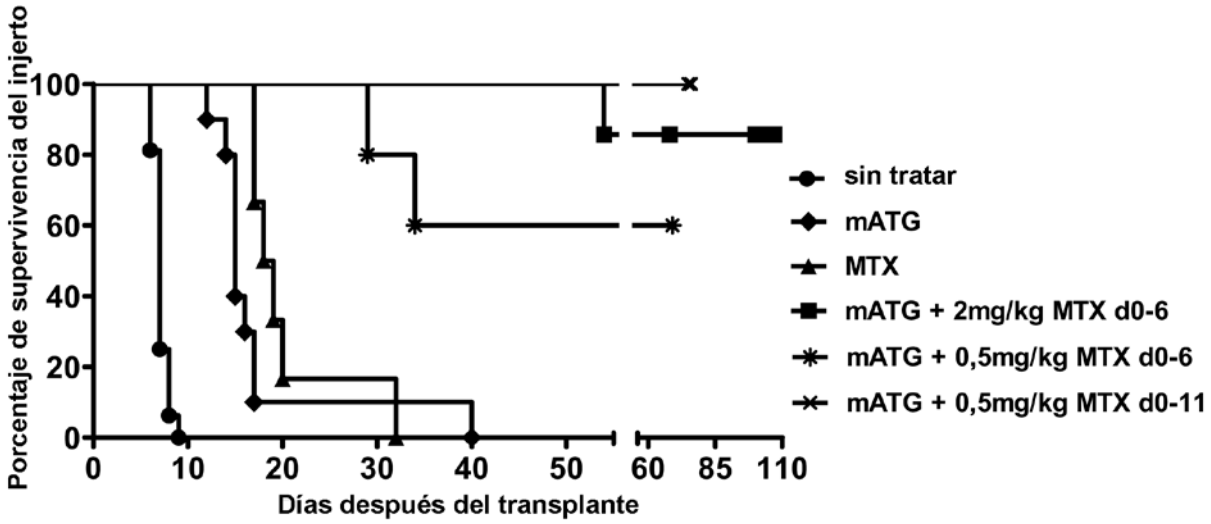

Porcentaje de supervivencia del injerto
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
85
110
Días después del transplante
sin tratar
mATG
MTX
mATG + 2mg/kg MTX d0-6
mATG + 0,5mg/kg MTX d0-6
mATG + 0,5mg/kg MTX d0-11

FIG. 18A

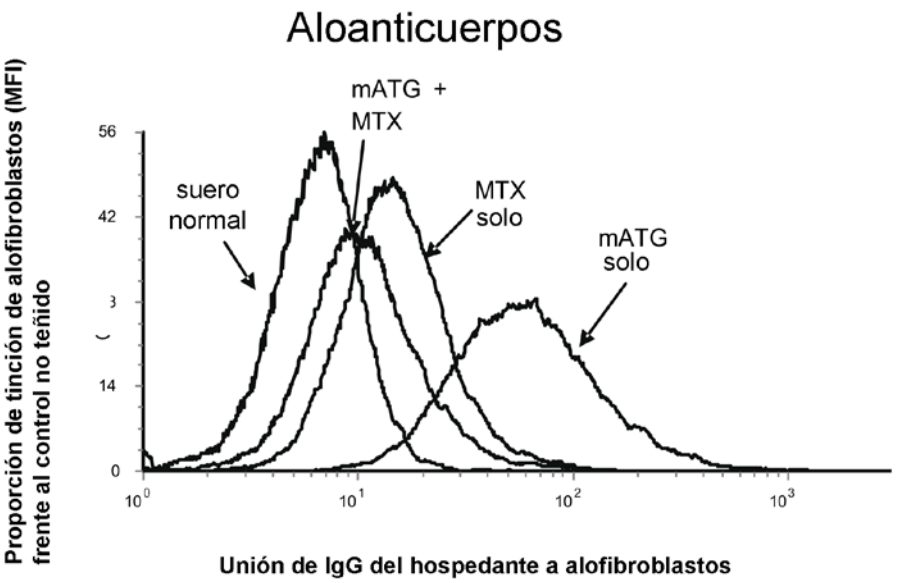



FIG. 18B

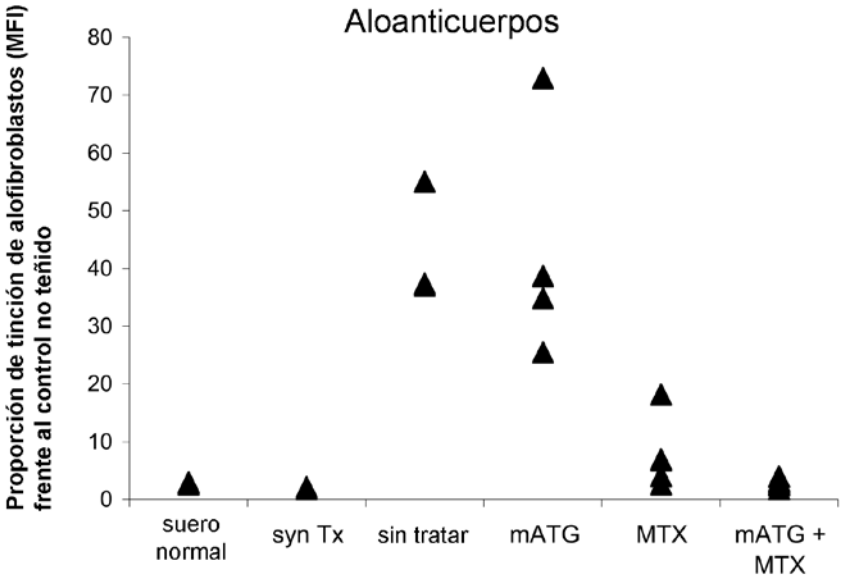


FIG. 18C

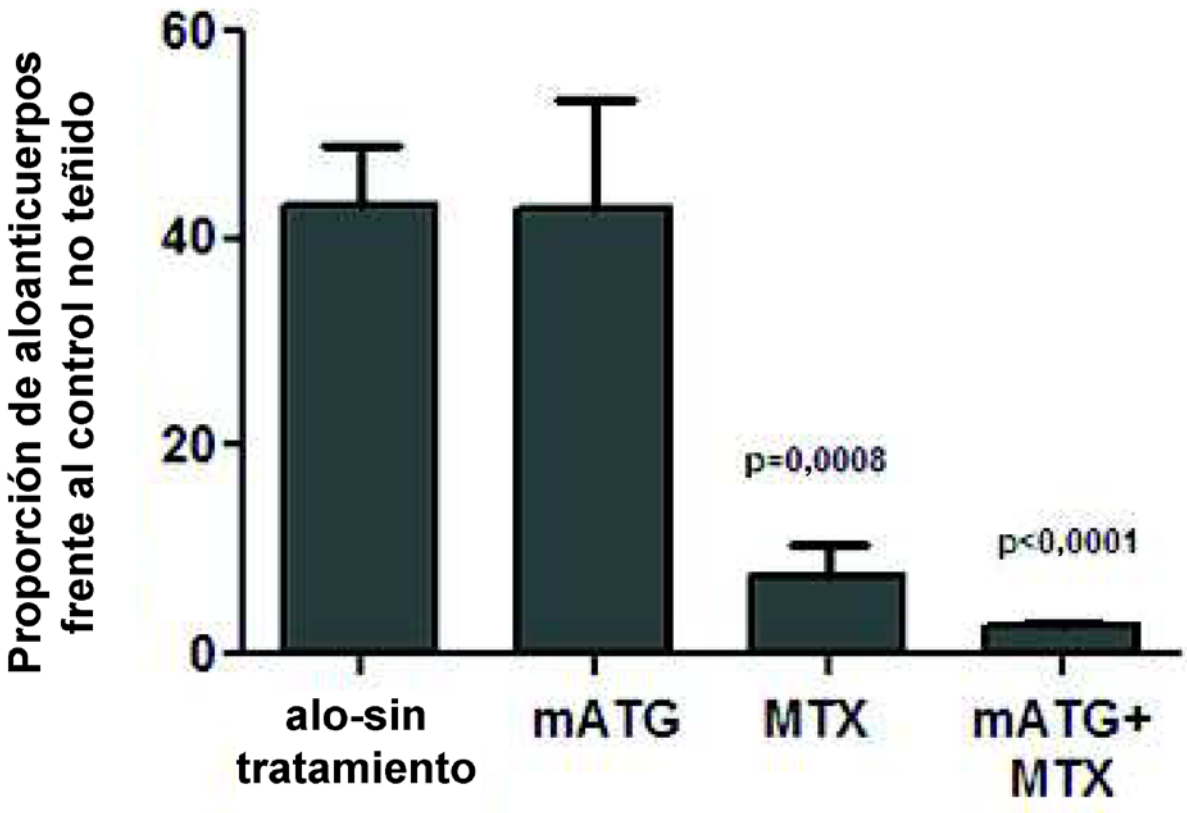

Aloanticuerpos
21 días después del tratamiento
Proporción de aloanticuerpos frente al control no teñido
60
40
20
0
p=0,0008
p<0,0001
alo-sin tratamiento
mATG
MTX
mATG+ MTX

FIG. 19

n.º de B10 en el bazo

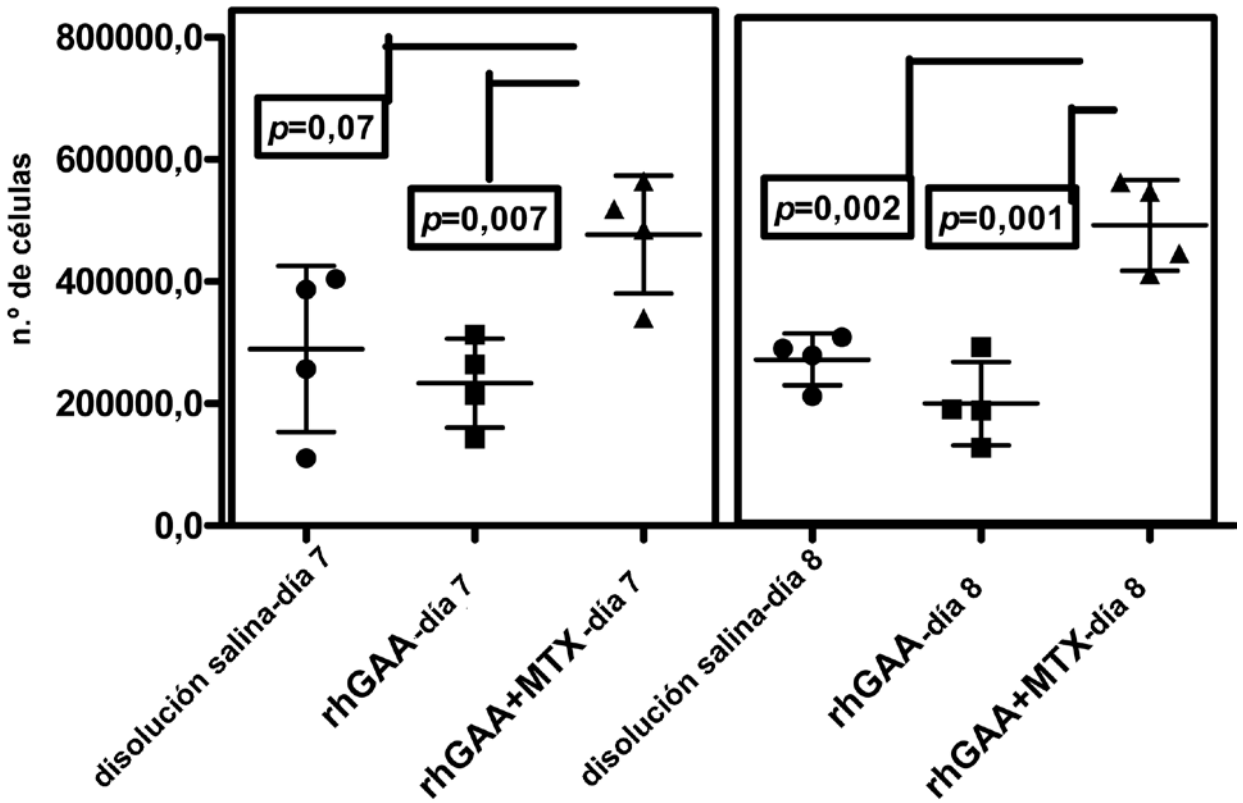


FIG. 20

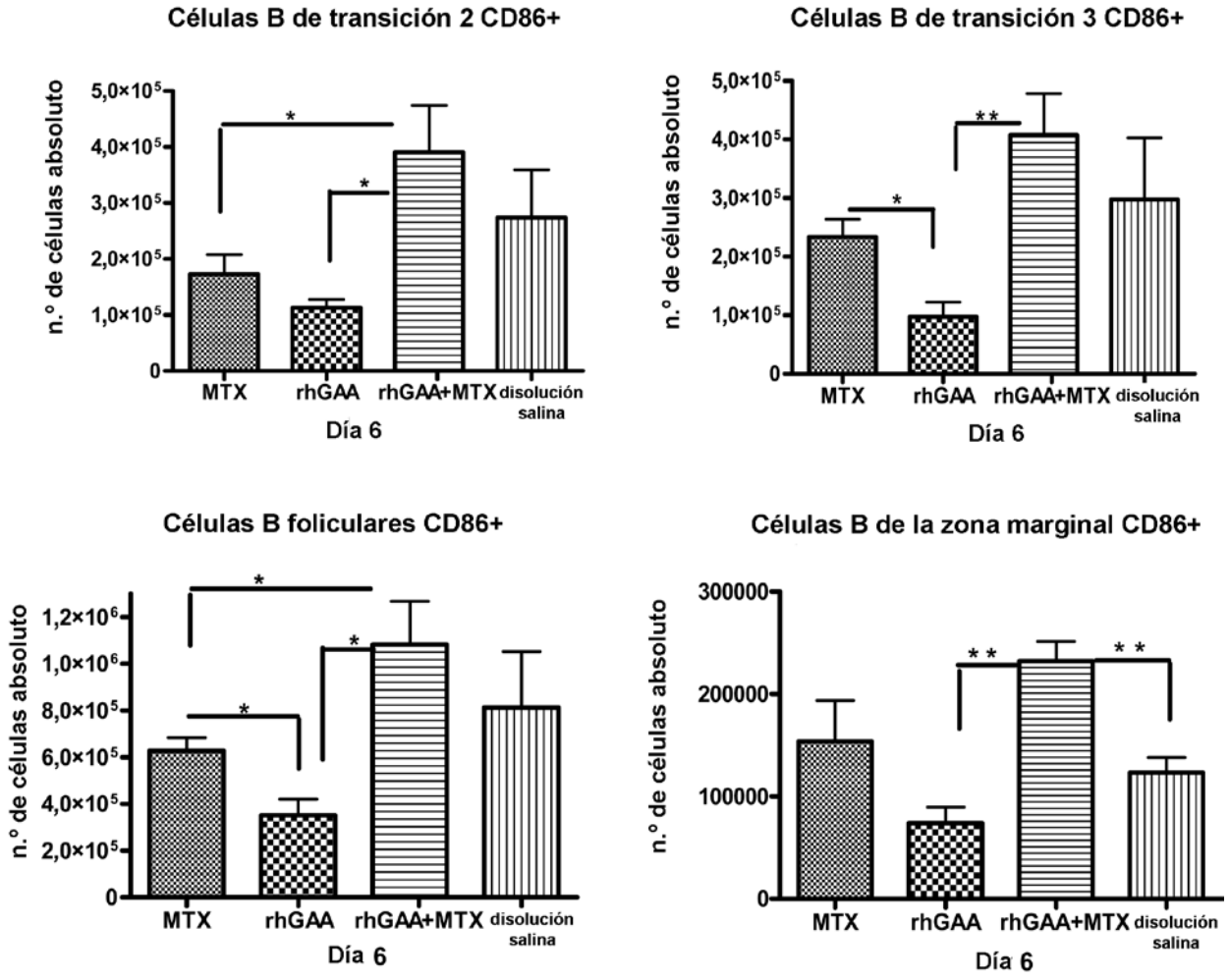

Células B de transición 2 CD86+
n.º de células absoluto
5,0×10⁵
4,0×10⁵
3,0×10⁵
2,0×10⁵
1,0×10⁵
0
MTX
rhGAA
rhGAA+MTX
disolución salina
Día 6
Células B de transición 3 CD86+
n.º de células absoluto
5,0×10⁵
4,0×10⁵
3,0×10⁵
2,0×10⁵
1,0×10⁵
0
MTX
rhGAA
rhGAA+MTX
disolución salina
Día 6
Células B foliculares CD86+
n.º de células absoluto
1,2×10⁶
1,0×10⁶
8,0×10⁵
6,0×10⁵
4,0×10⁵
2,0×10⁵
0
MTX
rhGAA
rhGAA+MTX
disolución salina
Día 6
Células B de la zona marginal CD86+
n.º de células absoluto
300000
200000
100000
0
MTX
rhGAA
rhGAA+MTX
disolución salina
Día 6

FIG. 21

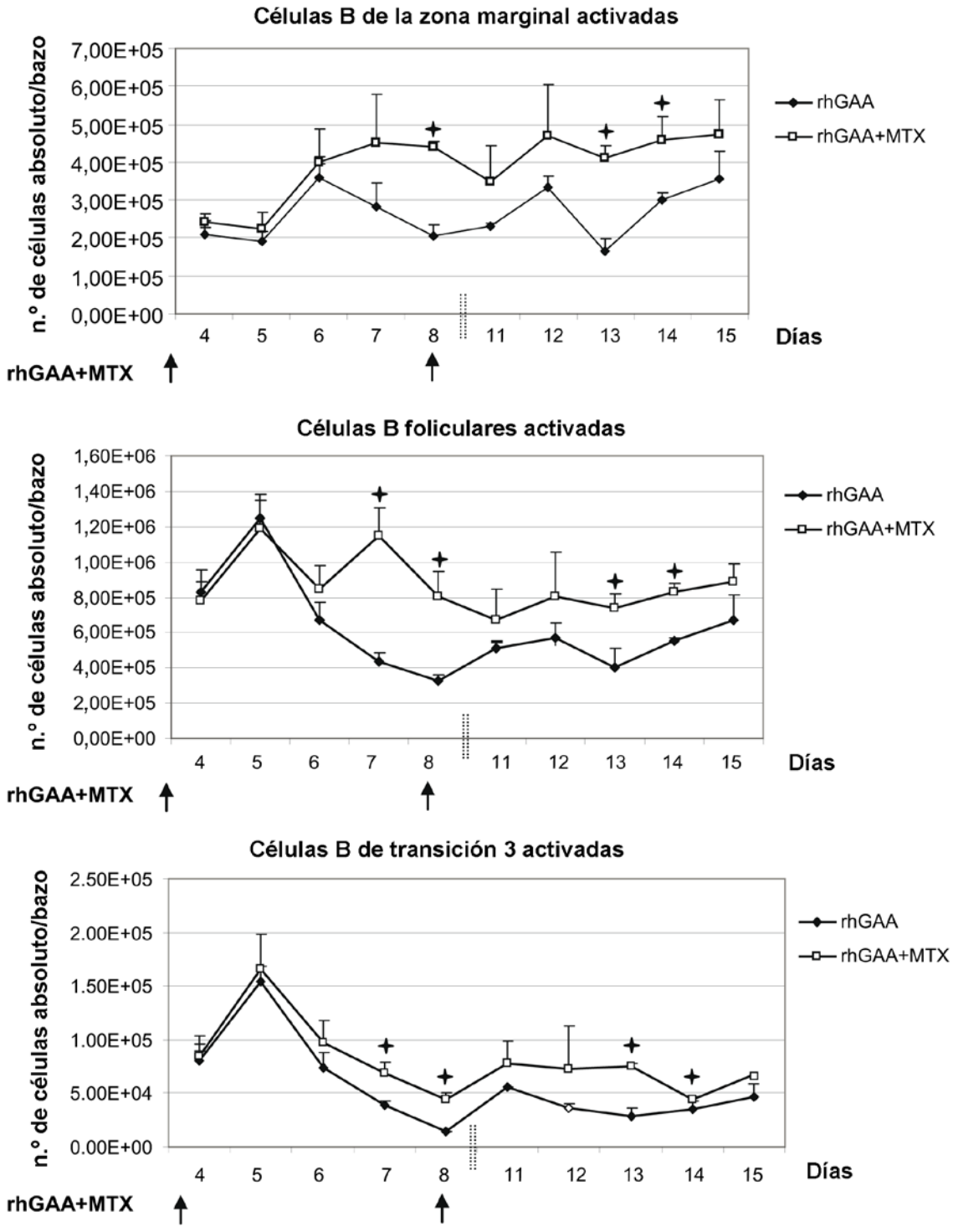
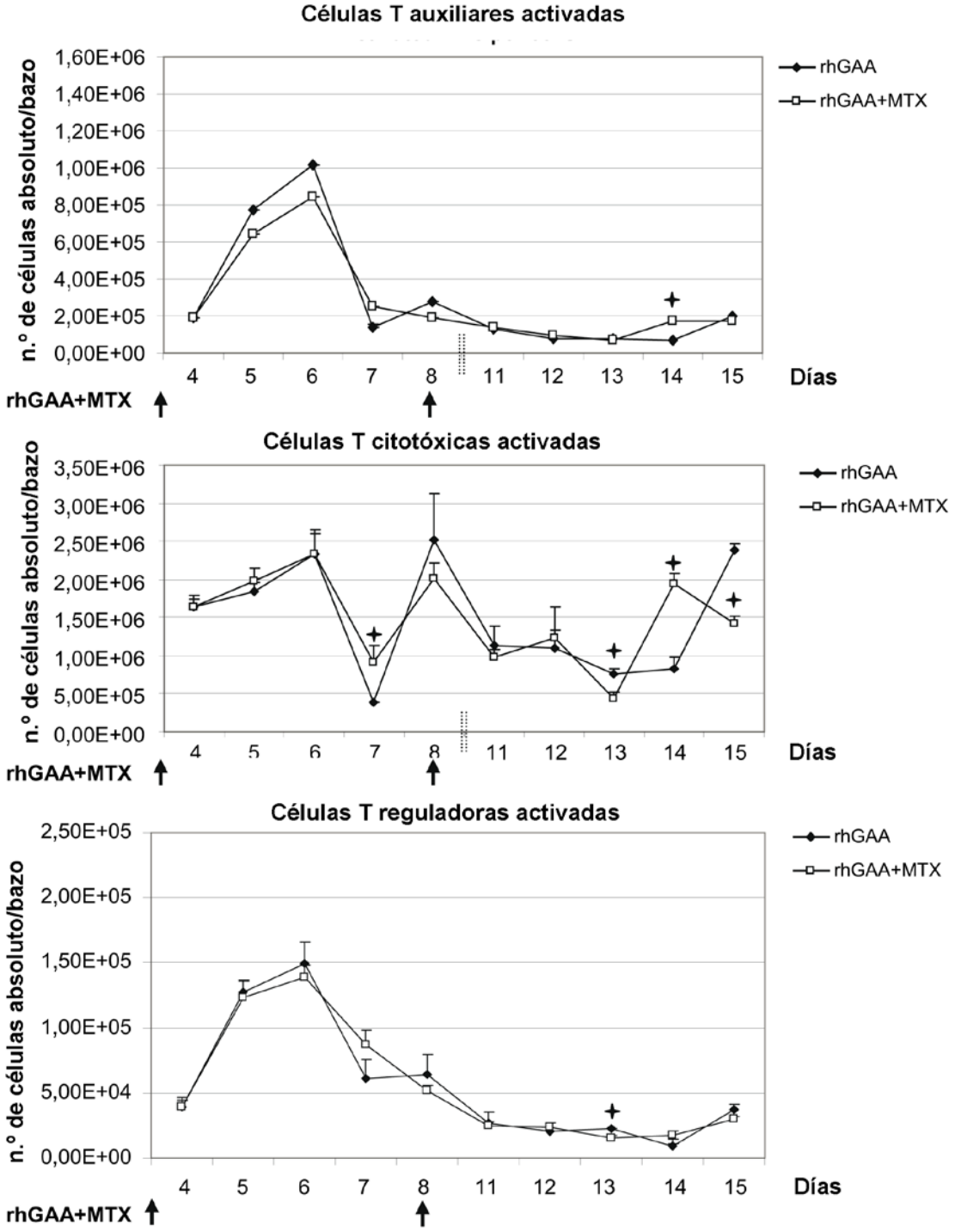

Células B de la zona marginal activadas
n.º de células absoluto/bazo
7,00E+05
6,00E+05
5,00E+05
4,00E+05
3,00E+05
2,00E+05
1,00E+05
0,00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Días
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Células B foliculares activadas
n.º de células absoluto/bazo
1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Días
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Células B de transición 3 activadas
n.º de células absoluto/bazo
2.50E+05
2.00E+05
1.50E+05
1.00E+05
5.00E+04
0.00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Días
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX

FIG. 22


Células T auxiliares activadas
n.º de células absoluto/bazo
1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Días
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Células T citotóxicas activadas
n.º de células absoluto/bazo
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Días
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX
Células T reguladoras activadas
n.º de células absoluto/bazo
2,50E+05
2,00E+05
1,50E+05
1,00E+05
5,00E+04
0,00E+00
4 5 6 7 8 11 12 13 14 15
Días
rhGAA
rhGAA+MTX
rhGAA+MTX

# ASSIGNMENT

WHEREAS, we:

(1) Alexandra Joseph,

(2) Susan Richards,

(3) Melanie Ruzek, and

(4) Richard Garman

residing, respectively, at

(1) 2 Berwick Road
Lexington, MA 02420, USA;

(2) 44 Codman Drive
Sudbury, MA 01776, USA;

(3) 3 Maddy Lane
Acton, MA 01720, USA; and

(4) 1 Joshua Path
Natick, MA 01760, USA

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to GENZYME CORPORATION, a corporation organized and existing under the laws of the Commonwealth of Massachusetts having an office and a place of business at 500 Kendall Square, Cambridge, MA 02142, USA, its successors and assigns: (1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all our inventions and discoveries disclosed in a Provisional Application for Patent entitled: "INDUCTION OF IMMUNE TOLERANCE BY USING METHOTREXATE", and filed in the United States Patent and Trademark Office on May 16, 2011, under Provisional Application Number 61/486,697, including any patent applications claiming priority therefrom, any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor; (2) the full and complete right to file patent applications in the name of GENZYME CORPORATION, its designee, or in our names at GENZYME CORPORATION or its designee's election, on the

aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world; (3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and (4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to GENZYME CORPORATION as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We agree, at any time, upon the request of GENZYME CORPORATION to execute and to deliver to GENZYME CORPORATION any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

We further agree at any time to execute and to deliver upon request of GENZYME CORPORATION such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of GENZYME CORPORATION under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNOR:

Alexandra Joseph (1)

On this 12 day of October, 2011, Alexandra Joseph (1) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of Massachusetts, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

LISA M. WOOD
Notary Public
Massachusetts
Commission Expires Jun 8, 2018

Notary Public

ASSIGNOR:

Susan Richards (2)

On this 12 day of October, 2011, Susan Richards (2) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of Massachusetts, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

LISA M. WOOD
Notary Public
Massachusetts
Commission Expires Jun 8, 2018

Notary Public

ASSIGNOR:

Melanie Ruzek (3)

On this _____ day of _____, 2011, Melanie Ruzek (3) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of _____, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

ASSIGNOR:

Alexandra Joseph (1)

On this _____ day of _____, 2011, Alexandra Joseph (1) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of _____, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public

ASSIGNOR:

Susan Richards (2)

On this 22 day of _____, 2011, Susan Richards (2) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of _____, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public

ASSIGNOR:

Melanie Ruzek (3)

On this 22 day of October, 2011, Melanie Ruzek (3) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of Massachusetts, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

ROY D. AUGER
NOTARY PUBLIC
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
MY COMMISSION EXPIRES SEPT 17, 2015

Notary Public

Notary Public

ASSIGNOR:

Richard Garman (4)

On this 21st day of October, 2011, Richard Garman (4) personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of Massachusetts, and executed the foregoing Assignment and duly acknowledged to me that such Assignment was executed for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public

ANDRES F. GOMEZ
MY COMMISSION EXPIRES MARCH 30, 2016
NOTARY PUBLIC COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS

ACKNOWLEDGEMENT OF ASSIGNEE:

I hereby acknowledge the foregoing executed Assignment on behalf of GENZYME CORPORATION

By:
Name: Richard D. Allison
Title: Vice President, Legal

On this 25 day of October, 2011, Richard D. Allison personally appeared before me, a Notary Public in and for the state of Massachusetts, and duly acknowledged the executed Assignment on behalf of the Assignee.

Michele Silver, Notary Public

MICHELE SILVER
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires Mar 15, 2013

# CESIÓN

Por una buena y valiosa consideración, el recibo y suficiencia del presente es reconocida, la persona abajo nombrada (en adelante “EL INVENTOR (ES)”, han vendido, cedido y transferido a la Universidad de Washington, una institución púbica de educación superior, domiciliada en Seattle, Washington, dirección 4311-11 Avenue NE, Suite 500, Seattle, Washington 98105-4608, en adelante “LA CESIONARIA”, para sí misma sucesores y asignatarios, lo siguiente:

1. La totalidad de los derechos a nivel mundial, títulos e intereses, sobre todas las invenciones y mejoras (“MATERIA RECLAMADA”), divulgados en la solicitud provisional radicada bajo 35 U.S.C. 111(b), solicitud no provisional radicada 35 U.S.C. 111(a), solicitud internacional radicada bajo el Tratado de Cooperación en materia de patentes (PCT), o las fases nacionales en los Estados Unidos radicadas bajo 35 U.S.C. 371, titulada “COMPOSICIONES DE NUCLEASA TERAPÉUTICAS Y MÉTODOS” (La SOLICITUD) que:

- Solicitud No. PCT/US2012/0035614, titulada “COMPOSICIONES DE NUCLEASA TERAPÉUTICAS Y MÉTODOS”, radicada el 27 de Abril de 2012, reivindicando prioridad de las solicitudes provisionales en los Estados Unidos Nos. 61/480,961 del 29 de Abril de 2011, y 61/617,241 de 29 de Marzo de 2012.

2. La totalidad de los derechos a nivel mundial, títulos e intereses, sobre (a) LA SOLICITUD; (b) todas aquellas solicitudes que reivindiquen prioridad de LA SOLICITUD; (c) todos los modelos de utilidad, solicitudes divisionales, continuaciones, sustituciones, renovaciones, re expediciones y otras solicitudes relacionadas con la misma, que hayan sido o sean solicitadas en los Estados Unidos o en cualquier otro lugar del mundo; (d) todas las patentes (incluyendo revisiones y re-examinaciones) que sean concedidas en relación con las solicitudes arriba citadas en los puntos (a), (b) y (c); y; (e) todos los derechos de prioridad derivados de LA SOLICITUD, junto con todos los derechos de indemnización por daños derivados de infracciones de los derechos provisionales.

INVENTOR(ES) está de acuerdo con que la CESIONARIA solicite patentes respecto de la MATERIA RECLAMADA a nombre de esta última.

INVENTOR(ES) está de acuerdo con llevar a cabo lo siguiente, en cualquier momento a solicitud del cesionario, sin consideración adicional alguna, a fin de cumplir con el propósito de la presente cesión (I) llevar a cabo todos los juramentos, otorgar cesiones adicionales, poderes de abogado, solicitudes u otros documentos necesarios o deseables, a fin de garantizar los derechos de la CESIONARIA, los derechos, títulos e intereses aquí convenidos; (2) comunicar a la CESIONARIA, todos los hechos conocidos en torno a la MATERIA RECLAMADA; y (3) en general ejecutar todo tipo de actos que la CESIONARIA considere deseables para asegurar, mantener, y ejercer a nivel mundial protección de la patente relacionada con la MATERIA RECLAMADA, conferir a la CESIONARIA los derechos, títulos e intereses aquí convenidos. INVENTOR(ES) acuerda proveer a cualquier sucesor o asignatario, o representante legal de la CESIONARIA los beneficios y asistencia suministrados a la CESIONARIA por virtud del presente.

Titulo: Composiciones de nucleasa terapéuticas y métodos.

Solicitada: Abril 27 de 2012

Expediente No.PCT/US2012/035614

INVENTOR(ES) afirma que tiene los derechos, títulos e intereses para convenir y celebrar la presente cesión, y conviene con la CESIONARIA que INVENTOR(ES)no ha otorgado ni otorgará ninguna cesión, concesión, hipoteca, licencia y otro gravamen o acuerdo que afecte los derechos, títulos e intereses aquí convenidos.

INVENTOR(ES) otorga al apoderado designado el poder correspondiente a fin de solicitar la inscripción de la presente cesión sin que sea necesaria o deseable identificación adicional alguna a fin de cumplir con las normas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, a fin de inscribir la misma.

La presente cesión deberá ejecutarse en una o más partes, y cada una de ellas deberá tenerse como original y todas estas tomarse conjuntamente como parte de la misma cesión.

Nombre y firma: Fecha de la firma:

[Firma ilegible] _5/7/212 ; 2012

**Jeffrey A. Ledbetter**

ESTADO DE WASHINGTON

CONDADO DE King____

Dado y firmado ante mí este 7 de Julio de 2012

[Firma ilegible]

Nombre: Catherine J. Johnson

Notaria Pública del estado de Washington

Residing at: 11915 263 Ave SE moural, WA

Mi commission expira: 2/28/16

Sello

Catherine J. Johnson

Notaria Pública

Comisión expira 2/28/16

Estado de Washington

Titulo: Composiciones de nucleasa terapéuticas y métodos.

Solicitada: Abril 27 de 2012

Expediente No.PCT/US2012/035614

Nombre y firma: Fecha de la firma:

[Firma ilegible] _Mayo 7 ; 2012

**Martha Hayden-Ledbetter**

ESTADO DE WASHINGTON

CONDADO DE King

Dado y firmado ante mí este 7 de Julio de 2012

[Firma ilegible]

Nombre: Catherine J. Johnson

Notaria Pública del estado de Washington

Residing at: 11915 263 Ave SE moural, WA

Mi commission expira: 2/28/16

Sello

Catherine J. Johnson

Notaria Pública

Comisión expira 2/28/16

Estado de Washington

Titulo: Composiciones de nucleasa terapéuticas y métodos.

Solicitada: Abril 27 de 2012

Expediente No.PCT/US2012/035614

Nombre y firma: Fecha de la firma:

[Firma ilegible] 5. 7 ; 2012

**Keith Elkon**

ESTADO DE WASHINGTON

CONDADO DE King

Dado y firmado ante mí este 7 de Julio de 2012

[Firma ilegible]

Nombre: Catherine J. Johnson

Notaria Pública del estado de Washington

Residing at: 11915 263 Ave SE moural, WA

Mi commission expira: 2/28/16

Sello

Catherine J. Johnson

Notaria Pública

Comisión expira 2/28/16

Estado de Washington

Titulo: Composiciones de nucleasa terapéuticas y métodos.

Solicitada: Abril 27 de 2012

Expediente No.PCT/US2012/035614

Nombre y firma: Fecha de la firma:

[Firma ilegible] 5. 7 ; 2012

**Xizhang Sun**

ESTADO DE WASHINGTON

CONDADO DE King

Dado y firmado ante mí este 7 de Julio de 2012

[Firma ilegible]

Nombre: Catherine J. Johnson

Notaria Pública del estado de Washington

Residing at: 11915 263 Ave SE moural, WA

Mi commission expira: 2/28/16

Sello

Catherine J. Johnson

Notaria Pública

Comisión expira 2/28/16

Estado de Washington

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
22 November 2012 (22.11.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/158362 A1

(51) International Patent Classification:
*A61K 31/519* (2006.01) *A61K 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/036405

(22) International Filing Date:
3 May 2012 (03.05.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/486,697 16 May 2011 (16.05.2011) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENZYME CORPORATION** [US/US]; 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **JOSEPH, Alexandra** [US/US]; 2 Berwick Road, Lexington, MA 02420 (US). **RICHARDS, Susan** [US/US]; 44 Codman Drive, Sudbury, MA 01776 (US). **RUZEK, Melanie** [US/US]; 3 Maddy Lane, Acton, MA 01720 (US). **GARMAN, Richard** [US/US]; 1 Joshua Path, Natick, MA 01760 (US).

(74) Agents: **GUNNISON, Jane T.** et al.; Ropes & Gray LLP, 1211 Avenue Of The Americas, New York, NY 10036 (US).

(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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, 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))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

WO 2012/158362 A1

(54) Title: INDUCTION OF IMMUNE TOLERANCE BY USING METHOTREXATE

(57) Abstract: The invention provides methods for reducing undesired immune responses, such as anti- drug antibody (ADA) responses and other T- and/or B-cell-mediated immune responses, in patients by using treatment with methotrexate.

# COLOMBIA

## PODER

El (los) GENZYME CORPORATION

Domiciliados en 500 Kendall Street, Cambridge,
Massachusetts 02142, ESTADOS UNIDOS

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de ~~patentes de invención~~, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas de certificación o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
~~b) Para la obtención de protección de variedades vegetales~~
~~c) Para la obtención de registros sanitarios~~;
d) Para la obtención de registros de derechos de autor.
e) Para obtener registros y transferencias de nombres de dominio
f) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 13 de mayo de 2013

en Antony

por Catherine GUILLES-FORT
Proxy Holder

## POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned GENZYME CORPORATION

Of 500 Kendall Kendall Street
Cambridge, Massachusetts 02142
United States

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of ~~patents~~, models and designs, registration of trademarks, service, collective, certification and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
~~b) For the obtainment of plant variety protection~~
~~c) For the obtainment of Sanitary registrations~~;
d) For the obtainment of copyright registrations
e) For domain name registrations and assignment
f) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 13th day of May 2013

in Antony

by Catherine GILLES-FORT
Proxy Holder

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1 ) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

## RESUMEN

La invención proporciona métodos para reducir las respuestas inmunológicas no deseadas, tales como las respuestas de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y otras respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o B, en pacientes, utilizando un tratamiento con metotrexato.

# INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA UTILIZANDO METOTREXATO

## REFERENCIA CRUZADA A OTRAS SOLICITUDES

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EEUU n.º 61/486.697, presentada el 16 de mayo, 2011, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere, en general, a la inmunología, y más en concreto al uso del metotrexato para reducir las respuestas inmunológicas no deseadas en pacientes.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En la actualidad, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado más de 130 productos terapéuticos de proteínas para un uso clínico (Leader *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov., **7**(1):21-39 (2008)). Estos productos terapéuticos incluyen péptidos, proteínas humanas recombinantes, vacunas de proteínas, preparaciones de anticuerpos policlonales derivadas de una diversidad de especies animales, y anticuerpos monoclonales. Dependiendo de su secuencia y homología conformacional con autoantígenos endógenos, estado de glicosilación, nivel de dosis, vía de administración, localización, y características relacionadas con el proceso de fabricación, las proteínas terapéuticas pueden provocar respuestas de anticuerpos en el paciente (Schellekens, Nat. Rev. Drug Discov., 1(6):457-462 (2002); Zinkernagel, Semin. Immunol., 12(3):163-171 (2000), análisis 257-344; Thorland *et al.*, Haemophilia, 5(2):101-105 (1999); Goodeve, Blood Coagul. Fibrinolysis, 14, supl. 1:S17-21 (2003)). Estas respuestas, denominadas respuestas de anticuerpos anti-fármacos (ADA), pueden a veces afectar a la seguridad del paciente y a la eficacia del fármaco.

En el caso del trastorno de almacenamiento lisosómico, la enfermedad de Pompe, pueden desarrollarse ADA en la terapia de sustitución enzimática (ERT) contra la alfa-glucosidasa ácida humana recombinante. En pacientes que no expresan cantidades mensurables de la enzima endógena, unos niveles

sostenidos de alta titulación de anticuerpos se correlacionan con el deterior del paciente (pacientes con CRIM-Pompe) (Kishnani *et al.*, Mol. Genet. Metab., 99(1):26-33 (2010); Hunley *et al.*, Pediatrics, 114(4):e532-535 (2004); Amalfitano *et al.*, Genet. Med., 3(2):132-138 (2001)). Se ha observado un compromiso similar en la seguridad y eficacia del fármaco en pacientes con hemofilia que desarrollan ADA contra el factor IX (Thorland *et al.*, Haemophilia, 5(2):101-105 (1999); Ewenstein *et al.*, Blood, 89(3):1115-1116 (1997)). En casos poco frecuentes, ADA también puede inducir una enfermedad autoinmunológica, como en el caso de la eritropoyetina humana recombinante (Schellekens, Clin. Ther., 24(11):1720-1740 (2002), análisis 1719; Locatelli *et al.*, Perit. Dial. Int., 27, supl. 2:S303-307 (2007)).

Las respuestas de ADA también pueden producirse con anticuerpos terapéuticos, independientemente de que el producto terapéutico no se derive de un ser humano, esté humanizado o incluso sea totalmente humano. La inmunogenicidad de los productos terapéuticos de anticuerpos monoclonales y policlonales puede influir en la seguridad del paciente y la eficacia del fármaco. Los anticuerpos que se desarrollan contra anticuerpos monoclonales terapéuticos, tales como infliximab, adalimumab, rituximab y natalizumab, se han asociado con unos menores niveles séricos y eficacia de los anticuerpos terapéuticos (Bendtzen *et al.*, Arthritis Rheum., 54(12):3782-3789 (2006); Schmidt *et al.*, Clin. Immunol., 132(3):334-341 (2009); Bartelds *et al.*, Ann. Rheum. Dis., 66(7):921-926 (2007); Baert *et al.*, N. Engl. J. Med., 348(7):601-608 (2003); Tahir *et al.*, Rheumatology (Oxford), 44(4):561-562 (2005); Maini *et al.*, Arthritis Rheum., 41(9):1552-1563 (1998)). Se han asociado reacciones alérgicas con anticuerpos anti-infliximab (Baert *et al.*, N. Engl. J. Med., 348(7):601-608 (2003)). Se han observado reacciones de hipersensibilidad relacionadas con la infusión en un pequeño porcentaje de pacientes con esclerosis múltiples en remisión-recaída tratados con natalizumab (Phillips *et al.*, Neurology, 67(9):1717-1718 (2006)).

El alemtuzumab es otro producto terapéutico de anticuerpos que puede generar ADA en pacientes con esclerosis múltiples en remisión-recaída (Coles *et al.*, N. Engl. J. Med., 2008, 359(17):1786-17801 (2008)). El alemtuzumab es un

anticuerpo monoclonal que disminuye el número de linfocitos que interacciona con CD52, un antígeno de la superficie celular expresado sobre células inmunológicas. El alemtuzumab está en ensayos clínicos de etapa tardía para tratar la esclerosis múltiples en remisión-recaída y también se ha evaluado en la artritis reumatoide. Un grupo de investigadores han demostrado que se desarrollan anticuerpos anti-alemtuzumab en 63% de los pacientes con artritis reumatoide tratados en un estudio de aumento de dosis única (Weinblatt *et al.*, Arthritis Rheum., 1995, 38(11):1589-1594 (1995)). En este estudio, la eficacia del alemtuzumab parece verse alterada por la presencia de ADA (*Id.*).

El anticuerpo policlonal terapéutico Thymoglobulin® también está asociado con ADA perjudicial en un pequeño subconjunto de pacientes. Se ha observado enfermedad del suero, insuficiencia renal aguda y reacciones cardiovasculares en receptores de transplantes tratados con Thymoglobulin® (Boothpur *et al.*, Am. J. Kidney Dis., 55(1):141-143 (2009); Lundquist *et al.*, Liver Transpl., 13(5):647-650 (2007); Busani *et al.*, Minerva Anestesiol., 72(4):243-248 (2006); Tanriover *et al.*, Transplantation, 80(2):279-281 (2005); Buchler *et al.*, Clin. Transplant., 17(6):539-545 (2003)).

Las investigaciones han intentado descubrir vías para minizar los efectos perjudiciales de ADA. Las herramientas que se han ensayado para determinar su capacidad para inducir inmunotolerancia y reducir las ADA en terapias con proteínas incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 que no provocan disminución (Cobbold *et al.*, Semin. Immunol., 2(6):377-387 (1990); Winsor-Hines *et al.*, J. Immunol., 173(7): 4715-4723 (2004)), mutantes mínimos del alemtuzumab que no se unen a células (Gilliland *et al.*, J. Immunol., 162(6):3663-3671 (1999); Somerfield *et al.*, J. Immunol., 185(1):763-768 (2010)), terapias inmunosupresoras (Bennett *et al.*, Blood, 106(10):3343-3347 (2005); Dickson *et al.*, J. Clin. Invest., 118(8):2868-2876 (2008)), partículas lipídicas que contienen fosfatidilinositol que se unen al factor VIII (Peng *et al.*, AAPS. J., 12(3):473-481 (2010)), y la administración específica del hígado de alfa-glucosidasa ácida recombinantes a través de una infección con virus adenoasociados (Sun *et al.*, Am. J. Human Genet., 81(5):1042-1049 (2007); Sun *et al.*, Mol. Ther., 18(2):353-360 (2009); Ziegler *et al.*, Hum. Gene Ther., 19(6):609-621 (2008)). Sin embargo,

sigue siendo necesario desarrollar métodos mejorados para reducir las respuestas de anticuerpos no deseadas en terapias con proteínas y otros escenarios.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un método para inducir tolerancia inmunológica en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo, induciendo con ello una tolerancia inmunológica hacia el producto terapéutico en el sujeto.

La invención también proporciona un método para inhibir las respuestas de anticuerpos contra un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo, inhibiendo con ello las respuestas de anticuerpos contra el producto terapéutico en el sujeto.

La invención también proporciona un método para aliviar una reacción de infusión contra un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aliviando con ello una reacción de infusión contra el producto terapéutico en el sujeto.

La invención también proporciona un método para reducir la autoinmunidad secundaria en un sujeto autoinmune que necesita tratamiento con un producto terapéutico. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, reduciendo con ello la autoinmunidad secundaria en el sujeto.

La invención también proporciona un método para aumentar la eficacia de un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello la eficacia del producto terapéutico de proteínas en el sujeto.

La invención también proporciona un método para aumentar el porcentaje de células T reguladoras en la población de células T en un sujeto tratado con una

terapia de disminución del número de linfocitos, por ejemplo, una terapia con alemtuzumab o una terapia con Thymoglobulin®. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato ciclo, aumentando con ello dicho porcentaje en dicho sujeto.

La invención también proporciona un método para aumentar el porcentaje de células B reguladoras en la población de células B en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico de proteínas, tal como un producto terapéutico de anticuerpos. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello dicho porcentaje en dicho sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo. En realizaciones relacionadas, la invención proporciona un método para aumentar las células B que expresan TGF-beta, IL-10 y/o FoxP3 en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico de proteínas, que comprende administrar una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo.

La invención también proporciona un método para prolongar la farmacocinética de un agente treapéutico en un sujeto. En este método, se administra metotrexato al sujeto, antes, durante o después de la administración del agente terapéutico, en una cantidad eficaz para prolongar la farmacocinética del agente terapéutico.

La invención también proporciona un método para disminuir el número de linfocitos en un paciente humano que lo necesite. En este método, se trata al paciente con un agente de disminución de linfocitos y se administra metotrexato al paciente, antes, durante o después del tratamiento con el agente de disminución de linfocitos, en una cantidad eficaz para inducir una tolerancia inmunológica en el paciente hacia el agente de disminución de linfocitos, o para reducir la autoinmunidad secundaria. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo. En algunas realizaciones, el agente de disminución de linfocitos puede ser un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab o rituximab). En ciertas realizaciones, el paciente puede ser un paciente con esclerosis múltiple (por ejemplo, un paciente con esclerosis múltiple en remisión-recaída). En algunas

realizaciones, el agente de disminución de linfocitos puede ser un producto terapéutico de anticuerpos policlonales (por ejemplo, un anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos).

La invención también proporciona un método para inducir una tolerancia inmunológica en un sujeto que necesita un transplante de tejidos. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, induciendo con ello una tolerancia inmunológica hacia el tejido transplantado en el sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo. En algunas realizaciones, el tejido transplantado es tejido renal o tejido cardíaco. En algunas realizaciones, el sujeto también recibe un agente para la inmunomodulación (por ejemplo, un inmunosupresor), tal como un anticuerpo de globulina anti-timocitos policlonal.

La invención también proporciona un método para inhibir las respuestas de células T en un sujeto que necesita un producto terapéutico o un transplante de tejidos. En este método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato antes, al mismo tiempo o después de tratar al sujeto con el producto terapéutico o del transplante de tejidos, inhibiendo con ello las respuestas de células T en el sujeto.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el producto terapéutico es una producto terapéutico de proteínas.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el producto terapéutico es una producto terapéutico de anticuerpos. Por ejemplo, el producto terapéutico de anticuerpos puede ser un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales y/o un agente de disminución de linfocitos (por ejemplo, alemtuzumab), o un producto terapéutico de anticuerpos policlonales (por ejemplo, un anticuerpo de globulina anti-timocitos de conejo policlonal. En otras realizaciones en las que el producto terapéutico de anticuerpos es alemtuzumab, el sujeto puede ser un paciente con esclerosis múltiple. En otras realizaciones en las que el producto terapéutico de anticuerpos es un anticuerpo de globulina anti-timocitos de conejo policlonal, el sujeto puede ser un paciente humano que necesita un transplante de órganos, tiene anemia aplásica y/o presenta o está en riesgo de presentar

una enfermedad del injerto frente al receptor. En otras realizaciones de los métodos de la invención, el producto terapéutico es una enzima. Por ejemplo, la enzima puede ser la alfa-galactosidasa A humana o la alfa-glucosidasa ácida humana.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el sujeto es un ser humano.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, la cantidad eficaz de metotrexato puede ser de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg. En algunas realizaciones, el único ciclo de metotrexato puede consister en un día de administración de metotrexato, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 días consecutivos de administración de metotrexato. En algunas realizaciones, el único ciclo de metotrexato puede administrarse entre 48 horas antes y 48 horas después del inicio del tratamiento terapéutico.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En cada una de las figuras descritas a continuación, los asteriscos o estrellas indican mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$; **, $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Las figuras 1A-B muestran las respuestas de IgG anti-conejo a uno o múltiples tratamientos con mATG, un anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos murinos de conejo. Se midió la media de las titulaciones de IgG anti-conejo, y se emplearon ratones tratados solo con IgG de conejo (rbIgG) como control. La figura 1A muestra las respuestas a un único tratamiento con mATG a lo largo de un periodo de 8 semanas. La figura 1B muestra las respuestas a múltiples tratamientos con mATG a lo largo de un periodo de 20 semanas. Las flechas indican el momento del tiempo en el que se administra mATG o rbIgG.

La figura 2 muestra la media de las titulaciones de IgG específica de alemtuzumab después de cinco tratamientos mensuales con alemtuzumab. Las flechas indican el momento del tiempo en el que se administra alemtuzumab.

La figura 3 muestra la supresión de las respuestas de IgG anti-mATG por el

metotrexato (MTX) después de un único tratamiento con mATG. Los ratones se trataron solo con mATG, solo con rbIgG, o con mATG y metotrexato.

Las figuras 4A-C muestran los efectos del metotrexato sobre las respuestas de IgG anti-conejo a lo largo del desarrollo de cinco tratamientos mensuales con mATG. Las flechas indican los momentos del tiempo en que se administran mATG o metotrexato. La figura 4A demuestra que tres ciclos de metotrexato reducen significativamente la media de las titulaciones de IgG anti-conejo. La figura 4B demuestra que un único tratramiento con metotrexato reduce significativamente la media de las titulaciones de IgG anti-conejo. La figura 4C compara la media de las titulaciones de IgG anti-conejo de ratones tratados con solo con mATG, con mATG y un único ciclo de metotrexato, o con mATG y tres ciclos de metotrexato. Un único ciclo de metotrexato reduce las titulaciones de IgG anti-conejo más significativamente que los tres ciclos de metotrexato.

La figura 5 demuestra que la media de las titulaciones de IgG anti-conejo se reduce después de una reexposición a mATG en ratones tratados con metotrexato (uno y múltiples ciclos de metotrexato), comparado con ratones tratados con mATG pero no con metotrexato. Las flechas indican el momento del tiempo en que se administra mATG o metotrexato.

La figura 6 demuestra que la media de las titulaciones de IgG anti-conejo en ratones tratados con mATG y un único ciclo de metotrexato es 100 veces menor que en ratones tratados solo con mATG. Las flechas indican el momento del tiempo en que se administra mATG o metotrexato.

Las figuras 7A-C demuestran que el metotrexato puede reducir la media de las titulaciones de IgG anti-alemtuzumab en ratones Tg huC52. Figura 7A: las titulaciones anti-alemtuzumab son menores en ratones tratados con un único ciclo de 1 mg/kg o 5 mg/kg de metotrexato que en ratones tratados con 0,5 mg/kg o sin metotrexato. Los ratones se trataron solo con alemtuzumab, o con alemtuzumab y un único ciclo de metotrexato a 0,5 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg. Figura 7B: diseño de estudio para ensayar las titulaciones anti-alemtuzumab. Los datos de la titulación se determinaron a las 24 horas después de la quinta dosis de alemtuzumab, según indica la estrella. Figura 7C: el metotrexato reduce las

titulaciones de anticuerpos anti-alemtuzumab en ratones que reciben alemtuzumab y metotrexato, comparado con ratones que solo reciben alemtuzumab, 24 horas después de la quinta dosis de alemtuzumab.

Las figuras 8A-D muestran el número de células absoluto/μl de sangre completa de células T en circulación en ratones tratados con cinco dosis diarias de alemtuzumab 0,5 mg/kg o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). La figura 8A demuestra que las células T totales ($CD3^+$) se redujeron dos, tres y cuatro semanas después del tratamiento. La figura 8B demuestra que las células B totales ($CD19^+$) se redujeron tres semanas después del tratamiento. La figura 8C demuestra que las células T auxiliares ($CD4^+$) se redujeron a las dos, tres y cuatro semanas después del tratamiento, y la figura 8C demuestra que las células T citotóxicas ($CD8^+$) se redujeron a las dos, tres y cuatro semanas después del tratamiento.

Las figuras 9A-B muestran las respuestas de IgG específicas del alemtuzumab. La figura 9A muestra las respuestas tras tres ciclos de tratamiento con alemtuzumab a 0,5 mg/kg, y un ciclo de tratamento con metotrexato a 0,5 mg/kg, 1 mg/kg o 2 mg/kg. El primer ciclo de tratamiento con alemtuzumab consiste en cinco días consecutivos de dosificación, y el segundo y tercer ciclo consisten cada uno en tres días consecutivos de dosificación. La figura 9B muestra las titulaciones de IgG anti-alemtuzumab de cada animal por grupo en la semana 14.

La figura 10 demuestra que un único ciclo de 5 mg/kg de metotrexato restablece los niveles de mATG en la circulación en ratones tratados con cinco dosis mensuales de mATG.

La figura 11 demuestra que los ratones tratados con cinco tratamientos mensuales de mATG y un único ciclo de metotrexato tienen una mayor disminución de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ mediada por mATG en la sangre después de la quinta dosis de mATG. Estos datos se reúnen de dos experimentos.

Las figuras 12A-B demuestran que los ratones tratados con un único ciclo de metotrexato muestran unos mayores porcentaje de células T reguladoras ($CD25^+Foxp3^+$) después del quinto tratamiento mensual con mATG. Los ratones

se trataron con cinco tratamientos mensuales de mATG solo, o con cinco tratamientos mensuales de mATG y un único ciclo de metotrexato, o con cinco tratamientos mensuales de mATG y tres ciclos de metotrexato. La figura 12A muestra los niveles de células T reguladoras en el bazo. La figura 12B muestra los niveles de células T reguladoras en la sangre.

La figura 13A demuestra que una titulación de IgG anti-conejo mayor que 10.000 puede interferir con la farmacocinética de mATG. La figura 13B demuestra que una titulación anti-conejo mayor que 100.000 puede interferir con la disminución de células CD4 y CD8. El porcentaje de control de pretratamiento se refiere al porcentaje de titulaciones de CD4 y CD8 con relación a sus niveles respectivos antes del tratamiento con mATG.

La figura 14 demuestra que los ratones tratados con 5 mg/kg de metotrexato muestran una mayor disminución con alemtuzumab de las células T $CD3^+$ y células B $CD19^+$ en la circulación después de la quinta dosis mensual de alemtuzumab. Los ratones se trataron con alemtuzumab solo, o con alemtuzumab y un único ciclo de metotrexato durante los tres primeros días del estudio. Los asteriscos indican las mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$).

La figura 15A demuestra que un único ciclo de metotrexato puede reducir las titulaciones de IgG específica de alfa-glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) a lo largo del tratamiento, e incluso cuatro semanas después del último tratamiento con rhGAA, en un estudio de 16 semanas. Las flechas indican los momentos del tiempo en que se administró rhGAA y metotrexato. Los ratones se trataron con rhGAA solo, o con rhGAA y un único ciclo de metotrexato, o con rhGAA y tres ciclos de metotrexato. La figura 15B demuestra que, en un estudio de seis semanas, un único ciclo de metotrexato reduce las titulaciones de IgG específica de rhGAA. La figura 15C demuestra que un único ciclo de metotrexato reduce las titulaciones de IgG específica de rhGAA en un estudio de 18 semanas.

La figura 16A demuestra que el metotrexato disminuye las titulaciones de IgG anti-conejo en un modelo de transplante de corazón alogeneico murino cuando

se administra con mATG, comparado con mATG solo. La figura 16B demuestra que el metotrexato aumenta los niveles en la circulación de mATG en un modelo de transplante de corazón alogeneico murino. Los ratones se trataron con disolución salina, mATG solo, o mATG y un único ciclo de metotrexato. El mATG se administró a 20 mg/kg en los días 0 y 4 del estudio, mientras que se administró metotrexato 2 mg/kg en los días 0-6 del estudio.

La figura 17 muestra un diagrama de Kaplan-Meier que indica que un tratamiento combinado de mATG y metotrexato prolonga la supervivencia de corazones alogeneicos transplantados en ratones receptores. Los ratones no se trataron, o se trataron con 20 mg/kg de mATG solo en los días 0 y 4 del estudio, o con 2 mg/kg de metotrexato solo en los días 0-6 del estudio, o con mATG y 2 mg/kg de metotrexato en los días 0-6, o con mATG y 0,5 mg/kg de metotrexato en los días 0-6 o los días 0-11.

La figura 18 demuestra que los ratones con un corazón alogeneico transplantado tratados con metotrexato solo o con metotrexato en combinación con mATG muestran una reducción en las respuestas de anticuerpos anti-aloinjerto. La figura 18A muestra la unión de IgG del receptor a los fibroblastos alogeneicos en el día 21. La figura 18B muestra los niveles de aloanticuerpos en el día 21 en ratones con transplantes singeneicos (Syn Tx) o un transplante alogeneico (Allo Tx) con los tratamientos indicados. Se muestra la unión de la IgG sérica de ratón receptor individual a los fibroblastos alogeneicos y se expresa como la proporción de la intensidad de fluorescencia media (MFI) a los fibroblastos no teñidos. La figura 18C muestra los niveles de aloanticuerpos en el día 21 en ratones que no recibieron tratamiento, recibieron mATG, metotrexato, o mATG y metotrexato. Los niveles de aloanticuerpos fueron significativamente menores en los ratones tratados con metotrexato o mATG y metotrexato ($p = 0,0008$ y $p < 0,0001$, respectivamente.

La figura 19 demuestra que las células B reguladoras B10 aumentan significativamente después de un tratamiento con metotrexato. Los ratones se trataron con rhGAA solo o con rhGAA y un único ciclo de tres días de metotrexato o disolución salina. El número de células se contó en el día 7 y el

día 8 del estudio.

La figura 20 demuestra que las subpoblaciones de células B activadas aumentan significativamente en el día 6 después de un tratamiento con rhGAA y un único ciclo de tres días de metotrexato, comparado con un tratamiento solo con rhGAA. El número absoluto de células B de transición 2 CD86+, de células B de transición 3 CD86+, de células B foliculares CD86+, y de células B de la zona marginal CD86+ se contó en el día 6 del estudio. Los asteriscos indican las mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$).

La figura 21 demuestra que, para subpoblaciones de células B esplénicas activadas, tales como células B de la zona marginal activadas, células B foliculares activadas, y células B de transición 3 activadas, el número de células permanece potenciado incluso después de un tratamiento con rhGAA y metotrexato, comparado con el tratamiento solo con rhGAA. Las flechas representan el tratamiento con rhGAA y metotrexato. El rhGAA se administró en el día 1 y el día 8. El metotrexato se administró en los días 1, 2 y 3, y en los días 8, 9 y 10. Las diferencias significativas se representan mediante estrellas (*, $p < 0,05$). No se muestran los datos para los días 8 y 9 (indicados por líneas punteadas verticales).

La figura 22 demuestra que las poblaciones de células T esplénicas activadas, tales como células T auxiliares activadas, células T citotóxicas activadas, y células T reguladoras activadas, permanecen en gran medida sin cambios tras un tratamiento con rhGAA y metotrexato, comparado con un tratamiento solo con rhGAA. Las flechas representan el tratamiento con rhGAA y metotrexato. El rhGAA se administró en el día 1 y el día 8. El metotrexato se administró en los días 1, 2 y 3, y en los días 8, 9 y 10. Las diferencias significativas se representan mediante estrellas (*, $p < 0,05$). No se muestran los datos para los días 8 y 9 (indicados por líneas punteadas verticales).

La figura 23 muestra un diseño de estudio de seis meses para estudiar el tratamiento con metotrexato en combinación con mATG. Las flechas negras representan inyecciones de mATG 5 mg/kg, las flechas de líneas discontinuas

representan inyecciones de metotrexato5 mg/kg, y las flechas de líneas punteadas representan los sacrificios terminales.

Las figuras 24A-B demuestran que un único ciclo de metotrexato en conexión con mATG enriquece en células B esplénicas, comparado con mATG solo o tres ciclos de metotrexato. Figura 24A: células B foliculares activadas; figura 24B: células B de transición 3 activadas.

Las figuras 25A-B muestran los efectos del metotrexato sobre la farmacodinámica del alemtuzumab en la sangre. Los ratones se trataron con 0,5 mg/kg de alemtuzumab durante cinco meses, con o sin tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato en conexión con la primera administración de alemtuzumab. Figura 25A: el metotrexato potencia la disminución de las células T ($CD3^+$), células T auxiliares ($CD4^+$) y células T reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) totales por el alemtuzumab (AZM). Las barras negras representan las mediciones en ratones tratados solo con alemtuzumab, mientras que las barras blancas representas las mediciones en ratones tratados con alemtuzumab y metotrexato. Figura 25B: el metotrexato potencia la disminución de las células B por el alemtuzumab. Las estrellas indican las mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$).

La figura 26 muestra los efectos del metotrexato sobre la farmacodinámica del alemtuzumab en el bazo. Los ratones se trataron con 0,5 mg/kg de alemtuzumab durante cinco meses, con o sin tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato en conexión con la primera administración de alemtuzumab. Las células T disminuyeron después del quinto tratamiento con alemtuzumab. CD8 CEN: células T de memoria centrales $CD8^+$; CD8 EFF MEM: células T de memoria efectoras $CD8^+$; CD4 CEN MEM: células T de memoria centrales $CD4^+$; CD4 EFF MEM: células T de memoria efectoras $CD4^+$. Las estrellas indican las mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$).

Las figuras 27A-B muestran los efectos del metotrexato sobre el número de células B en el bazo. Los ratones se trataron con 0,5 mg/kg de alemtuzumab durante cinco meses, con o sin tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato en conexión con la primera administración de alemtuzumab. Las estrellas indican

las mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$).

Las figuras 28A-B muestran la disminución de los linfocitos esplénicos tres días después de una única dosis de alemtuzumab. Figura 28A: las células T y las células B han disminuido significativamente. Los cuadrados pequeños representan los ratones control tratados con PBS, y los cuadrados grandes representan los ratones tratados con alemtuzumab. Figura 28B: las células B ($CD19^+$) disminuyen en 92% a las 24 horas después del tratamiento, y permanecen disminuidas al 36% tres días después del tratamiento. Las tres gráficas representan diferentes grupos de animales, cada uno de los cuales se sangró en diferentes momentos. Las estrellas indican las mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$; **, $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Las figuras 29A-B muestran los efectos del metotrexato sobre los niveles de citoquinas. La figura 29A muestra un diseño de estudio para un estudio de seis meses para evaluar los niveles de citoquinas en el bazo y los nódulos linfáticos. La estrella indica que los datos se recogieron 24 horas después del quinto tratamiento con alemtuzumab. Las flechas indican los momentos en que se administra el alemtuzumab o el metotrexato, o se realizaron los sacrificios terminales, según se indica. La figura 29B muestra los niveles de factor activador de células B que pertenecen a la familia del TNF (BAFF) en ratones tratados con alemtuzumab solo o con alemtuzumab y metotrexato.

Las figuras 30A-B muestran los niveles de citoquinas después de un tratamiento con alemtuzumab y metotrexato. La figura 30A muestra un diseño de estudio para un estudio de cuatro meses. La estrella indica que los datos se recogieron una semana después del segundo ciclo de metotrexato. Las flechas indican los momentos en que se administra el alemtuzumab o el metotrexato, o se realizaron los sacrificios terminales, según se indica. La figura 30B muestra los niveles de diversas citoquinas en ratones tratados con alemtuzumab (AZM) solo o con 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg o 2,0 mg/kg de metotrexato.

La figura 31 muestra los efectos del metotrexato sobre las titulaciones de anti-rhGAA en ratones IL10 -/- (inactivados) y C57BL/6. Se administraron 20 mg/kg

de rhGAA semanalmente durante nueve semanas en los ratones inactivados IL10 -/- y ratones C57BL/6 de tipo salvaje, con o sin 5 mg/kg/día de metotrexato a las 0, 24 y 48 horas después del primer tratamiento de tres semanas de rhGAA.

La figura 32 demuestra que algunas, pero no todas, las poblaciones de células B esplénicas disminuyen a la primera y/o segunda semana después de un tratamiento con alemtuzumab. Las barras con cuadrados pequeños representan ratones control transgénicos huCD52 tratados con disolución salina tamponada con fosfato (PBS); las barras con cuadrados grandes representan ratones transgénicos huCD52 tratados con 0,5 mg/kg de alemtuzumab durante cinco días consecutivos. Los asteriscos indican mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$; **, $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

La figura 33 muestra un diseño de estudio para estudiar los efectos del metotrexato sobre las poblaciones de células B en el contexto de un tratamiento con alemtuzumab. Se emplearon tiroides y nódulos linfáticos (LN) para la evaluación patológica. Las flechas indican los momentos en que se administra el alemtuzumab y el metotrexato, o se realizaron los sacrificios terminales, según se indica.

La figura 34 muestra los efectos de tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato solo, 0,5 mg/kg de alemtuzumab solo, y 0,5 mg/kg de alemtuzumab y 5 mg/kg/día de metotrexato en combinación con la disminución de las poblaciones de células B. Los asteriscos indican mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$; **, $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

La figura 35 muestra los efectos del metotrexato sobre la disminución de células B después de cinco ciclos de tratamiento con 0,5 mg/kg de alemtuzumab solo o tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato solo o 0,5 mg/kg de alemtuzumab y 5 mg/kg/día de metotrexato en combinación. Los asteriscos indican mediciones con diferencias estadísticamente significativas (*, $p < 0,05$).

La figura 36 demuestra que los niveles de las citoquinas MCP-1, IL-13, IL-6 e IL-12 disminuyen en ratones tratados con un único ciclo de tres días de 5 mg/kg de

metotrexato administrado en el primer día del tratamiento con alemtuzumab. Los datos se recogieron 24 horas después de la quinta dosis de alemtuzumab, cuatro meses después del tratamiento con metotrexato.

Las figuras 37A-B muestran las titulaciones de rhGAA en las semanas 2, 6 y 12 en ratones atímicos nu/nu. La figura 37A muestra las titulaciones de rhGAA en las semanas 2 y 6. De izquiera a derecha, las mediciones de la semana 2 en ratones control tratados con disolución salina, ratones tratados con rhGAA, y ratones tratados con rhGAA y metotrexato, seguido de las mediciones en la semana 6 en ratones control tratados con disolución salina, ratones tratados con rhGAA, y ratones tratados con rhGAA y metotrexato. La figura 37B muestra las mediciones en la semana 12 en, de izquierda a derecha, ratones nu/nu tratados con rhGAA solo (Myo), ratones nu/nu tratados con metotrexato y rhGAA, ratones BL6 tratados con rhGAA solo, y BL6 tratados con metotrexato y rhGAA.

Las figuras 38A-B demuestran que el número y el porcentaje de células B B10 que expresan IL-10 aumentan en ratones tolerizados a rhGAA con metotrexato. Las células B B10 aisladas de animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato fueron evaluados para la expresión de proteínas de IL-10 mediante citometría de flujo.

Las figuras 39A-B demuestran que IL-10 es expresada en células B B10 activadas (CD86+) y no activadas (CD86-). La figura 30A muestra un diagrama de FACS de células B B10 teñidas con CD86, mientras que la figura 39B muestra el número de células B B10 $CD86^{+}IL10^{+}$ y células B B10 $CD86^{-}IL10^{+}$ en respuesta a un tratamiento con rhGAA o rhGAA y metotrexato.

Las figuras 40A-B demuestran que el tratamiento de metotrexato con rhGAA induce a las células B B10 para que aumenten su expresión de TGF-beta. El segundo y tercer panel de la figura 40A son diagramas de FACS que muestran células B B10 teñidas con TGF-beta y CD86 de animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato. El primer panel de la figura 40A muestra el número de células B B10 TGF-$beta^{+}$ en animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato. La figura 40B muestra los recuentos de células B B10 $CD86^{+}$TGF-$beta^{+}$ y células B B10 $CD86^{-}$TGF-$beta^{+}$.

La figura 41A demuestra que las células B B10 parecen expresar FoxP3 en animales tratados con rhGAA (figura 41A). La figura 41B demuestra que el número de células B FoxP3+ aumenta con un tratamiento con metotrexato y rhGAA. La figura 41C muestra que tanto las células B B10 activadas (CD86+) como no activadas (CD86-) expresan FoxP3.

Las figuras 42A-C demuestran que las células B foliculares, de transición 2, y de transición 3 (de arriba abajo) expresan IL-10 y que el número de células de los subconjuntos de células B que expresan IL-10 aumenta con el metotrexato, comparado con ratones tratados con rhGAA solo.

Las figuras 43A-C demuestran que las células B foliculares, de transición 2, y de transición 3 (de arriba abajo) expresan TGF-beta y que el número de células de los subconjuntos de células B que expresan TGF-beta aumenta con el metotrexato, comparado con ratones tratados con rhGAA solo.

Las figuras 44A-C demuestran que las células B foliculares, de transición 2, y de transición 3 (de arriba abajo) expresan FoxP3 y que el número de células de los subconjuntos de células B que expresan FoxP3 aumenta con el metotrexato, comparado con ratones tratados con rhGAA solo.

La figura 45 muestra las titulaciones anti-rhGAA en la semana 6 en animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato, en presencia o ausencia de 5 mg/kg de anticuerpo anti-TGF-beta (1D11, Genzyme) o el control de isotipo (13C4). Las titulaciones de anticuerpos se evaluaron de modo bisemanal en los cuatro grupos diferentes de animales.

Las figuras 46A-C demuestran que el tratamiento con 1D11 interfiere con la expansión inducida por metotrexato de células B B10 que expresan TGF-beta, IL-10 o FoxP3. Se aislaron los bazos de animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato que también fueron coadministrados con 1D11 o 13C4 siete días después de un único tratamiento de rhGAA o un único tratamiento de rhGAA y metotrexato. Las células en cada grupo después se reunieron y se cultivaron durante dos días y después se contaron empleando una citometría de flujo.

Las figuras 47A-C demuestran que el tratamiento con 1D11 interfiere con la expansión inducida por metotrexato de células B foliculares que expresan TGF-beta o IL-10, aunque las células B foliculares FoxP3+ no parecen experimentar los efectos de 1D11. Se aislaron los bazos de animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato que también fueron coadministrados con 1D11 o 13C4 siete días después de un único tratamiento de rhGAA o un único tratamiento de rhGAA y metotrexato. Las células en cada grupo después se reunieron y se cultivaron durante dos días y después se contaron empleando una citometría de flujo.

Las figuras 48A-C demuestran que, en las células B de transición 2, aunque el tratamiento con 1D11 interfiere con la expansión inducida por metotrexato de células B de transición 2 que expresan TGF-beta, no se observaron efectos en las células B de transición 2 IL-10+. Se aislaron los bazos de animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato que también fueron coadministrados con 1D11 o 13C4 siete días después de un único tratamiento de rhGAA o un único tratamiento de rhGAA y metotrexato. Las células en cada grupo después se reunieron y se cultivaron durante dos días y después se contaron empleando una citometría de flujo.

Las figuras 49A-C demuestran que, en las células B de transición 3, aparece TGF-beta, IL-10 y FoxP3 detectables, pero no hay un efecto aparente del tratamiento con 1D11 en las células. Se aislaron los bazos de animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato que también fueron coadministrados con 1D11 o 13C4 siete días después de un único tratamiento de rhGAA o un único tratamiento de rhGAA y metotrexato, y las células se contaron empleando una citometría de flujo.

Las figuras 50A-C demuestran que el tratamiento con 1D11 no afecta a los niveles basales de IL-10, TGF-beta y FoxP3 en células B foliculares, células B de transición 2, y células B de transición 3 (de arriba abajo).

La figura 51A es un esquema que muestra la transferencia de células B esplénicas totales desde un ratón tolerizado a rhGAA (Myozyme® o "MYO") hacia un ratón receptor no expuesto a rhGAA. Después de la transferencia, los

receptores (junto con animales control no transferidos tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato) se trataron semanalmente con 20 mg/kg de rhGAA.

La figura 51B muestra el análisis de las titulaciones que demuestran que las células B esplénicas totales aisladas a partir de animales tratados con rhGAA y un único ciclo de metotrexato pueden transferir tolerancia inmunológica al rhGAA en hospedantes no expuestos.

La figura 52 muestra los recuentos celulares de la sangre o el bazo de ratones normales tratados con IgG de conejo (rbIgG), mATG solo, rbIgG y metotrexato, o mATG y metotrexato. El metotrexato no disminuye las células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+), CD4+, CD8+, o las células B CD19+ totales en animales normales.

La figura 53 muestra los recuentos celulares de la sangre o el bazo de ratones transplantados tratados con rbIgG, mATG solo, rbIgG y metotrexato, o mATG y metotrexato 14 días después del transplante. El metotrexato no disminuye las células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+), CD4+, CD8+, o las células B CD19+ totales en animales transplantados.

La figura 54 demuestra que el tratamiento con metotrexato induce aumentos estadísticamente significativos en IL-10 en múltiples subconjuntos de células, según se observa mediante un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de estas proteínas en animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato.

La figura 55 demuestra que el tratamiento con metotrexato induce aumentos estadísticamente significativos en TGF-beta en múltiples subconjuntos de células, según se observa mediante un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de estas proteínas en animales tratados con rhGAA o con rhGAA y metotrexato.

La figura 56 demuestra que el tratamiento con metotrexato induce aumentos estadísticamente significativos en FoxP3 en múltiples subconjuntos de células, según se observa mediante un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de estas proteínas en animales tratados con rhGAA o con rhGAA y

metotrexato.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los inventores de que un único ciclo o un tratamiento corto de administración de metotrexato reduce las respuestas inmunológicas no deseadas (tales como las respuestas ADA, y otras respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o B no deseadas) en pacientes que reciben productos terapéuticos de proteínas, tales como enzimas de sustitución o anticuerpos terapéuticos, y respuestas de anticuerpos anti-injerto en transplantes de tejidos. Este descubrimiento conduce a nuevos métodos para aumentar la seguridad y la eficacia de terapias de proteínas y transplantes de órganos.

De modo más específico, los estudios de los inventores han demostrado que un único ciclo de metotrexato reduce ADA contra productos terapeúticos de anticuerpos. Tal como se detalla a continuación, un conjunto de estudios se realizó con una versión murina de un producto terapéutico de anticuerpos policlonales, Thymoglobulin®. Thymoglobulin® es un anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos humanos de conejo utilizado para la inmunosupresión en el escenario del transplante de órganos sólidos, la anemia aplásica y en la prevención de la enfermedad del injerto frente al receptor. Se ha desarrollado un anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos murinos de conejo (mATG) . Mantiene características similares a Thymoglobulin® (Ruzek, *et al.*, Transplantation, 88(2):170-179 (2009)). Los inventores han demostrado que un único tratamiento con metotrexato puede reducir las titulaciones de IgG anti-mATG en >95%. De hecho, los inventores han descubierto, de modo sorprendente, que un único ciclo de metotrexato actúa mejor para reducir ADA que tres ciclos de metotrexato. Además, esta reducción en ADA mantiene los niveles de mATG en la circulación y potencia la disminución de células mediada por mATG y los porcentajes de células T reguladoras tras la repetición de la dosificación de mATG. Otro conjunto de estudios se realizó con un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales, alemtuzumab. Los inventores han descubierto que un único tratamento con metotrexato puede controlar, de modo

similar, las respuestas anti-alemtuzumab control y potenciar la disminución de linfocitos mediada por alemtuzumab.

Los inventores han descubierto que este régimen de un solo ciclo de metotrexato también reduce ADA cuando el producto terapéutico de proteínas es una enzima. En dos de los estudios de los inventores, se ha demostrado que un único ciclo de metotrexato puede controlar, de forma eficaz, las respuestas anti-Myozyme® (alfa-glucosidasa ácida humana recombinante o "rhGAA"), cuando originariamente se pensaba que eran necesarios múltiples ciclos para reducir ADA.

Los inventores han descubierto que el metotrexato también es útil en el transplante de órganos. En los estudios de los inventores, se ha descubierto que un único ciclo de metotrexato puede controlar las respuestas de anticuerpos anti-aloinjerto en el transplante de aloinjerto de corazón. Cuando se combina con mATG, la supervivencia de un aloinjerto de corazón es significativamente mayor.

Los estudios de los inventores demuestran que un único ciclo de metotrexato administrado en la primera semana de una terapia de proteínas puede proporcionar una reducción duradera mayor que 95% en ADA a lo largo de muchos meses de dosificación. Esta reducción en las titulaciones de los anticuerpos es duradera, a pesar de la ausencia de metotrexato a lo largo de la mayoría de los estudios. Además, los inventores han descubierto que un único ciclo de metotrexato puede controlar las respuestas anti-aloinjerto (por ejemplo, en un modelo de transplante de corazón alogeneico murino), lo cual demuestra un control sobre las respuestas de anticuerpos dirigidos contra múltiples antígenos de modo simultáneo.

El metotrexato se conoce tradicionalmente como un antagonista de dihidrofolato reductasa que se cree que mata a las células en proliferación inhibiendo el metabolismo de las purinas e interfiriendo con la síntesis de ADN *de novo* (Kremer, Arthritis Rheum., 50(5):1370-1382 (2004)). Puede suponerse con facilidad que el metotrexato simplemente mata a las células reactivas a través de este mecanismo bien descrito, pero esto parece poco probable con el régimen de un único ciclo que los inventores han descubierto. El metotrexato tiene una

semivida corta y no es probable que esté en las células o en la circulación durante un tiempo suficiente para matar activamente a las celulas de tres a cuatro meses después del tratamiento (Walling, Invest. New Drugs, 24(1):37-77 (2006); Slavikova *et al.*, Neoplasma, 25(2):211-216 (1978)). Además, los inventores no han encontrado pruebas de disminución del número de linfocitos tras un tratamiento con metotrexato. En lugar de esto, han descubierto, de modo sorprendente, que un régimen de un único ciclo de metotrexato reduce las respuestas de anticuerpos no deseadas induciendo un mecanismo activo de control inmnológico, no mediante la disminución indiscriminada de linfocitos.

Los estudios de los inventores demuestran que un único ciclo de metotrexato aumenta las células B reguladoras B10, así como las células B de la zona marginal activadas, las células B foliculares activadas y las células B de transición 3 activadas. Los estudios de los inventores demuestran que un único ciclo de metotrexato aumenta el número de células B de transición, de transición 2, foliculares y B10 que expresan IL-10, que expresan TGF-beta y que expresan FoxP3, y que esta expansión es mediada por TGF-beta. Estos estudios también demuestran que el metotrexato aumenta los niveles de expresión de IL-10, TGF-beta y FoxP3. La expansión de las poblaciones de células B esplénicas es sorprendente, dada la actual comprensión del mecanismo de acción del metotrexato, y sugiere que, en este paradigma de dosificación, el metotrexato está actuando de una manera exclusiva, previamente desconocida. Unas dosis bajas y continuas de metotrexato en pacientes con artritis reumatoide tratada con infliximab han demostrado reducir las respuestas de anticuerpos anti-infliximab, pero como la exposición es continua, es más probable que este régimen implique una inmunosupresión constante, en lugar de la inducción de tolerancia. El tratamiento con metotrexato solo ha demostrado reducir la actividad de la enfermedad en la artritis reumatoide cuando se administra semanalmente en dosis bajas. Una publicación reciente sugiere que, tras la administración continua de una dosis baja de metotrexato (en días alternos), aparecen células T reguladoras específicas de autoantígenos, que pueden ayudar a explicar la eficacia del tratamiento con metotrexato en la artritis reumatoide (Xinqiang *et al.*, Biomed. Pharmacother., 64(7):463-471 (2010)). Por contraste, el paradigma de

dosificación descrito en la presente para el metotrexato es verdaderamente exclusivo, porque implica un tratamiento corto con metotrexato que puede proporcionar un control duradero de las respuestas inmunológicas no deseadas.

En conjunto, los inventores han identificado un régimen de dosificación exclusivo de metotrexato que puede producir un control duradero de varios tipos diferentes de respuestas ADA y respuestas de anticuerpos anti-aloinjerto en el transplante de tejidos, así como respuestas de células T y células B. Los inventores han descubierto que la tolerancia inmunológica desarrrolada por el metotrexato puede trasladarse de un animal a otro, por ejemplo, transplantando células B desde un animal tolerizado a un animal no tolerizado. Los datos de los inventores sugieren que el metotrexato actúa a través de un mecanismo de acción exclusivo que implica la expansión de subconjuntos de células B activadas que pueden representar células B reguladoras activas para suprimir las respuestas inmunológicas. Además, el metotrexato también puede actuar a través de un mecanismo de expansión de células T reguladoras.

Respuesas inmunológicas no deseadas en bioterapia

Los métodos de esta invención pueden controlar las respuestas inmunológicas no deseadas (por ejemplo, respuestas ADA y otras respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o B no deseadas) en una diversidad de terapias biológicas (por ejemplo, una terapia que utilice un producto biológico, tal como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y metabolitos). La terapia de proteínas se refiere a una terapia en la que el agente terapéutico es una sustancia proteica, que incluye péptidos y proteínas. Los productos terapéuticos de proteínas pueden ser, por ejemplo, enzimas, citoquinas, factores del crecimiento, inmunomoduladores, trombolíticos, anticuerpos (que incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales), fragmentos de anticuerpos o anticuerpos modificados (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, Fv, Fd, scFv, y dAb). Por ejemplo, se han desarrollado muchas terapias de sustitución de enzimas para pacientes con ciertas enfermedades genéticas, que incluyen Fabrazyme® (alfa-galactosidasa human recombinante) para la enfermedad de Fabry, Cerezyme® (imiglucerasa) para la enfermedad de Gaucher, Aldurazyme® (laronidasa) para

la mucopolisacaridosis I (MPS I), y Myozyme® y Lumizyme® (alfa-glucosidasa ácida) para la enfermedad de Pompe. Los ejemplos de productos terapéuticos de anticuerpos incluyen Campath® (alemtuzumab), Thymoglobulin®, Avastin® (bevacizumab), Lucentis® (ranibizumab), Remicade® (infliximab), Humira® (adalimumab), Rituxan® (rituximab), Tysabri® (natalizumab), Simulect® (basiliximab), Zenapax® (daclizumab), OKT3® (muromonab-CD3), Erbitux® (Cetuximab), Mylotarg® (gemtuzumab), Herceptin® (trastuzumab), y Benlysta® (belimumab). Los ejemplos de otros productos terapéuticos de proteínas incluyen Enbrel® (etanercep), y otras proteínas de fusión.

En muchos casos, pueden generarse unas respuestas inmunológicas no deseadas en un paciente contra el producto terapéutico de proteínas, provocando efectos variables en el resultado del paciente. Estas respuestas se producen debido a que los productos terapéuticos biológicos a menudo contienen secuencias y conformaciones que son extrañas al paciente humano. Por ejemplo, las ADA interfieren con la eficacia terapéutica y/o aumentan los riesgos de seguridad. ADA puede provocar reacciones de hipersensibilidad, anafilaxis, enfermedad sérica, enfermedad del complejo inmunológico, y insuficiencia renal aguda. Las ADA pueden ser controladas en pacientes que reciben una terapia de proteínas por el médico utilizando métodos bien establecidos, que incluyen ELISA e inmunohistoquímica.

En algunos casos, una "terapia de proteínas" se emplea en la presente para indicar una terapia vírica, en la que se emplea un vector vírico para administrar un producto terapéutico de ácidos nucleicos. Los ejemplos de virus utilizados en estas terapias incluyen, pero no se limitan a adenovirus, virus adenoasociados y retrovirus. Pueden desarrollarse anticuerpos contra las proteínas de la cápsida de los virus, reduciendo al eficacia y aumentando los riesgos de seguridad de estas terapias. Los métodos de esta invención son útiles para controlar las respuestas inmunológicas no deseadas (por ejemplo, respuestas ADA y otras respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o B no deseadas) también en terapias víricas.

Los métodos de esta invención también pueden controlar las respuestas

inmunológicas no deseadas en terapias biológicas no proteicas. Los ejemplos de bioterapias no proteicas incluyen, pero no se limitan a terapias de ácidos nucleicos (por ejemplo, terapias antisentido, terapias de ARNsi y terapias de ARNmi).

Respuesta anti-injerto en transplantes

Los métodos de esta invención también pueden utilizarse para inducir una tolerancia inmunológica en un paciente que recibe un transplante de tejidos, tal como un transplante renal, un transplante de hígado, un transplante cardíaco y un transplante de células precursoras. A menudo se produce un rechazo del receptor al injerto y del injerto al receptor en los transplantes de tejidos, en especial en transplantes de aloinjertos y xenoinjertos. Puede utilizarse un único ciclo de metotrexato o combinarse con otro agente inmunomodulador (por ejemplo, un inmunosupresor, tal como Thymoglobulin®) para gestionar la respuesta de anticuerpos anti-injerto. Además, la combinación de Thymoglobulin® y metotrexato en el transplante puede actuar para prolongar la supervivencia del injerto. Por último, en el caso en que Thymoglobulin® se investigue en el escenario de una enfermedad autoinmunológica crónica, tal como artritis reumatoide y esclerosis múltiple, el metotrexato puede permitir un retratamiento más seguro con Thymoglobulin®, proteger al paciente frente al desarrollo de anticuerpos anti-conejos significativos (tales como IgG y/o IgM) y/o reacciones relacionadas con la infusión.

Gestión de las respuestas inmunológicas no deseadas con metotrexato

Los inventores han descubierto que un único ciclo corto de metotrexato puede reducir significativamente las respuestas inmunológicas no deseadas, tales como ADA, en sujetos que reciben productos terapéuticos biológicos (por ejemplo, productos terapéuticos de proteínas) y las respuestas anti-aloinjerto en pacientes que reciben un transplante de tejidos. La reducción de las ADA no deseadas no solo puede aumentar la seguridad del paciente, sino que también puede mejorar la eficacia de un producto terapéutico de proteínas mejorando la farmacodinámica y/o la farmacocinética del producto terapéutico de proteínas.

El metotrexato, un compuesto de molécula pequeña, se ha utilizado para tratar pacientes con artritis reumatoide activa grave, psoriasis grave, y ciertos tipos de cáncer, que incluyen cánceres que comienzan en los tejidos que se forman alrededor de un huevo fertilizado en el útero, cáncer de mama, cáncer de pulmón, ciertos cánceres de cabeza y cuello, ciertos tipos de linfoma, y leucemia (un cáncer que comienza en los leucocitos). El metotrexato trata al cáncer frenando el crecimiento de las células cancerosas. El metotrexato trata la psoriasis frenando el crecimiento de células de la piel para que no se formen escamas. El metotrexato puede tratar la artritis reumatoide disminuyendo la actividad del sistema inmunológico.

El metotrexato se ha estudiado en el contexto del control de las respuestas ADA provocadas contra la $\alpha$-galactosidasa A y la $\alpha$-glucosidasa. Sin embargo, estos estudios se realizaron con múltiples ciclos de tratamiento de metotrexato (Garman *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 137(3):496-502 (2004); Joseph *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 152(1):138-146 (2008); Mendelsohn *et al.*, N. Engl. J. Med., 360(2):194-195 (2009)), y no con un único ciclo de metotrexato.

Los estudios de los inventores han demostrado, de modo sorprendente, que un único ciclo de metotrexato es suficiente para reducir ADA y los anticuerpos anti-aloinjerto significativamente. De hecho, en estudios que implican un producto terapéutico de anticuerpos (por ejemplo, mATG), los inventores han demostrado que un tratamiento con un único ciclo de metotrexato es más eficaz para reducir ADA que un tratamiento de múltiples ciclos de metotrexato. Los estudios previos que emplean metotrexato no indican que un único ciclo de metotrexato es suficiente para reducir ADA, ni mucho menos que sería más eficaz que un tratamiento de múltiples ciclos. Se sabe que el metotrexato es citotóxico. Por tanto, si se ha establecido la hipótesis de que un mecanismo para la reducción de ADA por el metotrexato se basa en esta propiedad, entonces la predicción sería que la reducción del número de ciclos de tratamiento realmente reduciría los efectos beneficiosos del metotrexato. Además, los estudios previamente publicados no demuestran los beneficios del tratamiento con metotrexato sobre la farmacocinética, la farmacodinámica, la eficacia o la seguridad, tal como se ha demostrado en la presente, de modo sorprendente, con un único tratamiento de

metotrexato. Tampoco indican que el metotrexato puede reducir ADA en una terapia de anticuerpos.

Tal como se emplea en la presente, un régimen de un único ciclo se refiere a un régimen de tratamiento, o una unidad de tratamiento, de días consecutivos o no consecutivos y que se inicia preferiblemente en no más de cinco (por ejemplo, no más de tres) días después de la dosificación del producto de proteínas principal o del transplante. Si el producto terapéutico de proteínas principal se dosifica en múltiples periodos, un único ciclo de tratamiento con metotrexato preferiblemente no se extiende pasado el primer periodo de dosificación del producto terapéutico de proteínas. Como ejemplo, en una terapia de proteínas semanal, mensual o anual, un único ciclo de metotrexato consiste en tres días consecutivos de toma de metotrexato (por ejemplo, por vía oral), comenzando en el día 0, el día en que se administra el producto terapéutico de proteínas principal al paciente por primera vez, o cuando el paciente recibe un transplante de tejidos. Después el paciente recibe una única dosis de metotrexato en el día 1 (24 horas después) y en el día 2 (48 horas después). Un unico ciclo de metotrexato también puede consistir, por ejemplo, en 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis diarias consecutivas de metotrexato, comenzando en el día 0. El metotrexato también puede administrarse en otros momentos según se considere apropiado, por ejemplo, cuando se gestiona la autoinmunidad secuendaria, por ejemplo, en una terapia de disminución de linfocitos. Un único de metotrexato preferiblemente no dura más de 8 días. En algunas realizaciones, un único ciclo de metotrexato comienza entre 48 horas antes y 48 horas después del inicio del tratamiento terapéutico principal (es decir, el tratamiento con el producto terapéutico biológico). Por ejemplo, un único ciclo de metotrexato puede comenzar 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, al mismo tiempo, 12 horas después, 24 horas después, 36 horas después, o 48 horas después del inicio del tratamiento terapéutico principal.

Los estudios de los inventores también han demostrado, de modo sorprendente, que una dosificación baja de metotrexato es suficiente para gestionar las respuestas inmunológicas no deseadas (por ejemplo, las respuestas ADA, y otras respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o B no deseadas) en

terapias de proteínas y transplantes. Por consiguiente, en realizaciones de la invención, el metotrexato peude administrarse en más de un ciclo, pero a una dosificación total baja. Por ejemplo, el metotrexato puede administrarse en dos o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, etc.) ciclos, pero con una dosificación combinada total no mayor que 5 mg/kg en un paciente.

La dosificación de metotrexato será una cantidad eficaz de metotrexato para reducir las respuestas inmunológicas no deseadas, tales como las respuestas de anticuerpos o celulares, cuando se administra en un único ciclo. Una cantidad eficaz de metotrexato en pacientes humanos puede estar en el intervalo de 0,05 mg/kg a 5 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es de 0,1 mg/kg a 1,5 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es de 0,12 mg/kg a 1,28 mg/kg. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es de 0,12 mg/kg. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es de 1,28 mg/kg. La dosificación recomendada de metotrexato puede plantear unos riesgos de seguridad mínimos, porque el régimen de dosificación solo implica un breve tratamiento con metotrexato a unos niveles de dosis que son más similares a las dosis para la artritis reumatoide que a las dosis bajas neoplásicas. En los estudios de los inventores, la cantidad total de metotrexato ensayada en cada ciclo en ratones es de 14 o 15 mg/kg. El metotrexato a 14 mg/kg en ratones es equivalente a aproximadamente 68 mg o 5,92 mg/m$^2$ en un adulto promedio que pese 60 kg. Los pacientes con artritis reumatoide pueden recibir hasta 25 mg de metotrexato semanales sin sufrir toxicidades significativas. Se considera que la dosis neoplásica baja de metotrexato es de 30 mg/m$^2$, significativamente mayor que 5,92 mg/m$^2$. Por tanto, es probable que las anteriores dosis recomendadas, combinado con la naturaleza transitoria de este régimen de metotrexato, se toleren bien en adultos. La dosificación y el régimen de metotrexato exactos, por supuesto, deben ser establecidos por un médico, tomando en cuenta la condición física del paciente, la edad, peso, género, otras medicaciones que esté tomando y sus efectos secundarios conocidos, y cualquier otro factor pertinente. El efecto del metotrexato sobre la gestión de las respuestas de anticuerpos no deseadas en el paciente puede controlarse mediante métodos muy conocidos, que incluyen el examen clínico del paciente, los síntomas, ensayos sanguíneos para ensayar

ADA o titulaciones de anticuerpos anti-aloinjerto, ensayos inmunohistoquímicos (por ejemplo, ensayos de depósito de C4 y otros métodos de detección de anticuerpos en fase sólida, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ensayos fluorimétricos basados en esferas). El efecto también puede controlarse midiendo los niveles de biomarcadores, tales como MCP-1, IL-13, IL-6 e IL-12, que los inventores han demostrado que reducen su nivel con un tratamiento de metotrexato, y células B de transición 2, células B de transición 3, células B foliculares, células B de la zona marginal, células B B10, y células B B1, cuyo número se ha demostrado que aumenta con un tratamiento con metotrexato. Además, pueden utilizarse como biomarcadores TGF-beta, FoxP3, IL-5, IL-10, IL-15 y GM-CSF para controlar los efectos del metotrexato sobre las respuestas inmunológicas no deseadas si es necesario. Los niveles de biomarcadores también pueden utilizarse para controlar los efectos del metotrexato sobre la capacidad de respuesta de las células T a un producto terapéutico (por ejemplo, un producto terapéutico de proteínas). Los biomarcadores para la activación de células T, tales como IL-2, interferón-$\gamma$ y TNF-$\alpha$, también puede controlarse como lecturas del efecto del metotrexato sobre las respuestas de células T.

Debido a su capacidad para controlar respuestas inmunológicas no deseadas, el régimen de un único ciclo de metotrexato de esta invención puede expandir el uso de muchos productos terapéuticos de proteínas cuyos usos repetidos en un paciente concreto se han limitado en el pasado debido a problemas de seguridad y eficacia. Por ejemplo, el uso concomitante de metotrexato con Thymoglobulin® puede expandir la utilidad de Thymoglobulin® a otros escenarios de enfermedad en los que se requiere una redosificación, tales como enfermedades autoinmunológicas mediadas por células T que incluyen, pero no se limitan a diabetes, lupus, esclerodermia, artritis reumatoide, psoriasis y esclerosis múltiple. Además, el metotrexato puede expandir la eficacia y la seguridad del alemtuzumab, por ejemplo, en enfermedades autoinmunológicas, tales como la esclerosis múltiple, en las que el alemtuzumab normalmente se administra en ciclos anuales repetidos, o en la leucemia linfocítica de células B crónica, en la que el alemtuzumab se administra en un ciclo de 12 semanas, comenzando la

dosificación ea 3 mg/día (hasta que las reacciones de infusión son iguales o menores al grado 2), después aumenta hasta 10 mg/día (hasta que las reacciones de infusión son iguales o menores al grado 2), y por último sube hasta 30 mg/día (en días alternos, 3 veces semanales). Estos tipos de regímenes de dosificación pueden potenciar las respuestas ADA inhibidoras. El metotrexato, por tanto, puede utilizarse para controlar ADA y cualquier otra respuesta inmunológica no deseada.

Mejorar la terapia de disminución de linfocitos con metotrexato

Un ejemplo de una aplicación de esta invención es utilizar el metotrexato para mejorar una terapia de disminución de linfocitos, tal como una terapia con almetuzumab para tratar la esclerosis múltiple (MS), tal como MS en recaída-remisión. La "disminución de linfocitos" es un tipo de inmunosupresión mediante la reducción de los linfocitos en la circulación, por ejemplo, células T y/o células B, que produce linfopenia. La disminución de los linfocitos puede lograrse, de modo terapéutico, mediante un producto terapéutico de proteínas, tal como Thymoglobulin®, el anticuerpo monoclonal anti-CD52 humanizado CAMPATH-1H® (alemtuzumab), y rituximab. La disminución de linfocitos se desea en el tratamiento de una serie de trastornos autoinmunológicos, que incluyen la esclerosis múltiple (Coles *et al.*, Ann. Neurol., 46, 296-304 (1999); Coles *et al.*, 2008), la artritis reumatoide, la vasculitis, y el lupus.

La terapia de disminución de linfocitos puede provocar autoinmunidad secundaria. La autoinmunidad se indica en la presente como "autoinmunidad secundaria" cuando surge después de la aparición de una primera enfermedad ("primaria"), por ejemplo, una enfermedad autoinmunológica "primaria". La autoinmunidad secundaria a veces surge en pacientes MS que tienen, o han tenido, linfopenia tras, por ejemplo, una terapia de disminución de linfocitos. En algunos individuos, la autoinmunidad secundaria surge poco después de una terapia de disminución de linfocitos (por ejemplo, un tratamiento con alemtuzumab). En otros individuos, la autoinmunidad secundaria puede no surgir hasta meses o años después de la terapia de disminución de linfocitos; en algunos de estos individuos, para el momento en que desarrollan una inmunidad

secundaria, puede que ya se haya producido una recuperación sustancial de los linfocitos (recuento de linfocitos totales), de modo que ya no sean linfopénicos. La disminución de los linfocitos puede producirse en el contexto de un tratamiento con un producto terapéutico de anticuerpos o un producto terapéutico de moléculas pequeñas.

La autoinmunidad secundaria que surge en pacientes MS linfopénicos puede ser cualquier tipo de trastorno autoinmunológico distinto de MS que incluye, pero no se limita a autoinmunidad tiroide (por ejemplo, enfermedad de Graves), púrpura trombocitopénica, trombocitopenia inmunológica (ITP), enfermedad de Goodpasture, neutropenia autoinmunológica, anemia hemolítica autoinmunológica, y linfopenia autoinmunológica. En algunas realizaciones, la autoinmunidad secundaria está mediada por células B, es decir, respuestas de células B y autoanticuerpos que están directamente conectados con el desarrollo y la patología de la enfermedad.

Las técnicas para el diagnóstico y el control de las enfermedades autoinmunológicas son muy conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen la evaluación de los síntomas y examenes médicos, tales como un análisis de sangre. La invención contempla el uso de cualquier método conocido. Por ejemplo, los niveles de autoanticuerpos en un fluido corporal de un paciente (por ejemplo, sangre) pueden determinarse como un medio para detectar señales de autoinmunidad. De modo específico, pueden medirse los anticuerpos anti-nucleares, anticuerpos anti-músculo liso, y anticuerpos anti-mitocondrias. En caso de detectar anticuerpos anti-nucleares, pueden realizaron otros ensayos para medir los anticuerpos anti-ADN bicatenario, anticuerpos anti-ribonucleoproteínas, y anticuerpos anti-La. Pueden medirse los anticuerpos anti-receptor de hormona estimulante tiroidea (TSH) y anti-tiroide peroxidasa (TPO) para detectar enfermedades tiroideas autoinmunológicas; si se detectan anticuerpos anti-receptor de THS o anti-TPO, se puede medir si la función tiroidea está afectada midiendo los niveles de T3 libre, T4 libre y THS. Los anticuerpos anti-plaquetas pueden medirse para detectar una trombocitopenia autoinmunológica, y una medición de los niveles de plaquetas sanguíneas puede servir par determinar si la presencia de anticuerpos anti-plaquetas está

provocando una reducción en el número de plaquetas. Véase también el documento WO 2010/041149.

El régimen de metotrexato de un solo ciclo de esta invención puede utilizarse para mejorar la seguridad y la eficacia de una terapia de disminución de linfocitos mediante la reducción de ADA, así como mediante la minimización de la autoinmunidad secundaria. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores creen que el metotrexato puede reducir la autoinmunidad secundaria tolerizando múltiples autoantígenos de modo simultáneo.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los ejemplos de métodos y materiales se describen a continuación, aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención. Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Aunque en la presente se cita una serie de documentos, estas citas no constituyen un reconocimiento de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general común de la técnica. A lo largo de esa memoria descriptiva y las reivindicaciones, se entenderá que el término "comprende" o sus variaciones, tales como "que comprende" o "comprendiendo" implica la inclusión de un número entero mencionado o un grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. Los materiales, los métodos y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

**Ejemplos**

En los siguientes ejemplos no limitantes se describen más detalles de la invención. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, solo se ofrecen como ilustración, y no deben considerarse limitantes de las realizaciones adjuntas. A partir de la presente descripción y de estos ejemplos, los expertos en la técnica pueden determinar

ciertas características de esta invención, y sin apartarse de su espíritu y su alcance, realizar diversos cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a sus diversos usos y condiciones. Los materiales y los métodos utilizandos en estos ejemplos de trabajo se describen como sigue.

Ratones

Se emplearon ratones C57BL/6 hembra normales de entre 6 y 12 semanas de edad para los estudios *in vivo* del anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos murinos de conejo (mATG) y se obtuvieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) o Taconic Laboratories (Hudson, NY). Los estudios relacionados con alemtuzumab emplean ratones trtansgénicos (Tg) CD52 humanos (huCD52) de entre 6-12 semanas de edad, que se obtuvieron en Charles River Laboratories/Genzyme Corp. Los ratones se alojaron y se mantuvieron según the Guide for Care and Use of Laboratory Animals y con el reconocimiento de American Association for Accreditation of Laboratory Animals Care I, y todos los protocolos animales en estos estudios fueron aprobados por the Institutional Animals Care and Use Committee.

El ratón Tg huCD52 utilizado para los estudios de farmacología no clínica ha sido generado por Xenogen (Cranbury, NJ, EEUU). Para generar el ratón, una construcción de bácmido que contiene aproximadamente 145 kilobases de ADN genómico procedente del cromosoma 1 humano fue integrada aleatoriamente en el genoma de ratón de células precursoras embrionarias CD-1. En virtud del tramo de ADN genómico humano que contiene este bácmido, la construcción incluye un total de 5 genes parciales o totales de función desconocida, además del CD52 humano. Los 5 segmentos génicos parciales o totales contenidos en el bácmido son los siguientes: el gen CD52 humano, el extremo 3’ de un nuevo gen (DKFZP434L0117), el gen SH3BGRL3 (proteína similar a 3 rica en ácido glutámico de unión al dominio SH3), el gen para socius (SOC), el gen AIM1L (ausente en similar a melanoma 1), y el gen 683 de proteína de dedos de cinc. Se generaron tres líneas fundadoras, y la línea 107 se estableció en Genzyme.

Administración de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales mATG y rbIgG se prepararon como se describe en Ruzek *et al.*, Transplantation, 88(2):170-179 (2009), y se administraron mediante inyección intraperitoneal en diversos regímenes dependiendo del experimento. El anticuerpo monoclonal alemtuzumab se administró por vía intravenosa como una única inyección de 0,5 mg/kg o en un ciclo de tres o cinco días de 0,5 mg/kg/día.

Tratamiento con Myozyme®

Se empleó la alfa-glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA, comercializada por Genzyme Corp. como Myozyme®) como producto de fármaco formulado. Los ratones se trataron semanalmente con 20 mg/kg de rhGAA mediante una inyección en embolada en la vena de la cola, a menos que se indique lo contrario. Todos los ratones se trataron de modo profiláctico con 5 a 30 mg/kg de difenhidramina (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL) por vía intraperitoneal antes de la administración de rhGAA. Los animales control se trataron por vía intravenosa con disolución salina estéril al 0,9% o tampón de formulación de rhGAA.

Tratamiento con metotrexato

El metotrexato (Calbiochem, n.º de catálogo 454125) se administró a 0,5, 1,0, 2,0 o 5 mg/kg por inyección intraperitoneal en 1-3 ciclos, en el que cada ciclo es igual a tres, seis o siete días consecutivos de inyección dependiendo del experimento. En estudios que implican un tratamiento mensual de mATG, el metotrexato se administra por vía intraperitoneal a 5 mg/kg a las 0, 24 y 48 horas después del tratamiento con mATG inicial o los primeros tres tratamientos con mATG. En estudios de transplantes, en los que mATG se dosifica en los días 0 y 4, el metotrexato se administró a diario a 2 mg/kg desde los días 0 a 6, a diario a 0,5 mg/kg desde los días 0 a 6, o a diario a 0,5 mg/kg desde los días 0 a 11.

Tratamiento con mATG

El anticuerpo policlonal mATG se administró como una inyección intraperitoneal de 5 mg/kg cada cuatro semanas, o como dos dosis de 20 mg/kg administradas con un intervalo de cuatro días en el escenario del transplante, administrándose la primera dosis el día del transplante (día 0).

Preparaciones de células de diversos tejidos

Para las preparaciones de esplenocitos y de células de nódulo linfático se generaron suspensiones de células individuales a partir de bazos o nódulos linfáticos mesentéricos e inguinales de ratón recolectados, mediante homogeneización entre portaobjetos de vidrio enfriados hacia PBS que contenía FCS al 2%. Para las preparaciones de esplenocitos, se lisaron eritrocitos mediante una incubación de 1-2 minutos con una disolución de lisis de eritrocitos (BD Biosciences, San Diego, CA). La sangre se aisló mediante sangrado retroorbital, y las preparaciones de células se realizaron lisando eritrocitos con una disolución de lisis de eritrocitos (BD Biosciences) durante 20-30 minutos. Para todas las preparaciones de tejidos, las células vivas se contaron utilizando el contador automático ViCell (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Después del aislamiento, todas las preparaciones de células se lavaron con PBS/FCS al 2% antes de utilizarse en los ensayos descritos a continuación.

Citometría de flujo

Para la evaluación de las poblaciones de células dentro de diferentes tejidos, se incubaron suspensiones de células individuales de los tejidos con anticuerpos conjugados con fluorocromo que incluyen anti-CD4, CD8, CD25, CD44, CD62L de ratón (todos los anticuerpos de BD Biosciences o eBioscience, San Diego, CA). El análisis de expresión de Foxp3 intracelular se realizó según el protocolo del fabricante de anti-Foxp3 (eBiosciences, San Diego, CA). Después de la incubación con los anticuerpos, las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSCanto, BD Biosciences, y el programa informático FCS Express, De Novo Software, Los Angeles, CA).

Las poblaciones celulares evaluadas se definen como sigue:

células T CD4 totales: $CD4^+CD8^-$,

células T CD8 totales: $CD8^+CD4^-$,

células no expuestas CD4: $CD4^+CD25^-CD62L^+CD44^-$,

células de memoria CD4: $CD4^+CD25^-CD62L^-CD44^+$,

células T CD8 no expuestas: $CD8^+CD44^-CD62L^+$,

células de memoria CD8: $CD8^+CD44^+CD62L^-$,

células T reguladoras: $CD4^+CD25^+Foxp3^+$,

células B totales: $CD19^+$,

células B B2/foliculares: $CD19^+CD21^{int}CD23^{hi}$,

células B B1: $CD19^+CD43^+CD11b^+$,

células B de transición 1: $CD19^+CD93^+CD23^-IgM^{hi}$,

células B de transición 2: $CD19^+CD93^+CD23^+IgM^{hi}$,

células B de transición 3: $CD19^+CD93^+CD23^+IgM^{lo}$,

células B de la zona marginal: $CD19^+CD21^{hi}CD23^{lo}$, y

células B B10: $CD19^+CD5^+CD1d^+$.

Los estudios de bloqueo *in vitro* determinan que mATG hasta 100 μg/ml no evita la detección de estas poblaciones.

ELISA de IgG anti-mATG

Se analizaron los niveles de IgG anti-mATG en suero de ratón mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Brevemente, placas de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY, EEUU) se revistieron durante la noche con 1 μg/ml de IgG de conejo en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de un bloqueo con tampón de bloqueo Super Block (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU), se añadieron diluciones en serie de suero por duplicado a placas revestidas con IgG de conejo y se incubaron a 37 ºC durante 1 h. Las placas se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EEUU) y se dejó en incubación durante 1 h a 37 ºC. Después de un lavado final se añadió un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFx, Owings Mills, MD, EEUU) y se dejó revelar durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y se leyeron los

valores de la absorbancia a 450/650 nm sobre un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Las titulaciones de criterio de valoración se definen como la dilución menor que tiene una absorbancia promedio mayor que 0,100 utilizando el programa informático Softmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU).

ELISA de IgG específica de mATG

El suero de ratón fue determinado por ELISA. Brevemente, placas de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY, EEUU) se revistieron durante la noche con 1 μg/ml del fragmento Fc de anticuerpo IgG anti-conejo de cabra (Bethyl Laboratories, TX, EEUU). Después de un bloqueo con BSA al 0,5% (de alta pureza), los controles patrón y las muestras de suero se diluyeron según fue necesario y se añadieron por duplicado a los pocillos de las placas revestidas y se incubaron a 36-38 ºC durante 1 hora con agitación suave. Las placas se lavaron y se añadió el fragmento Fc de anticuerpo IgG anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Bethyl Laboratories, TX, EEUU) según fuera apropiado y se incubó durante 1 hora a 36-38 ºC con agitación suave. Después de un lavado final, se añadió un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (BioFx, Owings Mills, MD, EEUU) y se dejó revelar durante 15 min a 23-25 ºC. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y se leyeron los valores de la absorbancia a 450/650 nm sobre un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Las concentraciones finales se extrapolaron de la curva patrón. Se predeterminó que las mediciones de IgG específica de mATG mediante este método solo se vieron modestamente afectadas por las titulaciones de IgG anti-mATG mayores que 218.000.

ELISA de IgG anti-alemtuzumab

Se sangraron ratones 4-6 días después de un tratamiento con alemtuzumab y la IgG anti-alemtuzumab específica se midió mediante ELISA. Brevemente, placas de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY, EEUU) se revistieron durante la noche con 3 μg/ml de alemtuzumab en PBS (pH 7,2). Después de un bloqueo con BSA al 0,1% en PBS, se añadieron diluciones en serie de suero por duplicado a placas revestidas con alemtuzumab y se incubaron a 37 ºC durante 1 h. Las

placas se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EEUU) y se dejó en incubación durante 1 h a 37 ºC. Después de un lavado final se añadió un sustrato de TMB (BioFx, Owings Mills, MD, EEUU) y se dejó revelar durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y se leyeron los valores de la absorbancia a 450/650 nm sobre un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Las titulaciones de criterio de valoración se definen como el antilogaritmo de la dilución de la muestra logarítmicamente transformada interpolada a un valor de absorbancia de 0,2 utilizando el programa informático Excel (Microsoft, Redmond, WA, EEUU).

ELISA de IgG anti-rhGAA

Se sangraron ratones 4-6 días después de un tratamiento con rhGAA y la IgG específica se midió mediante ELISA. Brevemente, placas de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY, EEUU) se revistieron durante la noche con 5 μg/ml de rhGAA en tampón acetato de sodio (pH 5,0). Después de un bloqueo con BSA al 0,1% en PBS, se añadieron diluciones en serie de suero por duplicado a placas revestidas con rhGAA y se incubaron a 37 ºC durante 1 h. Las placas se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EEUU) y se dejó en incubación durante 1 h a 37 ºC. Después de un lavado final se añadió un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, KPL, Gaithersburg, MD) y se dejó revelar durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y se leyeron los valores de la absorbancia a 450/650 nm sobre un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Las titulaciones de criterio de valoración se definen como la recíproca de la dilusión de la muestra que produce un valor de absorbancia de 0,2 utilizando el programa informático Softmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Estudios *ex vivo*

Ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories) o E4GAAKO (Charles River) de 8-12 semanas de edad recibieron 5 mg/kg de metotrexato (Calbiochem, n.º de

catálogo 454125) mediante una inyección intraperitoneal durante 1-3 ciclos, en donde 1 ciclo es igual a 3 días consecutivos de inyección de 20 mg/mg de Myozyme® (Genzyme Corporation) mediante una inyección en la vena de la cola o durante 2-6 dosis semanales, comenzando con la primera dosis de metotrexato. Los animales se sacrificaron semanal o diariamente después del inicio del tratamiento. Se recogió el bazo, los nódulos linfáticos mesentéricos e inguinales para los análisis de citometría de flujo de subconjuntos de células T y B y se recogió el suero para los ensayos de ELISA. Los bazos se procesaron entre portaobjetos de vidrio y los eritrocitos (RBC) se lisaron con tampón de lisis adquirido en BD Biosciences (n.º de catálogo 555899) según las instrucciones del fabricante. Los nódulos linfáticos se procesaron entre portaobjetos de vidrio y se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero de ternera fetal al 2% (FCS). Las células se resuspendieron en 200 μl de PBS que contenía suero bovino fetal al 4% y 25 μg/ml de IgG de ratón total, y se bloquearon durante 30 minutos a 4 ºC. Se tiñeron aproximadamente 3 millones de células esplénicas y 1 millón de células de nódulos linfáticos con diferentes cócteles de anticuerpos y se analizaron con un muestreador de alta capacidad de procesamiento (HTS) en un citómetro de flujo Becton Dickinson CANTOII. Se adquirieron al menos 100.000 acontecimientos celulares dentro de la ventana de análisis de linfocitos. Los cócteles de anticuerpos anti-ratón consisten en PE-CD21/35 n.º de catálogo 552957, FITC n.º de catálogo 553138, PE-CD138 n.º de catálogo 553714, PE-CD127 n.º de catálogo 552543, APC-Cy7-CD19 n.º de catálogo 557655, FITC-CD43 n.º de catálogo 553270, PE-Cy7-CD4 n.º de catálogo 552775, FITC-CD3e n.º de catálogo 553062, APC-CD11b n.º de catálogo 553312, PE-Cy7-IgM n.º de catálogo 552867, APC-Cy7-CD8 n.º de catálogo 557654, PE-CD273 (PD-L2) n.º de catálogo 557796, APC-CD138 n.º de catálogo 558626, PE-Cy7-CD11b n.º de catálogo 552850, PE-CD93 (linaje B temprano) n.º de catálogo 558039, APC-CD69 n.º de catálogo 560689, Pe-Cy7-CD24 n.º de catálogo 560536, FITC-CD1d n.º de catálogo 553845, APC-CD5 n.º de catálogo 550035, y Percp-Cy5-7AAD n.º de catálogo 559925, todos adquiridos en BD Pharmingen. El kit de tinción intracelular FITC-FoxP3 se adquirió en eBioscience. Pacific Blue (PB)-CD25 n.º de catálogo 102022, PB-

CD23 n.º de catálogo 101616 y PB-CD86 n.º de catálogo 105022 se adquirieron en BioLegend. El análisis de los subconjuntos de linfocitos se realizó con el programa informático FCS express versión 3, proporcionado por De Novo Software. Los porcentajes se generaron con la opción de procesamiento discontinuo, y los números absolutos se calcularon según los recuentos celulares obtenidos. Los recuentos de células esplénicas y de nódulos linfáticos se obtuvieron con un analizador de viabilidad celular Beckman Coulter Vi-cell XR según las instrucciones del fabricante.

Análisis *in vitro* y de citoquinas

Ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories) o E4GAAKO (Charles River) de 8-12 semanas de edad recibieron 5 mg/kg de metotrexato (Calbiochem, n.º de catálogo 454125) mediante una inyección intraperitoneal durante 1 ciclo (3 dosis diarias consecutivas), comenzando con un tratamiento de 20 mg/kg de rhGAA. Para los estudios de 1D11, los animales se trataron con inyecciones intraperitoneales de 5 mg/kg de 1D11 o 13C4 (Genzyme Corporation) 3 veces semanales, en días alternos, comenzando con un tratamiento de rhGAA y metotrexato. Los animales se sacrificaron en el día 6 o 7 después del inicio de rhGAA, dependiendo de la raza de ratón. Los bazos se prepararon en una suspensión de células individuales y se cargaron sobre un instrumento RoboSep (STEMCELL Technologies) según las instrucciones del fabricante y se sometieron a una selección negativa de células B. Las células B purificadas se sembraron a 500.000 células por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Costar, n.º de catálogo 3799) y se incubaron sin estimulación o con 10 μg/ml de LPS (Sigma, n.º de catálogo L5014) durante 48 horas a 37 ºC. Todos los pocillos recibieron Monensin (BD Bioscience n.º de catálogo 554724) según las instrucciones del fabricante. Se dejaron las células en incubacion durante al menos 4 horas a 37 ºC. Las muestras se trasladaron a pocillos con fondo en V (USA Scientific n.º de catálogo 651201) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 ºC. Las células se resuspendieron en 200 μl de PBS que contenía suero bovino fetal al 4% y 25 μg/ml de IgG de ratón total y se bloquearon durante 30 minutos a 4 ºC. Las placas se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en

90 µl de PBS/FCS al 2% con la adición de 10 µl de cóctel de anticuerpos según se describió anteriormente, y se incubó durante 20 minutos a 4 ºC con la adición de 5 µl de 7AAD durante los últimos 10 minutos del procedimiento de tinción. La adición de 100 µl de tampón a las muestras con la posterior centrifugación se empleó como lavado. Las muestras pueden resuspenderse en tampón para el análisis de superficie de proteínas y adquisición inmediata, o resuspenderse en Fix/Perm (eBioscience n.º de catálogo 11-5773) para la tinción intracelular de IL-10 (BioLegend n.º de catálogo 505008), TGF-beta (BioLegend n.º de catálogo 141404) y FoxP3 (eBioscience n.º de catálogo 11-5773-82) según las instrucciones del fabricante. Otro tipo de tinción de la superficie incluye anticuerpos TGF-beta y Tim-1 (BioLegend n.º de catálogo 119506). Todas las muestras se adquirieron y se analizaron como se describió anteriormente.

Animales y modelo de aloinjerto cardíaco

Los ratones C57BL/6 y BALB/c se obtuvieron de Charles River (Kingston, NY, o Raleigh, NC) y se emplearon en estos experimentos con una edad entre 8 y 13 semanas. El ratón C57BL/6 alogénico donante primero anestesió con una inyección intraperitoneal de quetamina (Fort Dodge Animal Health/Pfizer, Fort Dodge, IA) y xilazina (Lloyd, Shenandoah, IA) y se realizó una esternotomía mediana. El corazón donante se perfusionó lentamente *in situ* con 1 ml de disolución de lactato de Ringer heparinizada fría (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) a través de la vena cava inferior y la aorta antes de que la vena cava superior y las venas pulmonares se ligaran y se dividieran. Después, la aorta ascendente y la arteria pulmonar se cortaron, el injerto se retiró del donante, y el corazón se conservó en disolución salina enfriada en hielo hasta el procedimiento del injerto. Un ratón receptor (Balb/c) se anestesió de modo similar y se preparó como se describió anteriormente para el ratón donante, excepto que se abrio la cavidad abdominal. Utilizando un microcopio quirúrgico para visualizar la cavidad abdominal abierta, se aislaron la aorta abdominal (AA) y la vena cava inferior (IVC). El corazón donante se colocó en el abdomen del receptor (boca abajo) y los injertos se revascularizaron con anastomosis de extremo a lado entre la arteria pulmonar del donante y la vena cava inferior del receptor, así como la

aorta del donante y la aorta abdominal del receptor. Después de confirmar la hemostasis, el músculo abdominal se cerró con una sutura continua 5-O Vicryl (Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, NJ), y la piel se cerró con una sutura continua 5-0 Ethilon (Ethicon). Se realizó una gestión y evaluación convencional del dolor posoperatorio. Los injertos se evaluaron mediante palpación 5-7 veces por semana durante los primeros 30 días, y después 3-4 veces por semana hasta el final del estudio.

Ratones C57Bl/6 se trataron con una dosis intravenosa de 20 mg/kg de rhGAA (Genzyme Corporation), 3 dosis intraperitoneales consecutivas de 5 mg/kg de metotrexato (APP Pharmaceuticals, LLC) y 1D11 o 13C4 a 5 mg/kg (Genzyme Corporation) con 3 dosis cada día alterno. El tratamiento con metotrexato, 1D11 y 13C4 comenzó con inyecciones de rhGAA. Los bazos se recogieron 7 días después del inicio del tratamiento y se procesaron como se describió anteriormente para las células B, el cultivo y el análisis de flujo. Además, se obtuvieron los datos de titulación de rhGAA tratando a los animales como se describió anteriormente, con dosis de rhGAA semanales a lo largo de 12 semanas, con dosis de metotrexato en 1 o 3 ciclos, y con dosis de 1D11 o 13C4 3 veces semanales en días alternos durante 12 semanas. Se recogieron muestras de suero cada 2 semanas para un análisis de ELISA.

Histopatología e inmunohistoquímica

Los injertos cardíacos se fijaron en formaldehído tamponado neutro al 10%, se biseccionaron a lo largo del eje longitudinal para exponer los ventrículos derecho e izquierdo y el tracto de salida, y se procesaron de modo rutinario para su inmersión en parafina. Se cortaron secciones a 5 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o tricromo de Masson. También se inmunotiñeron secciones en serie según la siguiente descripción. Cada sección teñida con H&E se evaluó cualitativamente para diversas características de patología de rechazo de aloinjertos (por ejemplo, vasculitis, degeneración miocárdica y necrosis, miocarditis) utilizando un esquema de graduación histológica.

La inmunohistoquímica se realizó utilizando un sistema de inmunotinción automático Bond-Max (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL). Para detectar

las células inmunopositivas duales a CD3 y Foxp3, las secciones de tejido de injerto se sometieron a una inmunotinción doble con anticuerpos anti-CD3 y anti-Foxp3 empleando el kit de detección Bond Polymer Refine Detection y el kit Bond Polymer AP Red (Leica, Buffalo Grove, IL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, secciones desparafinadas de injertos sumergidos en parafina se sometieron a una retirada de epitopos termoinducida (25 min a 99 ºC), se incubaron con bloqueo de proteínas sin suero (Dako, Carpentaria, CA), anticuerpo monoclonal anti-CD3 de conejo (Lab Vision/Neo Marker), polímero conjugado con peroxidasa, bloqueo de peroxidasa, y reactivo de detección de diaminobenizideno, seguido de un anticuerpo anti-Foxp3 de ratón de rata (eBioscience Inc., San Diego, CA) y después un anticuerpo anti-rata de conejo (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Después los portaobjetos se incubaron con Bond Polymer AP y se mezclaron con reactivo de detección rojo y, por último, se contratiñeron con hematoxilina. En los portaobjetos de control negativo, los anticuerpos primarios anti-CD3 y anti-Foxp3 se reemplazaron por IgG de conejo completa Chromepure (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) e IgG2a de rata (AbD Serotec, Raleigh, NC), respectivamente.

Niveles de aloanticuerpos séricos

Se determinaron los niveles de aloanticuerpos séricos mediante la incubación de suero de ratones normales o con transplante cardíaco a diluciones de 1:50 con una línea de fibroblastos de C57BL/6 transformados con SV40 (SVB6), seguido de la detección de anticuerpos unidos a fibroblastos (aloanticuerpos) utilizando IgG anti-ratón de conejo FITC (Dako, Carpinteria, CA) y mediante análisis citométricos de flujo. La media geométrica de las intensidades de fluorescencia de los fibroblastos teñidos con suero se dividió entre los fibroblastos teñidos de control de isotipo para normalizar los niveles de aloanticuerpos entre los experimentos. La unión de los anticuerpos séricos a los fibroblastos alogénicos fue específicamente con aloanticuerpos, porque las mismas muestras de suero no se unen a la línea de fibroblastos de BALB/C transformados con SV40 (SVBalb) (los datos no se muestran).

Modelo de ratón de transferencia adoptiva

Se obtuvieron ratones C57BL/6 de Jackson Laboratories y se alojaron en condiciones sin patógenos específicas. Los ratones control recibieron una única inyección intravenosa de rhGAA a 20 mg/kg. Los ratones tolerizados recibieron una única injección intravenosa de rhGAA a 20 mg/kg, además de tres inyecciones intraperitoneales de metotrexato diarias consecutivas de 0,5 mg. Los bazos se recolectaron en el día 6 después de la inyección inicial de rhGAA, de ambos grupos donantes, y se procesaron en suspensiones de células individuales reunidas. Las células se lavaron y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μM. Las células después se enriquecieron en células B utilizando un sistema de separación de células StemCell Technologies RoboSep, y se resuspendieron para permitir una inyección intravenosa de 200 μl. Los grupos de receptores tolerizados y no tolerizados recibieron una concentración con alto número de células de 10 x $10^6$, o de bajo número de células de 5 x $10^6$ a través de inyecciones intravenosas. Los grupos control recibieron solo rhGAA, o rhGAA y metotrexato (un único ciclo de tres inyecciones de MTX diarias consecutivas). Todos los grupos recibieron inyecciones intravenosas de 20 mg/kg de rhGAA semanales, y fueron sangrados de modo retroorbital bisemanalmente durante 16 semanas, hacia tubos separadores de suero BD Vacutainer. Se retiró el suero y se conservó por debajo de -20 ºC hasta que se empleó para un ELISA. Se determinaron las titulaciones de anticuerpos anti-rhGAA utilizando ELISA, se leyeron en un SpectraMax M2, y se calcularon utilizando Softmax para extrapolar el valor de titulación. Los datos brutos de los archivos de Softmax y las hojas de cálculo de EXCEL que contienen la información de control y de titulación se almacenaron en servidores de red. Todas las gráficas y las estadísticas se generaron utilizando el programa informático GraphPad Prism.

**Ejemplo 1: Se producen anticuerpos anti-fármaco en respuesta a productos terapéuticos de anticuerpos**

El anticuerpo policlonal mATG se une a una diversidad de tipos de células inmunológicas, que incluyen células presentadoras de antígenos. Los datos de los inventores demuestran que un único tratamiento de mATG (dos dosis de 25

mg/kg administradas con un intervalo de tres días, por vía intraperitoneal) pueden generar titulaciones de IgG anti-mATG tal altas como 100.000 (figura 1A) en ratones. Cuando se administran como inyecciones mensuales sucesivas (5 mg/kg, cada 4 semanas), las titulaciones anti-mATG aumentan aún más, con unas titulaciones de hasta 5 x $10^6$ después de cinco inyecciones mensuales (figura 1B). Para el tratamiento único y para las inyecciones mensuales, se empleó IgG de conejo (rbIgG) como control.

Puesto que el alemtuzumab no presenta reacción cruzada con CD52 murino, los estudios preclínicos con alemtuzumab deben realizarse en ratones Tg huCD52, en los que la patrón de expresión del transgén es similar a la expresión de CD52 en seres humanos. De modo similar a mATG, la administración intravenosa de alemtuzumab (0,5 mg/kg) provoca respuestas ADA significativas en ratones Tg huCD52. Estas respuestas aumentan a lo largo de los primeros cuatro tratamientos y después disminuyen, de modo que tras la quinta dosis de alemtuzumab, los ratones Tg huCD52 ya no generan anticuerpos anti-alemtuzumab (figura 2). Esta no respuesta sugiere que se ha producido una tolerancia natural (Rosenberg *et al.*, Blood, 93(6):2081-2088 (1999)).

Los datos demuestran que las titulaciones de ADA contra mATG en ratones C57BL/6 y las titulaciones de ADA contra alemtuzumab en los ratones CD1 Tg huCD52 son altas (>100.000). Este nivel alto de inmunogenicidad puede atribuirse a la capacidad de mATG y del alemtuzumab de unirse a células presentadoras de antígenos, potenciando con ello el procesamiento y la presentación de antígenos para inducir respuestas inmunológicas contra ellos.

**Ejemplo 2: El metotrexato controla las respuestas de IgG anti-mATG con un único ciclo de administración**

Se han indicado unas titulaciones de anticuerpos elevadas tras un tratamiento con Thymoglobulin®, y se han descrito informes de casos de enfermedad sérica, insuficiencia renal aguda y reacciones cardiovasculares en pacientes tratados con Thymoglobulin® (Boothpur *et al.*, *supra*; Lundquist *et al.*, Liver Transpl., 13(5):647-650 (2007); Busani *et al.*, Minerva Anestesiol., 72(4):243-248 (2006); Tanriover *et al.*, Transplantation, 80(2):279-281 (2005); Buchler *et al.*, Clin.

Transplant., 17(6):539-545 (2003)). Para determinar si el metotrexato puede reducir las respuestas anti-ATG y, así, mitigar estos problemas de seguridad, se evaluó un régimen de tres días de metotrexato, administrado solo como un único ciclo, como medio para controlar las respuestas de IgG anti-mATG en ratones. Esto es diferente del régimen que previamente se ha publicado, porque sólo se administra un único ciclo de metotrexato con mATG, en oposición al menos a tres ciclos que se administran en el contexto de ERT. El metotrexato (Calbiochem n.º de catálogo 454125) administrado por vía intraperitoneal a 5 mg/kg durante seis días consecutivos, comenzando en la primera de dos administraciones de mATG (25 mg/kg, con un intervalo de 3 días), puede suprimir las respuestas de IgG anti-mATG a lo largo de al menos ocho semanas después de un tratamiento en 95%, cuando se comparan las áreas bajo las curvas de efecto (figura 3).

Después, se evaluó el efecto del metotrexato sobre las titulaciones de anti-mATG después de cinco inyecciones mensuales de mATG a 5 mg/kg/inyección. Se realizaron inyecciones mensuales de tratamiento de mATG porque la repoblación de linfocitos es casi completa un mes después del tratamiento con mATG (Ruzek, *supra*). Después se cuantificaron las respuestas de anticuerpos anti-fármaco semanalmente a lo largo de 20 semanas de tratamientos mensuales. Durante este periodo, a pesar de la disminución de células T CD4+ por mATG, las titulaciones de anticuerpos alcanzaron un valor tan alto como 5 millones (figura 1B). De modo interesante, los animales que recibieron IgG de conejo no específica al mismo nivel de dosis y programa que mATG mostraron una bajas respuestas de IgG anti-conejo (figura 1B). Una posiblidad para la inmunogenicidad potenciada de mATG puede ser la unión específica de mATG a las células presentadoras de antígenos (APC), tales como células dendríticas foliculares, que cuando están en presencia del complemento, pueden potenciar significativamente las respuestas de células B. También se evaluaron dos regímenes de tratamiento de metotrexato. En trabajos previos con terapias de sustitución de enzimas (ERT), tres ciclos de metotrexato administrados durante las tres primeras dosis de alfa-glucosidasa ácida proporcionaron una reducción sostenida en la titulación de anticuerpos a lo largo de al menos ocho meses de

dosificación de ERT semanal (Joseph *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 152(1):138-146 (2008)). Se evaluó un tratamiento similar de metotrexato en el contexto de mATG, en el que se administró 5 mg/kg de metotrexato a los 15 minutos de la administración de mATG, así como 24 y 48 horas después de cada uno del primero de los tres tratamientos mensuales de mATG. Este régimen disminuyó con éxito las respuestas de anticuerpos anti-mATG desde unas titulaciones de aproximadamente 4 millones a unas titulaciones de 816.000, produciendo una reducción del 79% comparando el área bajo la curva de efecto (figura 4A).

Además, se evaluó el efecto de un único tratamiento de metotrexato administrado aproximadamente solo el primero de cinco tratamientos mensuales de mATG sobre las respuestas de IgG anti-mATG y se comparó directamente con un régimen de tres ciclos. De modo sorprendente, este régimen de un único ciclo reduce las titulaciones de IgG anti-mATG aún más que el régimen de tres ciclos, hasta una titulación de aproximadamente 50.000 (figura 4B). Comparando el área bajo las curvas de efecto, el régimen de un ciclo reduce las titulaciones de IgG anti-mATG en 98%, mientras que el régimen de tres ciclos reduce las titulaciones en 69% (figura 4C). El mayor efecto del régimen de ciclo único frente al régimen de tres ciclos sugiere que el aumento de la exposición al metotrexato realmente puede antagonizar sus efectos tolerizantes, quizás matando las células que están mediando en el control sobre las titulaciones de anticuerpos.

**Ejemplo 3: El metotrexato induce un mecanismo activo de tolerancia inmunológica**

Tal como se demostró anteriormente, un tratamiento muy breve de metotrexato puede controlar significativamente las respuestas de anticuerpos a lo largo de múltiples rondas de exposición al antígeno. En este contexto, el ciclo breve fue un único ciclo de metotrexato que produce efectos duraderos (sobre las titulaciones de anticuerpos y los niveles de citoquinas) a lo largo del desarrollo de meses de ensayo. Este control duradero de la respuesta de anticuerpos sugiere que el metotrexato puede inducir con éxito una tolerancia inmunológica. Haste este punto, el metotrexato se ha evaluado en el contexto de cinco dosis consecutivas mensuales de mATG. Para evaluar también si se ha activado un

mecanismo de tolerancia inmunológica, se suspendió el tratamiento de los animales que originariamente recibieron cinco inyecciones mensuales de mATG, durante ocho semanas. Después de este periodo de descando, los animales recibieron una inyección final de mATG. Si se emplea un mecanismo de tolerancia inmunológica, las titulaciones de IgG anti-mATG no deberían de aumentar significativamente después del sexto tratamiento con mATG.

Los datos de los inventores demuestran que los animales que no fueron dosificados con metotrexato muestran una aumento en las titulaciones de IgG anti-mATG, tal como se esperaba (figura 5). Por contraste, los animales que recibieron un único ciclo de metotrexato con la primera inyección de mATG no generaron unas titulaciones de IgG anti-mATG significativamente mayores (figura 5). Se observó una tendencia similar en animales tratados con tres ciclos de metotrexato, aunque el efecto no fue tan drástico (figura 5). Cuando se compara el área bajo las curvas de efecto, el tratamiento único con metotrexato reduce las titulaciones en 99%, mientras que el régimen de tres ciclos reduce las titulaciones en 85%. Estos datos indican que el metotrexato puede mantener el control frente a las respuestas de recaída, lo cual sugiere que los ratones han desarrollado tolerancia contra este antígeno.

Aunque los animales tratados con metotrexato generan titulaciones mensurables que aumentan con tratamientos de mATG sucesivos, de modo global, los niveles de titulación en animales tratados con metotrexato fueron constantemente 100 veces menores que los observados en animales tratados solo con mATG (figura 6). El menor nivel de titulaciones de anticuerpos debería reducir significativamente el potencial de que se produzcan riesgos de seguridad y efectos en la eficacia. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, estos datos sugieren que se ha inducido un mecanismo activo de control que puede reducir significativamente las respuestas de IgG anti-mATG, y que se mantiene mucho después del tratamiento con metotrexato.

**Ejemplo 4: Un único ciclo de metotrexato puede controlar significativamente las respuestas anti-alemtuzumab**

En la esclerosis múltiple en recaída-remisión, el alemtuzumab se dosifica en

ciclos anuales y los pacientes pueden generar ADA (Coles *et al.*, N. Engl. J. Med., 359(17):1786-1801 (2008)). Puesto que el ensayo de la inmunogenicidad y la farmacocinética está desarrollándose en múltiples estudios de fase III, no está claro si los anticuerpos anti-alemtuzumab tendrán un efecto sobre la exposición, la eficacia y/o la seguridad en un subconjunto de pacientes. Así, los inventores han evaluado si un único ciclo de metotrexato puede controlar las titulaciones de ADA después de cinco ciclos de una inyección mensual de alemtuzumab. Ratones Tg huCD52 recibieron alemtuzumab (0,5 mg/kg) por vía intravenosa mensualmente durante cinco meses consecutivos. El metotrexato se administró a 0,5, 1 o 5 mg/kg quince minutos antes de la primera dosis mensual de alemtuzumab, así como 24 y 48 horas después de la dosis. La dosis de 1 mg/kg de metotrexato produjo algún beneficio, puesto que redujo las respuestas anti-alemtuzumab en 88% (figura 7A). La dosis de 5 mg/kg de metotrexato redujo con éxito las respuestas de IgG anti-alemtuzumab en 99% (figura 7A). El metotrexato parece no tener efecto sobre la tolerancia natural.

Un segundo estudio confirmó los anteriores descubrimientos. Al igual que lo indicado anteriormente, ratones transgénicos huCD52 fueron tratados con cinco dosis mensuales de alemtuzumab 0,5 mg/kg. Los ratones también se trataron con o sin tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato en conexión con la primera administración de alemtuzumab (figura 7B). Se recogieron muestras de suero a lo largo del estudio para evaluar las titulaciones anti-alemtuzumab y confirmar la tolerancia. Los datos de la titulación se obtuvieron 24 horas después de la quinta dosis mensual. Los datos demuestran que el metotrexato reduce las titulaciones de anticuerpos anti-alemtuzumab (figura 7C).

**Ejemplo 5: El metotrexato puede controlar las respuestas de anticuerpos anti-alemtuzumab en el contexto de un régimen de dosificación de alemtuzumab clínicamente pertinente**

Se realizó una serie de experimentos para evaluar si el metotrexato puede controlar con éxito las ADA en el contexto de un programa de dosificación clínicamente pertinente de alemtuzumab en ratones Tg huCD52. En la clínica, el alemtuzumab se dosifica como un ciclo inicial de cinco tratamientos diarios de 12

mg/día. Doce meses después del ciclo de tratamiento inicial en pacientes, se administra otro ciclo de tres dosis diarias de 12 mg de alemtuzumab. En el momento del segundo ciclo de tratamiento, los niveles de células B $CD19^+$ en la circulación se habían recuperado hasta los valores de línea de base; sin embargo, los niveles de células T auxiliares $CD4^+$ en la circulación y células T citotóxicas $CD8^+$ no se habían repoblado totalmente (Coles *et al.*, N. Engl. J. Med., 359(17):1786-1801 (2008)).

Inicialmente, se investigó la cinética de disminución y repoblación de los subconjuntos de células B y T en la circulación después de cinco tratamientos diarios de alemtuzumab en ratones Tg huCD52. En la sangre periférica de los ratones Tg huCD52 tratados con alemtuzumab durante dinco días consecutivos con 0,5 mg/kg (equivalente a la dosificación humana de 12 mg/kg) a través de una inyección intravenosa, las células T $CD3^+$, células T auxiliares $CD4^+$, y células T citotóxicas $CD6^+$ totales no se habían recuperado hasta los niveles de pretratamiento cuatro semanas después del tratamiento, mientras que el número de células B $CD19^+$ volvieron a los niveles control (figuras 8A-D).

Para estimular el entorno celular que muestran los pacientes en el momento del retratamiento, el alemtuzumab se readministró en ratones Tg huCD25 entre 4 y 5 semanas después del primer ciclo. Puesto que el tratamiento inicial de alemtuzumab fue un ciclo de cinco días, el metotrexato se administró 15 minutos antes de cada tratamiento diario de alemtuzumab y durante dos días después. La dosis del ciclo acumulada máxima de metotrexato administrado en este régimen es de 14 mg/kg (2 mg/kg/día), que es muy similar a la dosis acumulada de 15 mg/kg cuando el metotrexato de administra como un tratamiento de tres días de 5 mg/kg/día. Los inventores evaluaron los efectos de 2, 1 y 0,5 mg/kg/día de administración de metotrexato sobre los anticuerpos anti-alemtuzumab a lo largo de tres ciclos de tratamiento con alemtuzumab. A 1 mg/kg, el metotrexato parece controlar las titulaciones en 7 de los 8 ratones ensayados y, de modo global, reduce las titulaciones en 79% (figura 9B). A 2 mg/kg, el metotrexato reduce con éxito las ADA en 98% cuando se compara el área bajo las curvas de efecto (figura 9A).

**Ejemplo 6: El metotrexato puede mejorar la farmacocinética y la farmacodinámica de mATG**

Las ADA pueden interferir con la farmacocinética y la farmacodinámica de productos terapéuticos de proteínas. Los inventores evaluaron si las respuestas ADA de IgG anti-mATG interfieren con la farmacocinética de mATG. Se trataron ratones durante cinco meses con inyecciones mensuales de mATG solo o mATG con un único ciclo de metotrexato. El metotrexato se administró a 5 mg/kg diarios durante tres dosis. Se tomaron muestras de sangre en diversos momentos después del mes 1, mes 3, y mes 5 para ensayar el nivel de mATG en la circulación (figura 10).

En el mes 1, los niveles de mATG en la circulación fueron similares entre ambos grupos de tratamiento, pero en los meses 3 y 5 solo el grupo tratado con metotrexato tenía niveles mensurables de mATG en la circulación. Sin administración de metotrexato, los niveles de mATG medidos después de la tercera y quinta dosis de mATG fueron significativamente menores que los medidos después de la primera dosis (figura 10). Estudios previos han demostrado que el metotrexato reduce significativamente las respuestas de IgG anti-mATG. Así, parece que los anticuerpos contra mATG interfieren con la exposición a mATG y la farmacocinética.

Puesto que los anticuerpos contra mATG parecen reducir significativamente los niveles de mATG en la circulación después de una dosificación repetida, puede esperarse que la farmacodinámica de mATG cuando se redosifica se vea también negativamente afectada. Se evaluó la disminución de linfocitos en la sangre, el bazo y los nódulos linfáticos después del quinto tratamiento mensual de mATG, cuando las titulaciones son mayores. Tal como se describió anteriormente, los animales tratados con metotrexato solo recibieron un único ciclo de tratamiento.

Los niveles de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en la circulación permanecieron sin cambios después del quinto tratamiento de mATG en los animales tratados con mATG pero no con metotrexato. Sin embargo, en los animales tratados con mATG y un ciclo de metotrexato, las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en la circulación

disminuyeron significativamente (figura 11). De modo similar, este efecto se observó también en el bazo y los nódulos linfáticos. El tratamiento con metotrexato potencia la capacidad de mATG para aumentar el porcentaje de células T reguladoras en el bazo y la sangre (figuras 12A-B). Se observó un efecto similar en la sangre y los nódulos linfáticos. Se ha postulado que la mayor presencia de células T reguladoras después de un tratamiento con mATG y Thymoglobulin® contribuye a la eficacia de este producto terapéutico (Ruzek *et al.*, Blood, 111(3):1726-1734 (2008)). La capacidad del metotrexato para ayudar a mantener este efecto después de tratamientos sucesivos de mATG es un beneficio potencial añadido de reducir significativamente las titulaciones de anticuerpos IgG anti-conejo.

Hasta este punto, los estudios de farmacocinética y eficacia sugieren que los anticuerpos anti-mATG interfieren con la exposicion y la eficacia de mATG. Una comparación directa entre la titulación de IgG anti-mATG y la exposición a mATG revela que cuando las titulaciones de criterio de valoración son mayores que 10.000, el nivel de mATG en la circulación se reduce significativamente (figura 13a). Además, cuando las titulaciones de IgG anti-mATG son mayores que 100.000, se inhibe la disminución de células mediada por mATG (figuras 13b y 13c). La correlación $R^2$ entre la titulación y la disminución de células es > 0,7.

**Ejemplo 7: El metotrexato puede mejorar la farmacodinámica del alemtuzumab**

El metotrexato no solo potencia la farmacodinámica de mATG, sino que también restablece la disminución mediada por alemtuzumab de las células T y B en la circulación cuando las respuestas anti-alemtuzumab parecen neutralizar una parte de la actividad de disminución. En los estudios descritos en este ejemplo, se administraron cinco inyecciones intravenosas mensuales de alemtuzumab a ratones Tg huCD52 con y sin metotrexato. Se administró metotrexato 5 mg/kg a diario durante los tres primeros días del estudio de 6 meses. Se extrajo sangre de los animales de ambos grupos de tratamiento dos días antes de la quinta dosis y un día después de la quinta dosis de alemtuzumab. Se evaluaron las poblaciones de células mediante citometría de flujo según se describe en el

ejemplo 6.

Los datos de los inventores demuestran que la quinta dosis mensual de alemtuzumab parece que ya no disminuye las células T, puesto que el número absoluto de células T en la circulación parece similar antes y después del tratamiento (figura 14 (cada punto del tiempo representa un conjunto diferente de animales)). Por contraste, el metotrexato parece haber restablecido la capacidad del alemtuzumab para disminuir el número de células T ($P$ = 0,012). Cuando se compara el número absoluto de células T en la circulación en animales tratados solo con alemtuzumab y animales tratados con alemtuzumab y metotrexato dos días antes o un día después de la dosificacion de alemtuzumab, el número de células T en la circulación es significativamente menor en los animales tratados con metotrexato ($P$ = 0,034 y 0,02, figura 14). De modo aimilar, el tratamiento con metotrexato parece potenciar la disminución de células B por el alemtuzumab ($P = 1,2 \times 10^{-15}$, $P$ = 0,02, respectivamente), y el número de células B en la circulación disminuyó aún más en los animales tratados con metotrexato un día después del tratamiento (figura 14).

**Ejemplo 8: Un único ciclo de metotrexato puede controlar significativamente las respuestas de anticuerpos anti-rhGAA**

Los inventores también estudiaron el efecto del metotrexato en la terapia de sustitución de enzimas de rhGAA. En este estudio, los animales fueron inyectados semanalmente con rhGAA durante doce semanas consecutivas, después se dejaron descansar durante cuatro semanas y luego se reexpusieron a rhGAA en la semana 16. Los animales también recibieron un único ciclo de tres dosis diarias consecutivas de 5 mg/kg de metotrexato en la semana 1, o recibieron un ciclo en cada una de las semanas 1, 2 y 3 (con un total de tres ciclos). Se midieron las titulaciones de IgG específicas de rhGAA en los animales en la semana 0 (antes de cualquier tratamiento), 6, 8, 12, 16, 18 y 20. Los datos de los inventores demuestran que un único ciclo de metotrexato controla las respuestas anti-rhGAA a lo largo de al menos 20 semanas, así como el régimen de tres ciclos (figura 15).

También se han realizado estudios en ratones Nu/Nu deficientes en células T

para evaluar el papel de las células T en la generación de titulaciones anti-rhGAA. En estos experimentos, se ha observado repetidamente que se desarrollan pocas o ninguna ADA frente a rhGAA en estos ratones deficientes en células T (figuras 37A-B). Estos datos apoyan la idea de que las células T contribuyen a las titulaciones anti-rhGAA. Así, puesto que el metotrexato puede controlar las ADA contra rhGAA, también es probable que afecte a las respuestas de células T al rhGAA.

**Ejemplo 9: El metotrexato potencia la supervivencia mediada por mATG de transplantes alogeneicos de corazón**

Además de evaluar si el metotrexato puede potenciar la eficacia de mATG en ratones normales, los inventores investigaron si la función de mATG puede ser aumentada por el metotrexato en un escenario de transplante. Puesto que Thymoglobulin® se emplea clínicamente como terapia de inducción para prolongar la supervivencia del transplante, los inventores evaluaron si la adición de metotrexato puede aumentar la eficacia de mATG en un modelo de transplante de corazón alogeneico murino. Se administraron 20 mg/kg de mATG en los días 0 y 4, mientras que se administró metotrexato 2 mg/kg como un único ciclo de tratamiento en los días 0-6.

Además, se investigaron dosis de metotrexato menores en cuatro veces (0,5 mg/kg) administradas bajo el mismo régimen o con un régimen extendido de 12 días consecutivos. Grupos de ratones no recibieron tratamiento (control de disolución salina), recibieron solo mATG, o una combinación de los regímenes de mATG y metotrexato. De modo similar a los estudios en ratones normales, el metotrexato coadministrado con mATG reduce las titulaciones de anticuerpos anti-fármaco frente a mATG, independientemente del régimen utilizado (figura 16A y tabla 1). Además, coincidente con la reducción en las titulaciones de anticuerpos, se observó un aumento en la exposición a mATG en este escenario de transplante (figura 16). Dado el probable efecto adyuvante bajo las condiciones de una respuesta inmunológica potente coincidente contra el tejido transplante, las titulaciones de anticuerpos anti-fármaco aumentaron aún más rápidamente que en un escenario de ratones normales y produjeron unos niveles

de mATG casi indetectables a los 7 días de la primera administración de mATG (figura 16B). Por contraste, a los siete días después del transplante, las titulaciones de anticuerpos IgG anti-conejo fueron significativamente menores en los ratones tratados con metotrexato, y los niveles de mATG en la circulación fueron significativamente mayores en estos ratones. Esto subraya que, bajo condiciones de respuesta inflamatoria en curso, las respuestas de anticuerpos anti-fármaco pueden acelerarse y quizás tener un impacto aún mayor sobre la farmacodinámica y la eficacia. De manera importante, incluso bajo estas condiciones, el metotrexato tiene un profundo efecto inhibidor sobre los anticuerpos anti-fármaco mATG y potencia la exposición de mATG. Sin embargo, debido a que los niveles de mATG en la circulación aún eran de bajos a indetectables a los 21 días con una combinación de tratamiento de metotrexato y mATG, es probable que estén en juego otros mecanismos de tolerancia, dada la supervivencia del injerto >100 días. Estos resultados demuestran una sinergia notable entre el tratamiento de metotrexato y mATG sobre la supervivencia de los injertos alogénicos y muestran un nivel similar de reducción de anticuerpos anti-fármaco mATG y potenciación de la exposición de mATG, según se observa en ratones normales.

Tabla 1: Los regímenes de metotrexato reducen las titulaciones de anticuerpos anti-mATG en ratones con transplantes de aloinjertos cardíacos

| Días después del transplante | Media de titulaciones anti-mATG | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Disolución salina | mATG | mATG + MTX | | |
| | | | MTX 2 mg/kg Días 0-6 | MTX 0,5 mg/kg Días 0-6 | MTX 0,5 mg/kg Días 0-11 |
| Día 14 | 0 | 1.880.820 | 13.500 | 43.740 | 5.400 |
| Día 21 | 0 | 1.202.850 | 79.380 | n/a | n/a |
| Día 28 | n/a | n/a | n/a | 72.900 | 92.340 |

* n/a = no disponible

Datos adicionales confirman que el tratamiento de combinación de mATG y metotrexato aumenta significativamente la supervivencia de aloinjertos cardíacos además de reducir las respuestas anti-aloinjerto (figuras 17 y 18). En efecto, aunque el tratamiento con mATG o metotrexato solos proporciona un modesto beneficio de una supervivencia media extendida de 15 y 20 días, respectivamente, la coadministración de mATG y cualquiera de los regímenes de metotrexato evaluados demuestra un gran beneficio en la supervivencia del injerto cardíaco, reteniendo la mayoría de los ratones sus injertos durante más de 100 días (figura 17). Puesto que la supervivencia del injerto cardíaco continúa largo tiempo después de los tratamientos de inducción tempranos y breves de mATG y metotrexato, este régimen parece ser tolerogénico en lugar de inmunosupresor. El efecto es exclusivo a la combinación de mATG y metotrexato, puesto que otros agentes inmunosupresores (por ejemplo, micofenolato mofetilo, dexametasona, rapamicina y ciclofosfamida) no prolongan significativamente la supervivencia del injerto cuando se coadministran con mATG. De forma notable, el tratamiento solo con metotrexato fue capaz de reducir significativamente los anticuerpos anti-aloinjerto, confirmando aún más los efectos del metotrexato para controlar las respuestas de anticuerpos en general (figura 18). En este escenario, el metotrexato parece ser capaz de controlar las respuestas de anticuerpos contra múltiples antígenos del aloinjerto de corazón simultáneamente. Una mayor reducción es inducida mediante la combinación de mATG con el tratamiento de metotrexato (figura 18C).

**Ejemplo 10: El mecanismo de la tolerancia inducida por metotrexato es distinto de la función actualmente conocida y aceptada del metotrexato**

El régimen de dosificación de metotrexato descrito en los anteriores ejemplos parece invocar un mecanismo que es distinto del previamente descrito. El metotrexato es un antagonista de folato que se cree que media en sus efectos supresores induciendo la muerte de las células en proliferación. Los datos de mATG presentados anteriormente demuestran que las respuestas de anticuerpos son inducidas pero permanecen significativamente disminuidas con cada tratamiento de mATG sucesivo en los animales tratados con metotrexato. Estos datos sugieren que las respuestas de células B son gestionadas

activamente. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores establecen la hipótesis de que el metotrexato puede inducir una población o poblaciones de células reguladoras que controlan estas respuestas a medida que se producen. Los inventores han investigado el efecto del tratamiento con metotrexato sobre una diversidad de subconjuntos de células B y T esplénicas en animales tratados con Myozyme® y metotrexato, comparado con animales tratados solo con Myozyme®. Los inventores observaron un aumento significativo en la población de células B reguladoras B10 siete y ocho días después del tratamiento con Myozyme® (cuatro y cinco días después del tratamiento con metotrexato, figura 19).

Además, una serie de subconjuntos de células B activadas fueron significativamente aumentadas después del tratamiento con metotrexato (figura 20). Estas poblaciones incluyen células B de la zona marginal activadas, células B foliculares activadas y células B de transición 2 y 3 activadas. Las poblaciones celulares se definen como sigue: células B foliculares/B2: $CD19^{+}CD21^{int}CD23^{hi}$; células B de transición 2: $CD19^{+}CD93^{+}CD23^{+}IgM^{hi}$; y células B de transición 3: $CD19^{+}CD93^{+}CD23^{+}IgM^{lo}$; células B de la zona marginal: $CD19^{+}CD21^{hi}CD23^{lo}$. Una evaluación diaria de las poblaciones de células esplénicas en animales que reciben dos ciclos de Myozyme® y metotrexato, en los que Myozyme® se administra en los días 1 y 8, y se administran 5 mg/kg de metotrexato en los días 1-3 y 8-10, demuestra que estas poblaciones de células B activadas permanecen aumentadas (figura 21). Este resultado es sorprendente, porque la respuesta esperada después del tratamiento con metotrexato sería la muerta de las células en proliferación activadas. Por contraste, las poblaciones de celulas T auxiliares, células T citotóxicas y células T reguladoras activadas permanecen casi sin cambios (figura 22). Las células T auxiliares se definen como CD4+, as células T citotóxicas se definen como CD8+, y las células T reguladoras se definen como CD4+CD25+ y FoxP3+. Estos descubrimientos sugieren que el aumento en las poblaciones de células B puede ayudar a mediar en la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato.

**Ejemplo 11: El metotrexato aumenta las poblaciones de células B**

**seleccionadas en combinación con mATG**

En los anteriores ejemplos, después de cada tratamiento de mATG, las titulaciones de ADA en los ratones tratados solo con mATG y los ratones tratados con mATG y metotrexato aumentaron, lo cual sugiere que ambos conjuntos de animales contienen células B que son capaces de contribuir a una respuesta de anticuerpos (figura 6). Si este es el caso, pueden establecerse al menos dos hipótesis. Una primera hipótesis es que el metotrexato puede haber matado a casi todas las células B capaces de responder a Myozyme®, y las pocas que quedan son responsables de esta ligera respuesta. Aunque esto es posible, los datos de la citometría de flujo de múltiples experimentos no han indicado una disminución en las poblaciones de células B después de un tratamiento con metotrexato y Myozyme®. Una segunda hipótesis es que las poblaciones de células B que pueden responder a Myozyme® no son destruidas por este breve tratamiento con metotrexato, sino que permanecen y son controladas por células reguladoras después de cada exposición a Myozyme®. Hasta este punto, los datos fenotípicos describen una potenciación de los subconjuntos de células B después del tratamiento con metotrexato y Myozyme®. El fenotipo de estas células B parece similar a los subconjuntos de células B reguladoras que se han descrito en estudios animales y en pacientes transplantados tolerantes. Por tanto, los inventores han querido ensayar esta segunda hipótesis en el contexto de diferentes tratamientos.

Los animales fueron tratados con mATG mensualmente durante cinco meses y recibieron un único ciclo de 5 mg/kg de metotrexato en los tres primeros días del estudio, tres ciclos de 5 mg/kg de metotrexato, o no recibieron metotrexato (figura 23). Las diferencias en las poblaciones celulares entre los tres grupos de tratamiento después se evaluaron comparando las poblaciones en los animales un día antes de la quinta dosis de mATG y dos días después de la quinta dosis de mATG.

De modo sorprendente, cinco meses después del tratamiento con un único ciclo de metotrexato se observaron diferencias entre los ratones que recibieron un único ciclo de metotrexato y mATG y los ratones que recibieron mATG solo o

mATG con tres ciclos de metotrexato. Dos poblaciones celulares que, de modo inesperado, mostraron efectos, fueron las células B foliculares activadas y las células B de transición 3 activadas (figuras 24A-B, respectivamente). En ratones tratados con mATG solo o en combinación con tres ciclos de metotrexato, se observaron disminuciones en el número de células absoluto de estas poblaciones celulares. Sin embargo, en ratones que recibieron un único ciclo de metotrexato no se observaron disminuciones estadísticamente significativas en estas poblaciones observadas, lo cual sugiere que este régimen de dosificación de metotrexato induce algo de enriquecimiento de estas poblaciones. De modo interesante, ambas poblaciones celulares también demuestran estar enriquecidas directamente después del tratamiento con metotrexato en combinación con Myozyme® (figura 21). También se han identificado subconjuntos similares en pacientes con transplante tolerantes. Es posible que un único ciclo de tratamiento con metotrexato pueda inducir estos subconjuntos de células B que, tras la exposición al antígeno, se transforman en activados y supresores.

**Ejemplo 12: El metotrexato aumenta las poblaciones de células B seleccionadas en combinación con alemtuzumab**

Tal como se describe en el ejemplo 4, los ratones transgénicos huCD52 se trataron con una única dosis mensual de 0,5 mg/kg de alemtuzumab durante cinco meses, con o sin tres dosis diarias de 5 mg/kg/día de metotrexato en conexión con la primera administración de alemtuzumab. Las poblaciones celulares se evaluaron en la sangre y el bazo de los ratones 2 días antes y 1, 7 y/o 28 dias después de la quinta dosis de alemtuzumab mediante citometría de flujo.

En la sangre, el efecto farmacodinámico del alemtuzumab fue potenciado en los animales tratados con metotrexato 24 horas después de la quinta dosis de alemtuzumab. Se observó una disiminución de células estadísticamente significativa en los subconjuntos de células T y células B un día después de la quinta dosis, que es coherente con los datos previos que indican que las titulaciones anti-alemtuzumab son bajas en estos animales y no es probable que

interfieran con la disminución mediada por alemtuzumab. Por contraste, los ratones tratados con alemtuzumab solo tienen más anticuerpos neutralizantes de alemtuzumab que interfieren con la famacodinámica del alemtuzumab. Tal como se muestra en la figura 25A, no se produjo una disminución significativa de los subconjuntos de células T en los ratones tratados con alemtuzumab, pero los ratones tratados con alemtuzumab y metotrexato muestran una significativa disminución mediada por alemtuzumab en células T, células T auxiliares y células T reguladoras totales un día después de la dosificación de alemtuzumab. Se observaron unos resultados similares en subconjuntos de células B en la circulación (figura 25B), aunque también se observaron unas tendencias hacia un menor número de celulas en animales tratados solo con alemtuzumab. Al igual que con las poblaciones de células T en la circulación, las poblaciones de células T esplénicas disminuyeron significativamente en los animales tratados con metotrexato un día después del quinto tratamiento con alemtuzumab (figuras 26A-B).

Por contraste con la disminución de células T en los ratones tratados con alemtuzumab y metotrexato, cada una de las poblaciones de células B esplénicas que se analizaron, excepto para las células B foliculares, no estaban significativamente disminuidas (figura 27). Esta evaluación incluye la población de células B reguladoras, las células B B10. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los inventores han establecido la hipótesis de que el metotrexato puede enriquecer algunas o todas estas poblaciones de células B, que contrarresta su disminución mediada por alemtuzumab. No se espera que este enriquecimiento se produzca en el entorno fluido y rápido de la sangre, porque las células inmunológicas no se diferencian en la sangre. En su lugar, las respuestas inmunológicas se producen en el bazo y otros tejidos linfoides periféricos, en los que las interacciones de célula/célula y las respuestas iniciadas por citoquinas/quimioquinas pueden producirse en los diversos nichos de los tejidos. Esto puede explicar los diferentes efectos de la disminución mediada por alemtuzumab de células B observados en la sangre y el bazo. Estos datos son similares a los datos generados con mATG, en los que las células B esplénicas parecen estar enriquecidas en ratones tratados con un

único ciclo de metotrexato en combinación con mATG (figura 24A-B). En efecto, en todos los estudios descritos en la presente, se ha observado un enriquecimiento después del tratamiento con metotrexato cuando se evalúan las poblaciones específicas de células activadas. Sin embargo, cuando se evalúa el número total de una población celular que incluye células activadas y no activadas, tales como células B foliculares totales, no se observa un enriquecimiento significativo en los animales tratados con metotrexato.

Por contraste con las poblaciones de células esplénicas 24 horas después del tratamiento con alemtuzumab, tres días después del tratamiento con una única dosis de alemtuzumab (y no con metotrexato), los subconjuntos de células esplénicas disminuyeron significativamente (figura 28A). Es posible que a las 24 horas, la disminución de las células B pueda ser mayor en animales tratados con alemtuzumab que a los tres días después del tratamiento con alemtuzumab, puesto que la repoblación de células B puede haber empezado para la marca de los tres días. Esto se ha demostrado en varios estudios que evalúan estas poblaciones en sangre periférica. Se observó una disminución tan pronto como a las tres horas después de la dosificación en la sangre periférica. A los tres días después del tratamiento, los conjuntos de células B en la circulación aún erán significativamente menores en los ratones tratados con alemtuzumab que en los ratones control tratados con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), aunque el porcentaje de disminución no fue tan grande como a las 24 horas. El porcentaje de disminución a las 24 horas fue del 92%, mientras que la disminución a los tres días fue del 36% (figura 28B). La reconstitución de las células B parece producirse rápidamente después de una única dosis.

En conclusión, cinco meses después de que los animales recibieran metotrexato y directamente después de la exposición al antígeno, parece que el metotrexato puede haber enriquecido las poblaciones de células B que potencialmente ayudan a mediar en la inducción de tolerancia. Las poblaciones que aparecen enriquecidas son similares a las que aumentan directamente después de un tratamiento con metotrexato (figura 21). Tomado conjuntamente, esto sugiere que el metotrexato puede inducir un entorno que permite controlar activamente las respuestas inmunológicas en el momento de la exposición al antígeno,

incluso mucho después del tratamiento con metotrexato.

**Ejemplo 13: Los efectos del metotrexato sobre los niveles de citoquinas**

Las citoquinas desempeñan un papel dual en las respuestas de células B. Por ejemplo, las citoquinas activadoras de células B IL-6 y BAFF también son necesarias para la diferenciación de las células B. Puesto que el metotrexato parece aumentar las poblaciones de células B, puede esperarse que estas citoquinas aumenten. Sin embargo, la IL-6 también es proinflamatoria y, por tanto, unos niveles elevados pueden interferir con los efectos inducidos por el metotrexato. Al igual que IL-6, IL-10 está implicada en la diferenciación de las células B en células plasmáticas y también en la inmunosupresión.

Se generaron datos de BAFF a partir de muestras de suero tomadas 24 horas después de la 5ª dosis de alemtuzumab (figura 29A). Esto es una continuación de los datos celulares de este estudio presentado anteriormente. En este momento del tiempo no se observan diferencias en los niveles de BAFF (figura 29B).

Tabla 2. Diseño del estudio en ratones tratados con alemtuzumab y/o metotrexato

| n.º de grupo | Tratamiento | Animales |
|---|---|---|
| 1 | PBS | 4M/4F |
| 2 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab (x 5 días) | 4M/4F |
| 3 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab + metotrexato (0,5 mg/kg durante 8 días) | 4M/4F |
| 4 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab + metotrexato (1 mg/kg durante 8 días) | 4M/4F |
| 5 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab + metotrexato (2 mg/kg durante 8 días) | 4M/4F |

Se evaluaron los niveles de citoquinas una semana después del segundo ciclo de alemtuzumab (figura 29B). En general, una semana después del segundo ciclo de alemtuzumab, los niveles de citoquinas eran bajos. En este momento del tiempo, se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de TNF-alfa en los animales tratados con 2 mg/kg de metotrexato. Este aumento puede reflejar un cambio que está relacionado con la tolerancia inducida por metotrexato, o que es una señal de una respuesta inflamatoria. También se advirtieron tendencias en otras citoquinas, tales como un aumento aparente en IL-6 y una disminución potencialmente ligera en IL-7 (figura 30).

Las células B reguladoras se han asociado con la secreción de IL-10. Una manera de evaluar si las células B reguladoras que segregan IL-10 desempeñan un papel en la tolerancia inducida por metotrexato es evaluar si el metotrexato puede controlar las respuestas de anticuerpos en animales deficientes en IL-10. Este tipo de evaluación puede ser un desafío porque, tal como se mencionó anteriormente, la IL-10 es necesaria para la diferenciación de células plasmáticas y, por tanto, las respuestas de anticuerpos pueden ser menores en estos animales. Con esta advertencia en mente, los inventores observaron unas tendencias interesantes que sugieren que IL-10 puede desempeñar un papel en la tolerancia inducida por metotrexato.

En este estudio, los animales recibieron 20 mg/kg de Myozyme® por vía intravenosa semanalmente durante nueve semanas. Se administraron tres ciclos de metotrexato a 5 mg/kg/día, 0, 24 y 48 horas después de los primeros tres tratamientos semanales con Myozyme®. Las titulaciones anti-Myozyme® se evaluaron en las semanas 4, 6 y 9 (figura 31). Comparando la media de los valores de titulación en ratones con IL-10 inactivada tratados con rhGAA y con rhGAA/metotrexato, no se observa una disminución significativa en la titulación, aunque se observa una ligera tendencia en la semana 9. Tal como se esperaba, las titulaciones de anticuerpos no fueron tan altas en los animales con IL-10 inactivada como en los animales C57BL/6 de tipo salvaje. Las respuestas anti-rhGAA en los animales C57BL/6 de tipo salvaje tratados con rhGAA y metotrexato disminuyeron a las 4, 6 y 9 semanas. Por contraste, las titulaciones

anti-rhGAA en las semanas 4 y 6 no disminuyeron en los animales con IL-10 inactivada que fueron tratados con rhGAA y metotrexato. En la semana 9, se produjo una ligera disminución, que puede indicar una inducción retrasada de la tolerancia en ratones deficientes en IL-10. Esto sería coherente con los informes que indican que IL-10 no es la única citoquina supresora segregada por las células B reguladoras (Sagoo *et al.*, J. Clin. Investigation, 120(6):1848-1861 (2010)). El TGF-beta también se ha asociado con la respuesta de células B reguladoras. Si existe este retraso, otras citoquinas, tales como TGF-beta, pueden ser capaces de ayudar a mediar en el efecto tolerizante del metotrexato. Estos datos, así, sugieren que la IL-10 puede desempeñar un papel en la tolerancia inducida por metotrexato.

**Ejemplo 14: Un papel para el metotrexato en el tratamiento de la autoinmunidad secundaria asociada con alemtuzumab**

Los pacientes con esclerosis múltiple tratados con alemtuzumab pueden desarrollar autoinmunidad secundaria. Los trastornos autoinmunológicos más comunes que se desarrollan después de un tratamiento con alemtuzumab son los relacionados con la autoinmunidad tiroidea. Además, también se han observado púrpura trombocitopénica inmunológica y síndrome de Good Pasture en pacientes con esclerosis múltiple tratados con alemtuzumab. Los tres tipos de autoinmunidad están mediados por células B, ya que las respuestas de células B y los autoanticuerpos están directamente relacionados con el desarrollo y la patología de la enfermedad. La asociación del tratamiento de alemtuzumab con el desarrollo de estas enfermedades secundarias no se comprende bien.

Después del tratamiento con alemtuzumab disminuyen las células T y las células B. Es probable que un alto porcentaje de esta disminución de células T y B lo constituyan células autorreactivas que interaccionan con antígenos expresados en el sistema nervioso central. Como resultado, se cree que su posterior disminución por alemtuzumab contribuye al beneficio terapéutico de esta terapia con anticuerpos monoclonales. Se ha indicado que los pacientes que sufren una enfermedad autoinmunológica contienen autorreactividades (es decir, células B autorreactivas y anticuerpos antirreactivos) contra múltiples antígenos que están

asociados con una diversidad de enfermedades autoinmunológicas. Factores ambientales, fisiológicos y genéticos contribuyen a la determinación de que pueda resultar una enfermedad autoinmunológica e influyen en qué enfermedad autoinmunológica estará presente en el paciente. No es infrecuente que los pacientes que padecen un tipo de enfermedad autoinmunológica también desarrollen otra.

En el contexto del alemtuzumab, una hipótesis es que las autorreactividades inherentes que no son tan destacadas como las relacionadas con la esclerosis múltiple pueden expandirse en el entorno con menos linfocitos tras un tratamiento con alemtuzumab. Las personas que desarrollan una enfermedad autoinmunológica generalmente presentan autorreactividades frente a una serie de antígenos diferentes y, por tanto, tienen predisposición a desarrollar otras autoinmunidades (es decir, "autorreactividad inherente"). Apoyando esta idea están los datos en ratones Tg huCD52 que demuestran que el alemtuzumab no disminuye, de modo equivalente, todas las poblaciones de células B (figura 27). De hecho, parece haber un desequilibrio en el repertorio de células B que favorece una circunscripción de células B autorreactivas de baja afinidad, en particular células B de la zona marginal. De modo importante, las células B de la zona marginal se han asociado con autoinmunidad tiroidea (Segundo *et al.*, Thyroid, 11(6):525-530 (2001). Además, el subconjunto de células B reguladoras, als células B B10, que se ha demostrado que ayudan a dominar la autoinmunidad en el modelo murino de esclerosis múltiple, EAE (Matsushita *et al.*, J. Clin. Investigation, 118:3420-3430 (2008)), y que se ha demostrado que existen en seres humanos (Iwata *et al.*, Blood, 117:530-541 (2011)), disminuyen durante más tiempo que las células B de la zona marginal. Un tratamiento corto de metotrexato durante el primer ciclo de alemtuzumab puede ayudar a aumentar la representación de las células B reguladoras B10, y a restablecer el equilibrio de células B, de modo que las células B de la zona marginal estén representadas de modo más equilibrado en el repertorio de células B después de un tratamiento con alemtuzumab y/o para diferenciar las células B de la zona marginal en células B de la zona marginal reguladoras (células de la zona marginal CD1d+).

Se estudiaron las poblaciones de células B esplénicas para determinar los efectos del alemtuzumab sobre la disminución de células B (figura 32). Se administraron 0,5 mg/kg de alemtuzumab por vía intravenosa durante cinco días consecutivos a ratones Tg huCD52. De modo específico, se estudiaron las poblaciones de células B foliculares (que generalmente no son autorreactivas), las células B B1 y las células B de la zona marginal (ambas autorreactivas), las células B B10 (que son reguladoras) y las células B de transición y las células B de la zona marginal (que se cree que son capaces de diferenciarse en células B reguladoras).

Mientras que las células células B foliculares, B1 y reguladoras disminuyeron en la primera y/o segunda semana después del tratamiento con alemtuzumab, las células B de la zona marginal y las células B de transición 1 (T1) y de transición 2 (T2) no disminuyeron en ninguno de los momentos del tiempo (figura 32). Las células B de transición 3 (T3) solo disminuyeron después de una semana de tratamiento, y el número de células B reguladoras en general es menor en los ratones tratados con alemtuzumab que en los animales tratados control, aunque no se observó una significancia estadísticas en las semanas 2 y 4.

Para estudiar los efectos del metotrexato sobre las poblaciones de células B en el contexto del tratamiento con alemtuzumab, se realizó un segundo estudio, según se indica en la tabla 3 y la figura 33. De modo sorprendente, el cotratamiento de metotrexato con alemtuzumab puede producir una mayor disminución de las células B de la zona marginal poco tiempo después del tratamiento con alemtuzumab, que la disminución observada solo con alemtuzumab (figura 34), estimulando con ello un entorno inmunológico equilibrado con el nivel apropiado de células B autorreactivas de baja afinidad naturales necesario para una adecuada respuesta temprana a la infección.

En este estudio se incluyó un grupo de ratones tratados con alemtuzumab y se reveló que los ratones tratados solo con metotrexato en este régimen de ciclo corto muestran efectos celulares en ausencia de estimulación de antígenos, que puede ser diferente de los efectos observados en ratones control tratados solo con metotrexato (figura 34). Los datos generados en este estudio, en el que las

poblaciones de células B esplénicas se evaluaron dos días después del último día de tratamiento con metotrexato, sugieren que el metotrexato puede potenciar la disminución de células B de la zona marginal. Esto apoya la hipótesis de que el metotrexato, cuando se administra con alemtuzumab, puede producir un entorno celular en el que los subconjuntos de células B naturales están en un equilibrio adecuado con subconjuntos de células B no autorreactivas.

Tabla 3: Diseño del estudio en ratones tratados con alemtuzumab y/o metotrexato

| n.º de grupo | Tratamiento | Animales por grupo | Momento del sacrificio | Datos de flujo | Patología |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab | 5 | día 4 | Sangre, bazo | Nódulo linfático (LN) |
| 2 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab + metotrexato (5 mg/kg) | 5 | día 4 | Sangre, bazo | LN |
| 3 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab | 5 | día 64 | - | LN, tiroides |
| 4 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab + metotrexato (5 mg/kg) | 5 | día 64 | - | LN, tiroides |
| 5 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab | 5 | día 64 | - | LN, tiroides |
| 6 | 0,5 mg/kg de alemtuzumab + metotrexato (5 | 5 | día 64 | - | LN, tiroides |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | mg/kg) | | | | |
| 7 | metotrexato | 5 | día 4 | Sangre, bazo | LN |

Basándose en la evaluación diaria de las poblaciones celulares directamente después del tratamiento de metotrexato con Myozyme®, los inventores establecen la hipótesis de que, en el contexto del alemtuzumab, las poblaciones de células B B10 y otras poblaciones de células B potencialmente reguladoras se verán enriquecidas por el metotrexato no antes de 5-6 días después del tratamiento con metotrexato. Los inventores no han observado que estas poblaciones estén enriquecidas en un momento tan temprano como dos días después del tratamiento con metotrexato, lo cual es coherente con esta hipótesis. Por contraste, los efectos parecen ser diferentes en periodos de tiempo más largos después del tratamiento con metotrexato, tal como se observa en el contexto del tratamiento con alemtuzumab y mATG. En ambos escenarios, cinco meses después del tratamiento con metotrexato, los subconjuntos de células B aparecen enriquecidos en los ratones tratados con metotrexato uno y dos días después de la dosificación de alemtuzumab y mATG (véase la figura 35 para los datos de alemtuzumab). De modo interesante, las células B de la zona marginal en este momento también aparecen aumentadas (aunque esto no es estadísticamente significativo).

El metotrexato induce tolerancia a terapias con proteínas y antígenos de tejido cardíaco transplantado, abrogando con ello las respuestas inmunológicas de células B que se relacionan con la producción y la secreción de ADA y anticuerpos anti-aloinjerto. Por tanto, los inventores establecen la hipótesis de que el metotrexato puede no solo ayudar a controlar el entorno celular después de un tratamiento con alemtuzumab, sino que también puede inducir tolerancia a autoproteínas y mitigar las respuestas inmunológicas de células B que se relacionan con la generación de autoanticuerpos que contribuyen al desarrollo y la patología de enfermedades autoinmunológicas mediadas por células B.

Para ensayar esta hipótesis, los animales fueron dosificados mensualmente durante cinco meses con alemtuzumab. El metotrexato fue administrado a un grupo de animales a 5 mg/kg durante tres días consecutivos solo después del primer tratamiento con alemtuzumab. Dos días antes y un día después de la quinta dosis del tratamiento de alemtuzumab, los animales se sacrificaron para el análisis. Se evaluaron los niveles de citoquinas séricas antes y después del tratamiento con alemtuzumab. De modo sorprendente, estos resultados sugieren que los niveles de las citoquinas proinflamatorias MCP-1, IL-13, IL-6 e IL-12 habían disminuido en los animales tratados con metotrexato 24 horas después de la quinta dosis de alemtuzumab, cinco meses después de haber sido dosificados con cualquier cantidad de metotrexato (figura 36). Estas citoquinas no solo estimulan respuestas de células B y el reclutamiento de células inmunológicas, sino que también pueden desempeñar un papel en las reacciones de hipersensibilidad. Estos datos sugieren que el metotrexato puede ayudar a impedir las reacciones asociadas con la infusión.

**Ejemplo 15: El metotrexato induce una tolerancia inmunológica a través de la inducción específica de poblaciones de células B reguladoras**

Los datos de los inventores demuestran, de modo sorprendente, que el metotrexato induce una tolerancia inmunológica no a través del medio esperado de matar las células en proliferación, como sugieren otros (Messinger *et al.*, Genetics in Medicine, 14:135-142 (2012); y Lacaná *et al.*, Am. J. Med. Genet., Part C. Semin. Med. Genet., 160C:30-39 (2012)), sino a través de la inducción específica de poblaciones de células B reguladoras que expresan TGF-beta, IL-10 y FoxP3. Las células B de ratones tolerizados a Myozyme® por un único ciclo de metotrexato parecen transferir tolerancia inmunológica a animales no expuestos. Además, IL-10 y TGF-beta parecen ser necesarios para la tolerancia inmunológica inducida por el metotrexato. En algunos subconjuntos de células, también parece que el metotrexato induce TGF-beta que, as su vez, induce IL-10 y FoxP3. Este mecanismo es nuevo e inesperado, y cuestiona el valor de un protocolo de tolerancia inmunológico clínico actual que implica un cotratamiento con tres ciclos de metotrexato, Rituximab® (un agente de disminución de células B) y, opcionalmente, inmunoglobulina intravenosa (IVIG) (Messinger *et al.*,

*supra*). Aunque este tratamiento de combinación parece tener éxito, los datos de los inventores sugieren 1) que un único ciclo de metotrexato puede generar potencialmente titulaciones de ADA aún menores que las que se observan en la actualidad, y 2) que si se administra demasiado metotrexato y rituximab, es posible que la tolerancia inmunológica no se mantenga. Las dosis iniciales de rituximab pueden no ser tan dañinas, puesto que se cree que la disminución de células B mediada por rituximab no disminuye tan drásticamente a todas las células B en la sangre y los tejidos. Tal como se observa en los estudios descritos en la presente, aunque el alembtuzumab disminuye activamente las células B B10, el tratamiento con metotrexato sigue siendo capaz de acceder a las células que parecen ayudar a mantener la tolerancia del alemtuzumab durante muchos meses después del ciclo inicial de metotrexato. Además, al tratamiento de rituximab le sigue rápidamente una mayor representación de células B de transición, que, tal como se demuestra en la presente, parece influido por el metotrexato para inducir y mediar en la tolerancia inmunológica. Puestos que estos datos mecánicos son contraintuitivos e inesperados, un único ciclo de una dosis baja de metotrexato es un método sorprendente y eficaz para inducir tolerancia inmunológica, entre otras, a terapias con proteínas para la disminución de linfocitos.

Tal como se describió anteriormente, varios subconjuntos de células B aumentan significativamente en porcentaje de células y/o número de células poco después de la coadministración de metotrexato con un producto terapéutico de proteínas. Además, estos subconjuntos aparecen aumentados en ratones tolerazidos con metotrexato mucho después de un único ciclo de tratamiento de metotrexato (véase, por ejemplo, las figuras 24, 27 y 35). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que estas poblaciones celulares pueden mediar activamente en la inducción y el mantenimiento de la inducción de tolerancia inmunológica. Para apoyar aún más esta hipótesis, los inventores investigaron si estas poblaciones celulares expresan citoquinas y otras proteínas a menudo asociadas con la regulación inmunológica.

Un tipo de células asociadas con la regulación inmunológica son las células B B10. Las células B B10, en seres humanos y ratones, se caracterizan por su

expresión de IL-10 (Matsushita *et al.*, J. Clin. Invest., 118:3420-3430 (2008); Iwata *et al.*, Blood, 117:530-541 (2011)), y solo pueden suprimir las respuestas inmunológicas en ratones IL-10 competentes. Las células B B10 aumentaron en ratones tolerizados con metotrexato (figura 19), y los animales con IL-10 inactivada no respondieron a la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato (figura 31). Las células B B10 aisladas de animales tratados con Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato se evaluaron para la expresión de proteínas de IL-10 mediante citometría de flujo. Aunque la IL-10 es expresada en células B10 de ambos grupos de tratamiento, el número de céulas B B10 que expresan IL-10 es mayor en animales tratados con Myozyme® y metotrexato (figura 38). La IL-10 es expresada en células B B10 CD86+ y CD86- no activadas después de dos días de cultivo (figura 39). Estudios previos parecen demostrar que la expresión de IL-10 se mide solo después de una estimulación *in vitro* de células con estimulantes, tales como PMA/ionomicina o LPS (Carter *et al.*, J. Immunol., 186:5569-5579 (2011); Yanaba *et al.*, J. Immunol., 182:7459-7472 (2009)). De modo sorprendente, en los estudios de los inventores, las células B esplénicas cultivadas no necesitan estimulación ni manipulación para permitir la medición de IL-10, lo cual sugiere, más directamente, que estas células B B10 expresan IL-10 *in vivo*. Los datos proporcionados en la presente se generaron en cultivos no estimulados. Además, los inventores cree que han demostrado, por primera vez, que el metotrexato puede expandir específicamente poblaciones celulares que expresan IL-10. Además, estas poblaciones celulares parecen expresar más IL-10 cuando se aislan de animales tratados con Myozyme® y metotrexato que de animales tratados solo con Myozyme® (figura 54).

La expresión de TGF-beta está asociada con la regulación inmunológica en células T reguladoras y a menudo se relaciona con la expresión de IL-10 en células T reguladoras. Además, algunos informes parecen indicar que las células B reguladoras pueden expresar TGF-beta. Aunque nunca se ha indicado que las células B B10 expresen TGF-beta, los inventores decidieron evaluar la expresión de TGF-beta en células B B10 de ratones tratados solo con Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato utilizando la citometría de flujo. De forma inesperada, se descubrió que las células B B10 expreasn TGF-beta, y que el número de

células que expresan TGF-beta es mayor en animales tolerizados con metotrexato (figura 40A). Además, en estas células cultivadas, el TGF-beta se expresa en células B B10 activadas (CD86+) y no activadas (CD86-) (figura 40B). Esta es una nueva observación adicional de que el tratamiento con metotrexato aumenta el número de células que expresan TGF-beta. Además, el metotrexato aumenta el nivel de expresión de TGF-beta (figura 55).

FoxP3 es otra proteína asociada con la regulación inmunológica. FoxP3 es un marcador para las células T reguladoras. No se ha indicado que FoxP3 sea expresado en células B B10 en ratones. Los inventores investigaron la expresión de FoxP3 en células B B10 en presencia y ausencia de tolerancia inmunológica inducida por metotrexato utilizando la citometría de flujo. Las células B B10 parecen expresar FoxP3, tal como se observa en animales tratados solo con Myozyme® (figura 41A). El número de células B FoxP3+ parece aumentar con el tratamiento con metotrexato y Myozyme® (figura 41B). Además, las células B B10 activadas (CD86+) y no activadas (CD86-) parecen expresar FoxP3 (figura 41). Este es el primer informe que indica que las células B B10 expresan FoxP3. Los inventores han descubierto que FoxP3 es expresado en células B B10 activadas (CD86+) y no activadas (CD86-), y que la expresión de FoxP3 aumenta con un tratamiento con metotrexato (figura 56).

Debido a que otros tipos de células B aumentan significativamente con un único ciclo de tolerancia inmunológica inducida por metotrexato, los inventores evaluaron si algunos de estos tipos celulares expresan IL-10, TGF-beta y FoxP3. Se descubrió que las células B de transición 2, de transición 3 y foliculares expresan IL-10 (figura 42), TGF-beta (figura 43) y FoxP3 (figura 44), que es un resultado nuevo e inesperado para cada uno de estos subconjuntos de células B. Tal como se observa con las céulas B10, el número de células absoluto de los subconjuntos de células B IL-10, TGF-beta y FoxP3 aumenta con el metotrexato (figuas 42-44 B y C), comparado con ratones tratados solo con Myozyme® (figuras 42-44 A y C). El tratamiento con metotrexato también induce aumentos estadísticamente significativos en IL-10, TGF-beta y FoxP3 en múltiples subconjuntos celulares, según se observa por el desplazamiento en la intensidad

de fluorescencia media de estas proteínas en animales tratados con solo Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato (figuras 54-56).

Para investigar más a fondo las múltiples poblaciones de células B que expresan TGF-beta enriquecidas por un tratamiento con metotrexato y Myozyme®, los inventores después trataron de determinar si el TGF-beta es necesario para la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato. Se trataron animales con Myozyme®, o con Myozyme® y metotrexato, con o sin la presencia de 5 mg/kg de anticuerpo anti-TGF-beta (1D11, Genzyme) o control de isotipo (13C4) administrados tres veces semanales mediante inyección por vía intraperitoneal a lo largo del estudio. Se evaluaron las titulaciones de anticuerpos bisemanalmente en cuatro grupos diferentes de animales. Si el TGF-beta es necesario para la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato, entonces se esperaría que los animales tratados con el anticuerpo anti-TGF-beta no muestren titulaciones menores anti-Myozyme®. Las titulaciones de la semana 6 se muestran en la figura 45, y sugieren que el TGF-beta puede ser necesario para la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato. Debido a que este es un momento temprano, solo algunos de los animales han tenido tiempo de generar respuestas anti-Myozyme®. De modo importante, en este momento, las titulaciones parecen similares a las mostradas en la figura 15C en la semana 6, en donde dos animales en el grupo de rhGAA solo y tratados con rhGAA y metotrexato y 1D11 muestran titulaciones altas. En comparación, ninguno de los animales tratados con rhGAA y metotrexato o rhGAA y metotrexato y 13C4 mostraron titulaciones altas.

Además, se aislaron bazos de animales tratados con Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato a los que también se les coadministró 1D11 o 13C4 siete días después de un único tratamiento con Myozyme® o un único tratamiento con Myozyme® y metotrexato. En este momento, las células B de transición 2, de transición 3, B10 y foliculares que expresan IL-10, TGF-beta y FoxP3 aumentaron en animales tratados con Myozyme® y metotrexato. Las células en cada grupo después se reunieron y se cultivaron durante dos días y se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar si el tratamiento de

anti-TGF-beta con 1D11 interfiere con la expansión de las células que expresan IL-10, TGF-beta y FoxP3, en comparación con el anticuerpo control de isotipo (13C4).

De modo bastante inesperado, el tratamiento con 1D11 interfiere no solo con la expansión inducida por metotrexato de las células que expresan TGF-beta, sino también con la expansión de algunos subconjuntos que expresan IL-10 y FoxP3. Esto es verdad específicamente para las células B B10 (figura 46) y las células B foliculares (figura 47), aunque las células B foliculares FoxP3+ no parecen sufrir los efectos de 1D11. En las células B de transición 2, en donde el tratamiento con 1D11 interfiere con las células B de transición 2 que expresan TGF-beta, no se observaron efectos con las células B de transición 2 IL-10+ (incluyendo las células B de transición 2 activadas, figura 48). Además, los efectos en las células B de transición 2 FoxP3+ por 1D11 no parecen evidentes en este pequeño grupo de tratamiento, a menos que se observen las células B de transición 2 CD86+ activadas. De modo importante, estos datos sugieren que el TGF-beta inducido por metotrexato está asociado con IL-10 y FoxP3 solo en algunos tipos celulares. Para las células B de transición 3, aunque existe TGF-beta detectable en el subconjunto de transición 3 (figura 49), no hay efectos aparentes del tratamiento con 1D11 en estas células ($P<0,05$, figura 49). De manera notable, en las células B de transición 3 CD86+ activadas, aparece el mayor número de células B de transición 3 IL-10+ en ratones tratados con 1D11. Esto puede sugerir que esta población puede estar expandiéndose para ayudar a compensar la pérdida en el número de otros tipos celulares debido al tratamiento con 1D11. También debe advertirse que el tratamiento con 1D11 no afecta a los niveles basales de IL-10, TGF-beta y FoxP3 en estas células (figura 50A-C, respectivamente), sino que parece influir en los efectos del metotrexato sobre las células que expresan estas citoquinas.

En resumen, la interferencia con TGF-beta mediante la inyección de un anticuerpo TGF-beta durante la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato reduce el número de células que están expresando TGF-beta en comparación con animales tratados con el control de isotipo. Además, los aumentos típicos observados con la tolerancia inducida por metotrexato en células B B10 que

expresan IL-10 y FoxP3 son inhibidos por el tratamiento con 1D11. El tratamiento con 1D11 parece influir en los efectos del metotrexato sobre TGF-beta, IL-10 y/o FoxP3 en ciertos tipos de células B, pero no en todos los tipos de células B. Estas observaciones son sorprendentes, y sugieren que el metotrexato induce TGF-beta que, a su vez, induce IL-10 y potencialmente FoxP3 en cierta células, tales como células B B10. Aunque la asociación de TGF-beta con IL-10 y FoxP3 parece haber sido indicada anteriormente, no se ha demostrado en estos tipos celulares. Además, el metotrexato no ha sido asociado simultáneamente con esta cascada de señalización compleja.

Así, hasta este punto, los inventores han demostrado que ciertas células B aumentan significativamente con la tolerancia inducida por metotrexato, y que estas células B expresan proteínas asociadas con la inmunorregulación (supresión). Para evaluar más directamente si las propias células B están mediando en la tolerancia inducida por metotrexato, los inventores realizaron un experimento de transferencia adoptiva que evalúa si las células B esplénicas totales de ratones tolerizados con metotrexato pueden transferir tolerancia inmunológica a hospedantes no expuestos. Se realizó este experimento utilizando Myozyme® y un unico ciclo de tratamiento de metotrexato. Se aislaron bazos de animales tratado solo con Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato, 7 días después de un único tratamiento con Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato (cuando los subconjuntos de células B mencionados anteriormente han aumentado por el metotrexato), y después se purificaron todas las células B esplénicas. Estas células entonces se trasladaron a ratones receptores no expuestos a Myozyme® (figura 51A). Después de la transferencia, los receptores (junto con animales control no transferidos tratados con Myozyme® o con Myozyme® y metotrexato) se trataron semanalmente con 20 mg/kg de Myozyme®. Se recolectó sangre cada semana alterna para evaluar las titulaciones de anticuerpos anti-Myozyme®. En el momento de recolectar los bazos, se evaluó un subconjunto de células B de cada grupo donante mediante citometría de flujo para confirmar el aumento esperado en células B foliculares, B10, de transición 2 y de transición 3 TGF-beta+, IL-10+ y/o FoxP3+. Se

confirmó que los grupos donantes tenían el fenotipo esperado. El análisis de las titulaciones sugiere que las células B esplénicas totales aisladas de los animales tratados con Myozyme® y un único ciclo de metotrexato pueden transferir tolerancia inmunológica a Myozyme® en hospedantes no expuestos (figura 51B). Esto apoya la idea de que las células B pueden mediar en la tolerancia inmunológica inducida por metotrexato, y es la primera vez que se ha descrito que las células B son enriquecidas (y no destruidas) por el metotrexato para ayudar a mediar en efectos antiinflamatorios. Estos datos también cuestionan directamente el uso concomitante de un agente de disminución de células B con el metotrexato para inducir tolerancia inmunológica, que se está realizando en la actualidad en pacientes (Messinger *et al.*, *supra,* y Lacaná *et al.*, *supra*).

**Ejemplo 16: El metotrexato mejora la patología del injerto**

Los inventores también han generado datos adicionales en el contexto de la globulina anti-timocitos murinos que demuestra que el metotrexato no disminuye las células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+), CD4+, CD8+ y las células B CD19+ totales en animales normales (figura 52) y en animales transplantados (figura 53). Cuando se comparan animales normales tratados con IgG de conejo no especifica sola o en combinación con metotrexato, no se produjeron cambios significativos en las poblaciones celulares en la sangre y el bazo (figura 52). Además, cuando se comparan las poblaciones aisladas de animales tratados con mATG solo o con mATG y metotrexato, no se produjo disminución potenciada. En su lugar, los inventores observaron solo una extensión de los efectos de las células T reguladoras, CD4+, y CD8+ mediados por mATG, que es probable que fuera debido a una mayor exposición de mATG por el metotrexato (figura 52). Además, el tratamiento solo con metotrexato en animales que reciben un transplante alogeneico no disminuye estos subconjuntos de células concretos (figura 53). El menor número de células T CD4+ y CD8+ en animales tratados con mATG y metotrexato, comparado con los animales tratados con mATG solo puede explicarse mediante el efecto prolongado de mATG en el contexto del tratamiento con metotrexato. De modo importante, el metotrexato no induce una disminución en células B, tal como se

esperaría si el metotrexato estuviese matando las células B activadas para reducir las respuestas de anticuerpos en animales normales o transplantados (figuras 52 y 53). Estos datos sugieren que los efectos del metotrexato sobre anticuerpos antifármaco pueden no estar mediados por la disminución, inducida por antifolato, de las células B activadas. Tal como se esperaba, el tratamiento con mATG tampoco afectó al número de células B totales en este modelo de aloinjerto cardíaco heterotópico. En conjunto, el tratamiento combinado de mATG y metotrexato atenúa la gravedad de la patología del rechazo del injerto y está asociado con una disminución de infiltraciones de células T en el injerto, pero no con el aumento de células con un fenotipo de células T reguladoras. Esto resulta coherente con los resultados generados en el contexto de Myozyme® y alemtuzumab.

Para evaluar los cambios histológicos en injertos de supervivencia larga, así como para entender el mecanismo de la combinación de mATG y metotrexato sobre la supervivencia del injerto, se recogieron injertos cardíacos y se evaluaron para la patología, así como para la composición celular. En particular, debido a que las células T reguladoras se han asociado con la supervivencia del injerto a largo plazo en el transplante, son inducidas por Thymoglobulin® y mATG, y se ha demostrado que son responsables del rechazo al injerto retrasado tras un tratamiento con mATG, las células CD3+Foxp3+, que portan un fenotipo coherente con las células T reguladoras, han sido evaluadas. De modo específico, se recogieron injertos cardíacos del grupo tratado con la combinación de mATG y metotrexato y del grupo singeneico no tratado al menos 100 días después del transplante. Los injertos de los ratones no tratados y de los ratones tratados con mATG solo o con metotrexato solo se tomaron después del rechazo del injerto para la comparación. Secciones de tejido teñidas con H&E o tricromo de Masson o inmunoteñidas con anticuerpos anti-CD3 y anti-Foxp3 se evaluaron con microscopio para determinar los cambios histológicos indicativos del rechazo del transplante, por ejemplo, miocarditis de suave a moderada, degeneración miocárdica y necrosis, vasculopatía de aloinjerto cardíaca (CAV) e infiltración de células T. En el día 100, los aloinjertos de animales cotratados con mATG y metotrexato revelaron lesiones CAV de mínimas a suaves y mostraron poca o

ninguna degeneración miocárdica y miocarditis. Los cambios histológicos que sugieren un rechazo del injerto no fueron evidentes en los injertos singeneicos en este momento tardío (figura 54). Los aloinjertos del grupo con tratamiento combinado mostraron una infiltración suave de células T en el miocardio con unas pocas células infiltradas en los vasos sanguíneos miocárdicos. Los injertos singeneicos contienen muy pocas células T dentro del miocardio. Se observaron agrupaciones de células T con algunas células inmunopositivas duales a CD3 y Foxp3 en el epicardio de los injertos singeneicos y los aloinjertos tratados con la combinación. Así, los injertos de supervivencia larga mostraron señales mínimas de rechazo del injerto, lo cual se correlaciona con una menor inflamación.

Debido a que es más probable que los efectos del tratamiento de combinación de mATG y metotrexato se produzcan cerca del momento del transplante, también se evaluó la patología y se caracterizó la infiltración celular de aloinjertos de corazón transplantados a los 7 (para ratones no tratados) o 14 (para todos los grupos de tratamiento) días después del transplante. Los aloinjertos no tratados mostraron una patología de rechazo del injerto, que incluye miocarditis, degeneración miocárdica y necrosis en las ramas epicárdicas e intramiocárdicas de las arterias coronarias. Por contraste, los aloinjertos aislados de animales tratados con mATG y metotrexato revelaron CAV menos graves. Esto se observó en comparación con los aloinjertos de animales no tratados, así como de animales tratados con mATG o con metotrexato (figura 58). Tal como se esperaba, los injertos singeneicos de los ratones no tratados mostraron poca o ninguna patología en este momento. Se observó infiltración de células T CD3+ en el miocardio y el epicardio en aloinjertos de ratones no tratados y en los ratones tratados con mATG o metotrexato solos. También estaban presentes unas pocas células T CD3+ en la infiltración de células inflamatorias asociada con las lesiones CAV en estos injertos. Por contraste, los aloinjertos de los animales tratados con la combinación de mATG y metotrexato muestran una infiltración de células T CD3+ sustancialmente menor en el miocardio y solo una infiltración de células T CD3+ mínima en el epicardio. Los injertos cardíacos singeneicos mostraron una infiltración de células T CD3+ mínima solo en el epicardio. Una pequeña proporción de células T dentro de las

infiltraciones de células inflamatorias en el epicardio parecía tener un fenotipo de células T reguladoras, según indica una inmunorreactividad dual a CD3 y Foxp3, pero esta frecuencia no parece ser mayor dentro de las infiltraciones inflamatorias que en otros grupos. Por tanto, también se observó una menor patología poco después del tratamiento con mATG y metotrexato, y se asoció con una menor infiltración de células T y restringida al epicardio.

## REIVINDICACIONES

1.- Un método para inducir tolerancia inmunológica en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo, induciendo con ello una tolerancia inmunológica hacia el producto terapéutico en el sujeto.

2.- Un método para inhibir las respuestas de anticuerpos a un producto terapéutico de proteínas en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato en un único ciclo, inhibiendo con ello las respuestas de anticuerpos contra el producto terapéutico en el sujeto.

3.- Un método para aliviar una reacción de infusión contra un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aliviando con ello una reacción de infusión contra el producto terapéutico en el sujeto.

4.- Un método para reducir la autoinmunidad secundaria en un sujeto autoinmune que necesita tratamiento con un producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, reduciendo con ello la autoinmunidad secundaria en el sujeto.

5.- Un método para aumentar la eficacia de un producto terapéutico en un sujeto que necesita tratamiento con el producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello la eficacia del producto terapéutico de proteínas en el sujeto.

6.- Un método para aumentar el porcentaje de células T reguladoras en la población de células T en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello dicho porcentaje en dicho sujeto.

7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de proteínas.

8.- Un método para aumentar el porcentaje de células B reguladoras en la población de células B en un sujeto que necesita tratamiento con un producto terapéutico de anticuerpos, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, aumentando con ello dicho porcentaje en dicho sujeto.

9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

10.- Un método para prolongar la farmacocinética de un agente treapéutico en un sujeto, que comprende administrar metotrexato al sujeto, antes, durante o después de la administración del agente terapéutico, en una cantidad eficaz para prolongar la farmacocinética del agente terapéutico.

11.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el sujeto es un ser humano.

12.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de anticuerpos.

13.- El método de la reivindicación 12, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales.

14.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un agente de disminución de linfocitos.

15.- El método de la reivindicación 14, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es alemtuzumab.

16.- El método de la reivindicación 15, en el que el sujeto es un paciente con esclerosis múltiple.

17.- El método de la reivindicación 12, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos policlonales.

18.- El método de la reivindicación 17, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un anticuerpo de globulina anti-timocitos de conejo policlonal.

19.- El método de la reivindicación 18, en el que el sujeto es un paciente humano que necesita un transplante de órganos, tiene anemia aplásica y/o presenta o

está en riesgo de presentar la enfermedad del injerto frente al receptor.

20.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el producto terapéutico es una enzima.

21.- El método de la reivindicación 21, en el que la enzima es alfa-galactosidasa A humana.

22.- El método de la reivindicación 22, en el que la enzima es alfa-glucosidasa ácida humana.

23.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que la cantidad eficaz es de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg.

24.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el único ciclo de metotrexato consiste en 1 día de administración de metotrexato, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 días consecutivos de administración de metotrexato.

25.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el único ciclo de metotrexato se administra entre 48 horas antes y 48 horas después del inicio del tratamiento terapéutico.

26.- Un método para disminuir el número de linfocitos en un paciente humano que lo necesite, que comprende:

tratar al paciente con un agente de disminución de linfocitos, y

administrar metotrexato al paciente, antes, durante o después del tratamiento con el agente de disminución de linfocitos, en una cantidad eficaz para inducir una tolerancia inmunológica en el paciente hacia el agente de disminución de linfocitos.

27.- El método de la reivindicación 26, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

28.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, en el que el agente de disminución de linfocitos es un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales.

29.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, en el que el

agente de disminución de linfocitos es un producto terapéutico de anticuerpos policlonales.

30.- El método de la reivindicación 28, en el que el producto terapéutico de anticuerpos monoclonales es alemtuzumab.

31.- El método de la reivindicación 28, en el que el producto terapéutico de anticuerpos monoclonales es rituximab.

32.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-31, en el que el paciente es un paciente con esclerosis múltiple.

33.- El método de la reivindicación 32, en el que el paciente tiene esclerosis múltiple en remisión-recaída.

34.- El método de la reivindicación 29, en el que el producto terapéutico de anticuerpos policlonales es un anticuerpo policlonal de globulina anti-timocitos.

35.- Un método para inducir tolerancia inmunológica en un sujeto que necesita un transplante de tejidos, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato, induciendo con ello una tolerancia inmunológica hacia el tejido transplantado en el sujeto.

36.- El método de la reivindicación 35, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

37.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 o 36, en el que el tejido transplantado es tejido renal o tejido cardíaco.

38.- El método de la reivindicación 37, en el que el sujeto también recibe un agente para la inmunomodulación.

39.- El método de la reivindicación 38, en el que el agente para la inmunomodulación es un inmunosupresor.

40.- El método de la reivindicación 38, en el que el agente para la inmunomodulación es un anticuerpo de globulina anti-timocitos policlonal.

41.- Un método para inhibir las respuestas de células T en un sujeto que necesita un producto terapéutico o un transplante de tejidos, que comprende

administrar al sujeto una cantidad eficaz de metotrexato antes, al mismo tiempo o después de tratar al sujeto con el producto terapéutico o del transplante de tejidos, inhibiendo con ello las respuestas de células T en el sujeto.

42.- El método de la reivindicación 41, en el que la cantidad eficaz de metotrexato se administra en un único ciclo.

43.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 o 42, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de proteínas.

44.- El método de la reivindicación 43, en el que el producto terapéutico es un producto terapéutico de anticuerpos.

45.- El método de la reivindicación 44, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos monoclonales.

46.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 44 o 45, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un agente de disminución de linfocitos.

47.- El método de la reivindicación 46, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es alemtuzumab.

48.- El método de la reivindicación 47, en el que el sujeto es un paciente con esclerosis múltiple.

49.- El método de la reivindicación 44, en el que el producto terapéutico de anticuerpos es un producto terapéutico de anticuerpos policlonales.

50.- El método de la reivindicación 49, en el que el producto terapéutico de anticuerpos policlonales es un anticuerpo de globulina anti-timocitos de conejo policlonal.

51.- El método de la reivindicación 43, en el que el tejido transplantado es tejido renal o tejido cardíaco.

52.- El método de la reivindicación 51, en el que el sujeto también recibe otro agente para la inmunomodulación.

53.- El método de la reivindicación 52, en el que el agente para la inmunomodulación es un inmunosupresor.

## RESUMEN

La invención proporciona métodos para reducir las respuestas inmunológicas no deseadas, tales como las respuestas de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y otras respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o B, en pacientes, utilizando un tratamiento con metotrexato.