

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 395**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2016 PCT/EP2016/081286**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2016 E 16822423 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2021 EP 3390450**

54 Título: **Anticuerpos humanizados anti-CD28 formulados para la administración a humanos**

30 Prioridad:

15.12.2015 EP 15200281

22.11.2016 EP 16306537

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

73 Titular/es:

OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (100.0%)

22 Boulevard Benoni Goullin

44200 Nantes, FR

72 Inventor/es:

VANHOVE, BERNARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 862 395 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados anti-CD28 formulados para la administración a humanos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia. Más específicamente, la presente invención proporciona un régimen de dosificación novedoso y ventajoso para un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' pegilado humanizado descrito previamente como "FR104" (Poirier et al., 2012).

ANTECEDENTES Y TÉCNICA ANTERIOR

[0002] CD28 es una molécula coestimuladora positiva de células T dominante. FR104 es un fragmento de anticuerpo Anti-CD28 Fab' monovalente humanizado pegilado en el extremo C-Terminal de la cadena pesada (WO 2011/101791, US 8,785,604 B2). FR104 se origina a partir de la humanización de un anticuerpo murino llamado CD28.3. Este anticuerpo ha sido seleccionado sobre la base de su potente actividad antagonista contra la unión de CD80 a CD28 en formato Fab' (Vanhove et al., 2003) y su incapacidad inherente para inducir la activación de células T independientes del antígeno (un proceso llamado superagonismo), debido a que su epítipo diana se encuentra fuera del bucle antigénico C'D de CD28, que se ha demostrado que es obligatorio para el superagonismo (Poirier et al., 2012a).

[0003] El FR104 se une a CD28 de primates humanos y no humanos (pero no a CD28 de ratón, rata, conejo o perro) y antagoniza la unión de CD28 a sus correceptores CD80/CD86. Por lo tanto, los correceptores CD80/CD86 permanecen libres para interactuar con los coestimuladores negativos dominantes Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y células programadas muerte 1 ligando 1 (PDL-1), que inhiben las células T efectoras y son obligatorias para la función supresora de las células T reguladoras. El mecanismo de acción de FR104 es, por tanto, doble: 1) de forma directa, bloquea las señales mediadas por CD28 en las células T y 2) de forma indirecta, promueve señales mediadas por CTLA-4 y PDL-1. Este mecanismo de acción es diferente de las terapias existentes destinadas a bloquear la coestimulación de células T como abatacept (Orencia®) o belatacept (Nulojix®) que se unen a CD80 y CD86 y bloquean la función de moléculas coestimuladoras positivas y negativas (bloqueando el acceso a CD28, CTLA-4 y PDL-1).

[0004] Debido a su naturaleza monovalente, la ausencia de un dominio Fc y al epítipo diana se encuentra fuera del epítipo diana de anticuerpos superagonistas (como TGN1412), FR104 es un anticuerpo antagonista que no puede estimular las células T humanas, incluso en presencia de anticuerpos anti-fármaco (Poirier et al., 2012). Los datos preclínicos disponibles demuestran la ausencia de propiedades agonistas y superagonistas en las células T humanas *in vitro* y *trans-vivo*, en ratones humanizados, así como *in vivo* en babuinos, una especie en donde, al igual que en los humanos, las células T liberan citocinas después de la interacción con anticuerpos superagonistas anti-CD28 (Poirier et al., 2014).

[0005] FR104 quedó antagonista en todas estas situaciones. No se pudo observar proliferación o secreción de citocinas incluso si FR104 estaba recubierto, reticulado con anticuerpos secundarios o en presencia de anticuerpos anti-CD3 (Poirier et al., 2012). Por el contrario, FR104 inhibió de forma dependiente de la dosis la proliferación de células T cuando las PBMC humanas fueron estimuladas por el anticuerpo anti-CD3. En estos ensayos, los anticuerpos anti-CD28 superagonistas de control positivo indujeron consistentemente la proliferación de células T humanas y/o la liberación de citocinas.

[0006] Debido a su actividad inmunosupresora selectiva dirigida a las células T efectoras, FR104 se investiga primero para el uso en la artritis reumatoide y en el trasplante (receptores de trasplante renal y la enfermedad de injerto contra huésped [GVHD] después de trasplante de células madre). Existe un beneficio directo esperado de FR104 para los pacientes con respuestas inmunes alogénicas o autodesreguladas que consisten en una eficacia mejorada de la inmunosupresión de células T y en un control a largo plazo de las respuestas patológicas de células T y B debido a la preservación de los mecanismos de regulación inmunitaria. Para los pacientes con trasplante de riñón, esto debería reducir los eventos de rechazo temprano y mejorar los resultados a largo plazo. Para los pacientes que padecen una EICH de moderada a grave después de un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, esto debería mitigar la alorreactividad de las células T efectoras. Para los pacientes que padecen artritis reumatoide, esto debería traducirse en una rápida mejora de los síntomas clínicos y recaídas menos frecuentes. Las evaluaciones preclínicas disponibles incluyen la demostración de eficacia en el trasplante de riñón en primates (Poirier et al., 2015) y en GVHD en ratones humanizados (Poirier et al., 2012) y primates (Kean et al., 2014), en modelos experimentales de autoinmunidad. encefalomiелitis (Haanstra et al, JI 2015), inflamación de la piel en un modelo de primate de psoriasis humana (Poirier et al, JI 2015) (Poirier et al, Experimental Dermatol.2015) y una artritis inducida por colágeno en primate, modelo de artritis reumatoide (Vierboom et al., 2015).

[0007] Mecánicamente, se ha demostrado que FR104 bloquea alorreactividad de una manera dependiente CTLA-4, que confirma que el mecanismo teórico de la acción de hecho opera *in vivo* (Poirier et al., 2012).

[0008] El FR104 se produce mediante tecnología recombinante clásica en células de ovario de hámster chino (CHO). Es un fragmento de anticuerpo Fab' pegilado humanizado que consta de (i) una primera proteína de SEQ ID NO: 1, que está

pegilada en su C-terminal, y (ii) una segunda proteína de SEQ ID NO: 2. Después de la purificación, es unido químicamente a un resto de polietilenglicol (PEG) para aumentar su vida media plasmática. El extremo C-terminal del dominio CH1 se ha diseñado para adaptarse a una monopegilación. El residuo de PEG es un 2x20 kDa ramificado unido a la cisteína C-terminal mediante un anillo de maleimida. Todos los procesos de producción, purificación y viales se realizan en condiciones GMP.

[0009] Poirier et al (2012), mostró por análisis de resonancia de plasmones que constante de disociación FR104 a CD28 es aproximadamente 4,6 nM. El cálculo del nivel mínimo de efecto biológico anticipado (MABEL) y la selección de la dosis para el primer ensayo clínico en humanos (FIH) con FR104 se basaron en los datos publicados por Poirier et al. (2012).

[0010] Bas-Bernardet Le et al. (2013) 11th World Congress on Inflammation (publicado en línea en <http://static.springer.com/sgw/documents/1427011/application/pdf/IAIS+Abstracts+Natal+2013.pdf>) revela la evaluación preclínica de FR104, un antagonista anticuerpo Fab' monovalente anti-CD28, en un modelo de primate DTH de inflamación de la piel.

[0011] Poirier et al. (2015) Journal of Immunology 196 (1) 274-283 describe la evaluación de un antagonista selectivo de CD28 en primates no humanos.

[0012] "Project Final Report: TRIAD, publicado en línea en <http://cordis.europa.eu/docs/results/281/281493/final-triad-report-ce-final-201504010-final.pdf> revela la restauración de la tolerancia en enfermedades autoinmunes por manipulación selectiva de la vía de CD28 coestimuladora.

[0013] Haanstra et al. (2015) The Journal of Immunology, US 194 (4) 1454-1466 describe los efectos selectivos de bloqueo de la coestimulación mediada por CD28 de células T en monos Rhesus.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0014] Aquí se incluye un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' que consiste en un heterodímero de (i) una primera proteína de la SEQ ID NO: 1, que está pegilada en su extremo C-terminal, y (ii) una segunda proteína de SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de una afección susceptible de mejorarse o prevenirse mediante la inhibición de una respuesta inmune de células T, siendo dicha afección un rechazo de tejido trasplantado, una vasculopatía crónica por aloinjerto, una enfermedad de injerto contra huésped, una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T, aterosclerosis, una enfermedad inflamatoria, o hipersensibilidad de tipo IV, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' se administra por vía intravenosa a un sujeto humano que lo necesita y en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' está entre 0,05 y 1,5 mg/kg de peso corporal en un esquema de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada más de 8 semanas.

[0015] Como se describe en la parte experimental a continuación, los datos obtenidos por los primeros experimentos del ensayo clínico fueron muy sorprendente y condujeron a que los inventores llegasen a la conclusión de que el verdadero valor K_D es al menos 10 veces menor que el valor de 4,6 nM medido *in vitro*.

[0016] Los inventores, en el desarrollo de sus investigaciones, revisaron el modelo de compromiso farmacocinético/diana (PK/TE) para capturar los datos de PK obtenido y ocupación del receptor (RO). Según este modelo revisado:

- la dosificación de 0,05 mg/kg puede alcanzar un RO% medio >80% durante 2-3 semanas; y
- la dosificación de 0,2 mg/kg puede alcanzar un RO% medio >80% durante 4-5 semanas.

[0017] La presente descripción por lo tanto se refiere al uso de FR104 para el tratamiento de cualquier condición susceptible de ser mejorado o impedido por la inhibición de una respuesta inmune de células T, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de FR104 a un sujeto humano en necesidad del mismo, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de FR104 está entre 0,05 y 1,5 mg/kg de peso corporal en un esquema de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas. Estas administraciones pueden realizarse durante períodos prolongados (de varios meses a varios años) o interrumpirse después de una o pocas administraciones. También pueden interrumpirse durante un tiempo (unos meses o años) y renovarse si el estado del paciente justifica un nuevo tratamiento.

[0018] La descripción se refiere a un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' que consiste en un heterodímero de (i) una primera proteína de la SEQ ID NO: 1, que está pegilada en su extremo C-terminal, y (ii) una segunda proteína de SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de cualquier afección susceptible de mejorarse o prevenirse mediante la inhibición de una respuesta inmune de células T, en donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' a un sujeto que lo necesita y donde la cantidad terapéuticamente eficaz del fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' está entre 0,05 y 1,5 mg/kg de peso corporal en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada más de 8

semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y menos de 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal administrados en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o una vez cada cinco semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada al menos 8 semanas para 0,5 mg/kg una vez cada al menos 8 semanas para 1 mg/kg y una vez cada más de 8 semanas para dosis superiores a 1 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' induce al menos un 80% de ocupación del receptor CD28 durante el período de tiempo entre dos administraciones de dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab'. En algunas realizaciones, la condición susceptible de ser mejorada o prevenida mediante la inhibición de una respuesta inmune de células T es un órgano, tejido o disfunción celular trasplantado, una enfermedad autoinmune mediada por linfocito T, aterosclerosis o una enfermedad inflamatoria en dicho sujeto. En algunas realizaciones, la condición susceptible de mejorarse o prevenirse mediante la inhibición de una respuesta inmune de células T es un rechazo de trasplante de riñón, una vasculopatía crónica del injerto, una enfermedad de injerto contra huésped, una encefalomiелitis autoinmune, una psoriasis, una artritis reumatoide, una esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, aterosclerosis, diabetes tipo 1 o hipersensibilidad tipo IV. En algunos casos, el fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' se administra a dicho sujeto por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o tópica mediante inyección intratecal. Otro aspecto de la presente divulgación es una composición farmacéutica para inhibir una respuesta inmune de células T en un sujeto humano que lo necesite, que comprende FR104 en una cantidad comprendida entre 3 y 120 mg, preferiblemente menos de 35 mg por dosis, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende entre 3 y 14 mg de dicho fragmento de anticuerpo Anti-CD28 Fab'. En algunos casos, la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica o intratecal. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende hialuronidasa humana recombinante.

[0019] Una jeringa que comprende la composición farmacéutica descrita anteriormente es parte de la presente descripción también. La jeringa puede adaptarse para uso subcutáneo.

[0020] La presente descripción también se refiere a un kit de partes que comprende dosis mensuales de FR104, en donde cada dosis comprende una cantidad de 3 a 120 mg de FR104.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

[0021]

Figura 1: Estudio de FR104 farmacocinético y la ocupación de receptor CD28. **A.** Transcurso de tiempo de concentración de FR104 en el suero de voluntarios que recibieron diferentes concentraciones de FR104 de la siguiente manera: el Grupo 1 (círculo negro) recibió 0,005 mg/kg, el Grupo 2 (cuadrado negro) recibió 0,05 mg/kg, el Grupo 3 (triángulo negro arriba) 0,2 mg/kg y Grupo 4 (triángulo negro hacia abajo) 0,5 mg/kg. **B.** Transcurso del tiempo de la ocupación del receptor en cada voluntario de cada Grupo que recibe FR104 (como se menciona anteriormente).

Figura 2: Ocupación del receptor CD28 predicha frente a observada. **A.** Porcentaje del RO previamente predicho durante un transcurso de tiempo de 20 semanas para cada concentración de FR104 determinada con el Kd calculado *in vitro*. **B.** Transcurso del tiempo del porcentaje predicho modificado del RO basado en el Kd recalculado en comparación con el porcentaje observado del RO.

Figura 3: Expresión del receptor después de la infusión de FR104. En cada Grupo que recibió FR104, se analizó la expresión de CD28 en el suero de voluntarios mediante citometría de flujo durante un transcurso de tiempo. El Grupo 1 (círculo negro) recibió 0,005 mg/kg, el Grupo 2 (cuadrado negro) recibió 0,05 mg/kg, el Grupo 3 (triángulo hacia arriba) recibió 0,2 mg/kg y el Grupo 4 (triángulo hacia abajo) recibió 0,5 mg/kg.

Figura 4: medición de anticuerpos anti-KLH (IgG). Porcentaje del anticuerpo anti-KLH presente en el suero de voluntarios 15 días después de la primera infusión en cinco grupos diferentes que recibieron: con placebo, con FR104 a 0,02 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1,5 mg/kg. Este porcentaje representa la relación entre la concentración de anticuerpos en el suero el día 1 (primera infusión) y el día 15.

Figura 5: Datos farmacocinéticos y farmacodinámicos. **A.** Concentraciones séricas medias de FR104 \pm SEM (escala semi-logarítmica) desde la predosis hasta el final del estudio. Los grupos de tratamiento que se muestran son: dosis únicas ascendentes (símbolos negros), dosis únicas ascendentes + inmunización KLH (símbolos vacíos), dosis múltiples ascendentes (MAD, símbolos sombreados). LLOQ: límite inferior de cuantificación. N = 3-5 sujetos por grupo de tratamiento. **B.** Ocupación media del receptor CD28 \pm SEM en los grupos de tratamiento FR104 indicados en A desde la predosis hasta el final del estudio. N = 3-5 sujetos por grupo de tratamiento. La evaluación de la ocupación del receptor en sujetos a los que se les administró placebo dio como resultado una señal de fondo que varió entre 0 y 5%.

Figura 6: Análisis de citometría de flujo del nivel de expresión de CD28, frecuencia de subpoblaciones de linfocitos T y frecuencia de linfocitos T activados en muestras de sangre completa estabilizadas. Las subpoblaciones de células T se definieron usando la siguiente estrategia de activación en células CD45+ CD3+: Treg natural (nTreg): CD25+ CD127 bajo en CD4+; activado: CD69+ o CD25+; células T de memoria: CD45RO+; ingenuo: CD45RO-

CCR7+; memoria central (MC): CD45RO+ CCR7+; memoria efectora (ME):

CD45RO+ CCR7-; TEMRA: CD45RO- CCR7-. Los símbolos se refieren a los grupos definidos en la Figura 1A, más * para los sujetos tratados con placebo (n = 12). Los datos son medias \pm SEM.

Figura 7: Citocinas de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 en suero en FR104 y receptores de placebo desde la predosis hasta el final del estudio. Barra punteada: límite inferior de cuantificación. Los datos son medias \pm SEM. SAD: dosis únicas ascendentes. SAD + KLH, sujetos con dosis única ascendente inmunizados con KLH. MAD: múltiples dosis ascendentes. Los símbolos se refieren a los grupos definidos en la Figura 1A, más * para los sujetos con placebo en grupos SAD (n = 6), SAD + KLH (n = 8) y MAD (n = 4). Otras citocinas evaluadas (IL 12p70 IL-1 β , IL-2, IL-4) resultaron negativas para todos los muestreos (no mostrados).

Figura 8: Estimulación ex vivo de células sanguíneas con SEB + LPS en hemocultivos (TruCulture®). A. Las muestras de sangre al inicio del estudio no se estimularon o se estimularon con SEB + LPS y se mantuvieron durante 24 h en cultivo. A continuación, se evaluaron las citocinas en el plasma mediante ELISA. Los puntos representan sujetos individuales. B. Medición de la secreción de IL-2 mediante muestras de sangre estimuladas con SEB + LPS extraídas en los puntos de tiempo indicados en grupos de dosis única ascendente (con o sin estimulación de KLH) que reciben FR104 al nivel de dosis indicado. Solo se han incluido en el análisis cultivos de los donantes analizados en este estudio que muestran respuestas suficientes a los estímulos al inicio (> 100 pg/ml): Placebo (n = 9), 0,02 mg/kg (n = 5), 0,20 mg/Kg (n = 9), 0,50 mg/kg (n = 9) y 1,50 mg/kg (n = 3) Los datos son concentraciones medias de IL-2 normalizadas a puntos de tiempo T0, \pm SEM. *: p < 0,05; ****: p < 0,0001.

Figura 9: Niveles de anti-KLH IgG (ng/mL) a lo largo del tiempo por grupo de tratamiento. Se extrajeron muestras de suero en los puntos de tiempo indicados y se evaluaron mediante ELISA anti-KLH. Los datos son medias \pm SEM. Línea punteada: límite inferior de cuantificación.

Figura 10: Seguimiento del estado del VEB desde la predosis hasta el final del estudio. La carga viral de EBV se evaluó en sangre mediante PCR en los puntos de tiempo indicados. Los anticuerpos IgM contra el antígeno de la cápside del VEB (VCA) también se evaluaron en suero para medir la reactivación inmune anti-VEB. Los datos son medias \pm SEM. LLOQ: límite inferior de cuantificación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0022] En todo el presente texto, se utilizan las siguientes definiciones:

FR104

[0023] "FR104" designa un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' que consiste en un heterodímero de (i) una primera proteína de SEQ ID NO: 1, que está pegilada en su extremo C-terminal, y (ii) una segunda proteína de SEQ ID NO: 2. Según una realización particular, FR104 es un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' que consiste en un heterodímero de (i) una primera proteína de SEQ ID NO: 3, que está pegilada en su extremo C-terminal, y (ii) una segunda proteína de SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, un PEG birramificado de 2x20 kDa se puede unir a la cisteína C-terminal de el dominio CH1 a través de un anillo de maleimida.

Tratamiento

[0024] Como se usa en este documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratado" se refieren a cualquier reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad. Por ejemplo, en una patología como la artritis reumatoide, la reducción de uno o más síntomas de la misma se considera un tratamiento.

[0025] Otras definiciones se especifican a continuación, cuando sea necesario.

[0026] Un primer aspecto de la presente descripción es el uso de FR104, en el tratamiento de cualquier condición susceptible de mejorarse o prevenirse mediante la inhibición de una respuesta inmune de células T, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' se administra a un sujeto humano que lo necesita y en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' está entre 0,05 y 1,5 mg/kg de peso corporal en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 9 semanas o una vez cada más de 9 semanas.

[0027] Un método para inhibir una respuesta inmune de células T en un sujeto humano en necesidad del mismo es también parte de la presente divulgación. Según este método, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de FR104, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un horario de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 9 semanas o una vez cada más de 9 semanas.

[0028] Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento según la presente invención se puede administrar durante largos períodos de tiempo (varios meses a varios años) o se detiene después de una o unas pocas administraciones, dependiendo de la condición del paciente. El tratamiento también puede interrumpirse durante un tiempo (algunos meses o años) y renovarse si el estado del paciente justifica administraciones adicionales de FR104. Según una forma de

- realización particular de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y menos de 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un horario de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez por semana, como 0,1 - 0,45 mg/kg, 0,15 - 0,4 mg/kg, 0,2 - 0,35 mg/kg, 0,25 - 0,3 mg/kg, 0,05 - 0,4 mg/kg, 0,05 - 0,3 mg/kg, 0,1 - 0,4 mg/kg, 0,1 - 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,25 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada dos semanas, como 0,1 - 0,45 mg/kg, 0,15 - 0,4 mg/kg, 0,2 - 0,35 mg/kg, 0,25 - 0,3 mg/kg, 0,05 - 0,4 mg/kg, 0,05 - 0,3 mg/kg, 0,1 - 0,4 mg/kg, 0,1 - 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,25 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada tres semanas, como 0,1 - 0,45 mg/kg, 0,15 - 0,4 mg/kg, 0,2 - 0,35 mg/kg, 0,25 - 0,3 mg/kg, 0,05 - 0,4 mg/kg, 0,05 - 0,3 mg/kg, 0,1 - 0,4 mg/kg, 0,1 - 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,25 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada cuatro semanas, como 0,1 - 0,45 mg/kg, 0,15 - 0,4 mg/kg, 0,2 - 0,35 mg/kg, 0,25 - 0,3 mg/kg, 0,05 - 0,4 mg/kg, 0,05 - 0,3 mg/kg, 0,1 - 0,4 mg/kg, 0,1 - 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,25 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada cinco semanas, como 0,1 - 0,45 mg/kg, 0,15 - 0,4 mg/kg, 0,2 - 0,35 mg/kg, 0,25 - 0,3 mg/kg, 0,05 - 0,4 mg/kg, 0,05 - 0,3 mg/kg, 0,1 - 0,4 mg/kg, 0,1 - 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,25 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada seis semanas, como 0,1 - 0,45 mg/kg, 0,15 - 0,4 mg/kg, 0,2 - 0,35 mg/kg, 0,25 - 0,3 mg/kg, 0,05 - 0,4 mg/kg, 0,05 - 0,3 mg/kg, 0,1 - 0,4 mg/kg, 0,1 - 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,25 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$).
- [0029]** De acuerdo con otra realización particular de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o una vez cada cinco semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez por semana, tal como 0,05 - 0,15 mg/kg, 0,1 - 0,2 mg/kg, 0,1 - 0,15 mg/kg, 0,05 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,1 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,15 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,2 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada dos semanas, como 0,05 - 0,15 mg/kg, 0,1 - 0,2 mg/kg, 0,1 - 0,15 mg/kg, 0,05 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,1 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,15 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,2 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada tres semanas, como 0,05 - 0,15 mg/kg, 0,1 - 0,2 mg/kg, 0,1 - 0,15 mg/kg, 0,05 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,1 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,15 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,2 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada cuatro semanas, como 0,05 - 0,15 mg/kg, 0,1 - 0,2 mg/kg, 0,1 - 0,15 mg/kg, 0,05 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,1 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,15 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,2 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada cinco semanas, como 0,05 - 0,15 mg/kg, 0,1 - 0,2 mg/kg, 0,1 - 0,15 mg/kg, 0,05 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,1 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,15 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 0,2 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$).
- [0030]** Cuando se administra una cantidad de entre 0,5 y 1,5 mg/kg del peso corporal, la frecuencia de la absorción de la medicación se reduce preferentemente. Con tales dosis, se prescribe ventajosamente la administración de una dosis al mes o incluso con menor frecuencia. Según otra realización particular más de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un horario de dosificación de una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada 6 semanas., una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 9 semanas o una vez cada más de 9 semanas. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada cuatro semanas, como 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,6 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,7 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,8 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,9 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 1,0 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 1,1 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 1,2 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 1,3 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 1,4 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$) o 1,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada cinco semanas, como 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,6 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,7 mg/kg (opcionalmente $\pm 10\%$), 0,8 mg/kg (opcionalmente

± 10%), 0,9 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,0 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,1 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,2 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,3 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,4 mg/kg (opcionalmente ± 10%) o 1,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada seis semanas, como 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,6 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,7 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,8 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,9 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,0 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,1 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,2 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,3 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,4 mg/kg (opcionalmente ± 10%) o 1,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada siete semanas, como en 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,6 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,7 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,8 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,9 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,0 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,1 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,2 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,3 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,4 mg/kg (opcionalmente ± 10%) o 1,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada ocho semanas, como 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,6 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,7 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,8 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,9 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,0 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,1 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,2 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,3 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,4 mg/kg (opcionalmente ± 10%) o 1,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada nueve semanas, como 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,6 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,7 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,8 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,9 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,0 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,1 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,2 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,3 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,4 mg/kg (opcionalmente ± 10%) o 1,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un programa de dosificación de una vez cada más de nueve semanas, como 0,6 - 1,4 mg/kg, 0,7 - 1,3 mg/kg, 0,8 - 1,2 mg/kg, 0,9 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,4 mg/kg, 0,5 - 1,3 mg/kg, 0,5 - 1,2 mg/kg, 0,5 - 1,1 mg/kg, 0,5 - 1,0 mg/kg, 0,5 - 0,9 mg/kg, 0,5 - 0,8 mg/kg, 0,5 - 0,7 mg/kg, 0,5 - 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,6 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,7 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,8 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 0,9 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,0 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,1 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,2 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,3 mg/kg (opcionalmente ± 10%), 1,4 mg/kg (opcionalmente ± 10%) o 1,5 mg/kg (opcionalmente ± 10%).

[0031] Es importante señalar que las dosis terapéuticas previstas de datos *in vitro* fueron entre 0,5 mg/kg y 8 mg/kg. Como se describe en la parte experimental a continuación, los datos obtenidos de los primeros experimentos del primer estudio de fase I en humanos no concordaban con el modelo farmacocinético/compromiso diana (PK/TE) calculado sobre la base de los datos disponibles antes del comienzo de este primer estudio en humanos. Los datos *in vivo* mostraron que se observa un efecto con dosis tan bajas como 0,05 mg/kg, lo cual fue completamente inesperado. Esto llevó a los inventores a modificar el modelo farmacocinético/compromiso diana (PK/TE) y reconsiderar la afinidad de FR104 por CD28 humano, con un valor de K_D de aproximadamente 0,3 nM en lugar de 4,6 nM. Como resultado, la dosis máxima que ahora se prevé es de 1,5 mg/kg, y dosis tan bajas como 0,05 mg/kg se consideran terapéuticamente afectivas.

[0032] En algunas realizaciones, la dosis de FR104 tiene una vida media en seres humanos entre 120 y 240 horas, tales como entre 130 y 230 horas, entre 140 y 220 horas o entre 150 y 210 horas.

[0033] En algunas realizaciones, los niveles de suero de IFN γ TNF α e IL-8 después de la administración de FR104 a un sujeto humano están por debajo de 5000 pg/ml, tal como inferior a 4000 pg/ml, por debajo de 3000 pg/ml, por debajo de 2000 pg/ml, por debajo de 1000 pg/ml, por debajo de 800 pg/ml, por debajo de 600 pg/ml, por debajo de 400 pg/ml o por debajo de 200 pg/ml.

[0034] El régimen de dosificación de acuerdo con la presente invención es por tanto drásticamente diferente de lo que se esperaba a partir de los datos disponibles antes del primer estudio en humanos descrito a continuación. Este cambio en el régimen de dosificación tiene varias ventajas, tales como un menor coste del tratamiento, menores efectos secundarios adversos, una reducción de la frecuencia de administración y menos dificultades para formular las composiciones farmacéuticas que comprenden FR104 como principio activo. De hecho, no siempre es posible o conveniente administrar grandes volúmenes de una solución terapéutica (> 2 ml) a un paciente, especialmente por vía subcutánea.

[0035] En la actualidad se cree que una ocupación del receptor de al menos 80% es necesario para la obtención de un tratamiento terapéuticamente eficaz con FR104. Según una realización preferida de la presente invención, la cantidad de FR104 administrada al sujeto induce al menos un 80% de ocupación del receptor CD28 durante el período de tiempo entre dos administraciones de dicho fragmento de anticuerpo Anti-CD28 Fab'. Las dosis más altas administradas de acuerdo con la presente invención (es decir, 0,5 a 1,5 mg/kg por administración) podrían haberse previsto a partir de los

datos *in vitro* que estaban disponibles antes del comienzo del estudio de fase I descrito a continuación. Sin embargo, para obtener un 80% de ocupación del receptor CD28, el experto en la materia habría administrado 0,5 mg/kg con una frecuencia de una vez cada dos semanas (consulte la Tabla 2 a continuación), mientras que la misma dosis se puede administrar una vez cada 4 semanas o incluso con menos frecuencia según la presente invención. Aún con referencia a la Tabla 2 a continuación, parece que el uso de dosis de 1 mg/kg habría necesitado administraciones mensuales, mientras que en el marco de la presente invención, una dosis de 1 mg/kg cada 8 semanas es suficiente. Lo mismo se aplica a las dosis de 1,5 mg/kg, para las cuales la frecuencia mínima cambia de una vez cada 5 semanas a una vez cada dos meses o más. Por supuesto, el experto en la materia adaptará la frecuencia de administración a las dosis que se administran, con el fin de obtener al menos un 80% de ocupación del receptor CD28 durante el período de tiempo entre dos administraciones sin administrar una dosis excesivamente alta. Cuanto mayor sea la dosis unitaria administrada, menor será la frecuencia de administración. Se administrarán dosis de 0,5 a 1 mg/kg, por ejemplo, con frecuencias de una vez al mes a una vez cada dos meses, por ejemplo.

[0036] Las condiciones susceptibles de mejorarse o prevenirse inhibiendo una respuesta inmune de células T mediante un tratamiento con FR104 de acuerdo con la presente invención son disfunción de órganos, tejidos o células trasplantados (incluyendo rechazo de tejido trasplantado, en particular rechazo de trasplante de riñón, vasculopatía de aloinjerto crónico y enfermedad de injerto contra huésped), enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T, aterosclerosis, enfermedades inflamatorias (incluidas enfermedades inflamatorias del intestino como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) e hipersensibilidad de tipo IV. Entre las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención, se pueden citar particularmente encefalomiелitis autoinmune, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple. Otra condición es la artritis psoriásica. Otras enfermedades autoinmunes pueden tratarse ventajosamente de acuerdo con la presente invención; este es el caso del penfigoide ampolloso, encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF), ooforitis autoinmune, enfermedad celíaca, penfigoide gestacional, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS, también llamado polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, polirradiculoneuritis idiopática aguda, polineuritis idiopática aguda y parálisis ascendente de Landry), enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, síndrome de opsoclono mioclono (OMS), neuritis óptica, la tiroiditis de Ord, pénfigo, síndrome de Reiter, síndrome de Sjögren, arteritis de Takayasu, arteritis temporal (también conocida como "arteritis de células gigantes") y granulomatosis de Wegener. La uveítis autoinmune y la alopecia areata son otras enfermedades autoinmunes que pueden tratarse.

[0037] Como ya se ha mencionado, el nuevo régimen de dosificación de acuerdo con la invención es particularmente ventajoso para facilitar la administración del tratamiento. Los anticuerpos monoclonales generalmente se administran por vía intravenosa durante períodos de tratamiento prolongados de hasta varios años. La administración subcutánea de fármacos es una opción terapéutica establecida para algunas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, y es una vía de administración emergente para la artritis reumatoide (Weinblatt et al., 2013) (Melichar et al., 2014). Un obstáculo importante para el enfoque subcutáneo en la administración de anticuerpos monoclonales es la limitación del volumen que se administra. El límite superior de volumen que se puede inyectar sin dolor es de alrededor de 2 ml solamente. Los volúmenes de inyección más altos pueden causar dolor e incomodidad al paciente. Para limitar el volumen de solución inyectada al paciente, se pueden preparar soluciones altamente concentradas de anticuerpos monoclonales. Sin embargo, esto impone requisitos específicos a la formulación del fármaco (Bowen et al., 2012).

[0038] La inyección subcutánea con dosis terapéuticas prescritas previamente sobre la base de los datos *in vitro* no fue posible. Las dosis terapéuticas de FR104 según la presente invención pueden incluirse en un volumen suficientemente pequeño (aproximadamente 2 ml) para considerar esta vía de administración, por ejemplo para tratar afecciones como la psoriasis o la artritis reumatoide.

[0039] De acuerdo con un ejemplo particular de la descripción, la cantidad terapéuticamente eficaz de FR104 se administra al sujeto en necesidad del mismo por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía tópica o por inyección intratecal.

[0040] La difusión de un anticuerpo desde el lugar de la inyección puede ser un problema, especialmente cuando el anticuerpo se administra mediante inyección subcutánea. Se ha asociado un avance importante con la introducción de hialuronidasa. Las moléculas de hialuronano representan un componente importante de la barrera funcional que evita que el volumen se extienda a la matriz extracelular. Debido a que el hialuronano se renueva constantemente, una interrupción transitoria no representa un problema funcional serio. La hialuronidasa humana recombinante evita los problemas de inmunogenicidad (Shpilberg y Jackisch, 2013). La hialuronidasa humana recombinante (rHuPH20; Hylenex®) ha sido aprobada por la FDA como adyuvante para facilitar la administración subcutánea de otros agentes. Según un caso particular de la presente divulgación, la composición administrada al sujeto humano que lo necesita comprende hialuronidasa humana recombinante además de FR104.

[0041] La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica para inhibir una respuesta inmune de células T en un sujeto humano en necesidad del mismo, que comprende FR104 en una cantidad comprendida entre 3 y 120 mg, por ejemplo entre 3 y 100 mg, 3 y 80 mg, 3 y 60 mg o 3 y 40 mg, preferiblemente menos de 35 mg, tal como menos de 30 mg, menos de 25 mg, menos de 20 mg y por ejemplo entre 3 y 14 mg, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación debe usarse como una dosis

unitaria, que puede administrarse a un sujeto que lo necesite con una frecuencia determinada por un médico, pero no superior a una vez a la semana. Por ejemplo, la composición farmacéutica según la divulgación es una dosis unitaria mensual. Dependiendo de la posología precisa y del contexto clínico (peso y estado general del paciente, naturaleza de la enfermedad, etc.), la composición farmacéutica según la divulgación se puede administrar una vez a la semana o una vez cada 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. Cuando la composición farmacéutica según la divulgación comprende 35 mg de FR104 o más, es decir, entre 35 mg y 120 mg de FR104, tal como entre 35 y 60 mg, 35 y 80 mg, 35 y 100 mg, 40 y 120 mg, 60 y 120 mg, 80 y 120 mg, o 100 y 120 mg, preferiblemente se administra una vez cada 3, 4, 5 o 6 semanas.

[0042] La composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se puede formular de manera que es adecuada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica o intratecal. Como se mencionó anteriormente, la composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación puede comprender hialuronidasa humana recombinante, especialmente cuando se formula para administración subcutánea.

[0043] Otro objeto de la presente descripción es un kit de partes que comprende varias dosis de FR104, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o más dosis, en donde cada dosis comprende una cantidad de 3 a 120 mg de FR104 por ejemplo entre 3 y 100 mg, 3 y 80 mg, 3 y 60 mg o 3 y 40 mg, preferiblemente menos de 35 mg, como menos de 30 mg, menos de 25 mg, menos de 20 mg y por ejemplo entre 3 y 14 mg. Estas dosis se pueden describir, en el kit, como dosis semanales o dosis para tomar cada 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. Según un caso particular, son dosis mensuales.

[0044] De acuerdo con un caso particular de las composiciones farmacéuticas y kits de partes descritas anteriormente, la composición farmacéutica o cada dosis presente en el kit están comprendidas en una jeringa o cualquier otro dispositivo que permite su administración a través de las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intratecal.

[0045] También se harán evidentes otras características de la invención en el curso de la descripción que sigue de los ensayos biológicos y estudio primero en humanos, que se han realizado en el marco de la invención y que lo proporcionan el apoyo experimental requerido, sin limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: FR104 farmacocinética, farmacodinámica y el metabolismo del producto en seres humanos

[0046] Antes del comienzo del presente estudio, se dispone de datos sobre farmacocinética FR104, farmacodinámica y el metabolismo del producto en seres humanos.

[0047] Sin embargo, y con el fin de determinar el Minimal Prever Biological Effect Level (MABEL), los datos PD y PK de los estudios cinomolgos y babuinos se agruparon, se analizaron mediante población PK/PD así como alométricamente reducido para los seres humanos. Los datos de PK y RO en babuinos y monos cinomolgos fueron consistentes y, por lo tanto, se modelaron juntos.

MABEL y la estimación de los niveles de dosis clínicas

[0048] El Nivel de Efecto Biológico Anticipado Mínimo (MABEL) fue elegido como el primer nivel de dosis en la primera vez en seres humanos de prueba de FR104 (EMA 2007: Guía sobre las estrategias para identificar y mitigar riesgos de primeros ensayos clínicos en humanos con medicamentos en investigación, EMEA/CHMP/SWP/28367/07; FDA 2005: Guía para la industria que estima la dosis inicial máxima segura en ensayos clínicos iniciales para terapias en voluntarios adultos sanos).

[0049] El Nivel de Efecto Biológico Anticipado Mínimo (MABEL) generalmente se calcula como la dosis generando aproximadamente 10 a 20% de la actividad farmacológica máxima. Por lo general, se estima en base a datos *in vitro*. Se utilizaron datos *in vivo* para FR104 dada la muy clara respuesta a la dosis *in vivo* observada en babuinos.

Desarrollo de modelos

[0050] Con el fin de simular el porcentaje de ocupación del receptor CD28 en el tiempo para los seres humanos que recibieron diferentes dosis de FR104, todos los datos PK y PD obtenidos hasta la fecha en los estudios cinomolgos y babuinos (Babuino: 0, 1, 1, 10 y 20 mg/kg dosis única IV; Monos Cynomolgus: 1, 2, 7 mg/kg dosis única IV; Monos Cynomolgus: 20, 50, 100 mg/kg dosis múltiple IV) se analizaron utilizando un enfoque poblacional.

[0051] Se tuvieron los siguientes aspectos en cuenta:

Un modelo mecanicista farmacocinético/compromiso diana (PK/TE) se utiliza para predecir el régimen de dosificación eficaz en seres humanos:

- Datos de PK y RO insuficientes a niveles de dosis bajos y bajas concentraciones de la droga para permitir estimación fiable de las concentraciones de fármaco que dan como resultado un 10% de RO *in vivo*

- Datos de PK y RO suficientes para las concentraciones de fármaco más altas para permitir un modelado y simulación de mayor confianza.

[0052] Se usó una fórmula para calcular la ocupación máxima del receptor basada en la Kd de la interacción mAb-diana para estimar MABEL (Duff, 2006). Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la ocupación máxima del receptor basada en la Kd de la interacción mAb-diana para estimar MABEL (Duff, 2006).

$$RO (\%) = \frac{[Dosis/V1]}{K_D + [Dosis/V1]} \times 100$$

[0053] El RO calculado a diferentes niveles de dosis se muestran en la tabla a continuación:

Tabla 1: CD inicial estimado 28 RO%

Dosis (µg/kg)	RO inicial (%)
1,3	7
3	15
5	23
10	37
15	47
20	54
30	64
50	75
500	97

[0054] El valor Kd *in vitro* conservador (4,6nM) y volumen de plasma humano (V1, 0,04 L/kg). Sin embargo, la Kd *in vivo* puede ser menor que la Kd *in vitro*. El modelo de disposición de fármacos mediada por el objetivo (TMDD) estimó V1 = 0,045 L/kg para FR104 (ver más abajo).

[0055] Los siguientes principales supuestos del modelo se utilizaron para este análisis PK/TE TMDD:

- Aproximación cuasi-equilibrio es adecuada para describir la interacción entre FR104 y CD28
- Tratamiento de FR104 no altera la tasa de síntesis y degradación de CD28, o resultado en el agotamiento de las células que expresan CD28, y la unión de FR104 no cambia la tasa de internalización de CD28 (kdeg = kint)
 - La señal de citometría de flujo máxima no cambió después de la infusión de FR104
 - No hubo disminución de linfocitos periféricos o linfocitos T CD4+ después de la dosificación de FR104
- Los niveles del receptor CD28 se calcularon en base a la información proporcionada y posteriormente se fijaron (R0) en el ajuste del modelo
- Se asumió que CD28 se expresaba solo en células T CD3+CD4+, mientras que no se consideraba la expresión en otros tipos de células
- Se asumió que los parámetros relacionados con la diana (Kd, Kdeg, R0) eran los mismos entre el babuino y el mono cino.
- El peso corporal individual de los animales se trata como una covariable para escalar los parámetros relacionados con la PK con un exponente de 0,75 (para CL y Q) y 1 (para V1 y V2).

[0056] El cálculo teórico de la concentración de receptor CD28 en mono cuando se normalizó para el volumen de sangre se basó en los datos siguientes:

- En los informes estudios, el número de receptores por célula en las células CD3+CD4+ van desde 20000 a 60000.
- En el ajuste del modelo, la concentración de receptor se fijó en 0,4 nM
- Se fijaron otras concentraciones de receptor (p. ej., 0,2 nM) e impactaron la estimación de Kdeg de forma inversa, mientras que tenían menos impacto en el ajuste del modelo en un cierto rango

[0057] Se utilizó la siguiente fórmula y resultado en un montaje correcto para la ocupación del receptor (Figura 2A):

$$Antígeno\ conc.(nM) = (Número\ de\ receptor\ por\ célula * densidad\ celular\ en\ sangre * 10^9) / (6,023 * 10^{23})$$

Proyección de FR104 RO en los seres humanos

[0058] Parámetros relacionados con PK se escalaron del mono al humano usando la escala alométrica (ver abajo). Se supuso que el exponente era igual a 1 para el volumen de distribución. Se supuso que el exponente era igual a 0,75 para CL sistémico y CL distributivo (Q). Se utilizó el peso corporal medio de 70 kg para el ser humano y 2,9 kg para el mono

cinomolgo sobre la base del peso corporal medio de los monos en los estudios de dosis única y múltiple.

- Se asumió que Kdeg y Kd (que está afectado por Kon y Koff) de CD28 son iguales entre las especies humana y animal.
- Los números de células T CD3+CD4+ (después de la normalización del peso corporal) fueron comparables entre monos y humanos.
- Se asumió que la densidad del receptor CD28 era 1,65 veces mayor en comparación con cyno/babuino.

[0059] Una simulación más detallada de dosis individuales muestran los siguientes perfiles de ocupación del receptor máximo proyectado en los seres humanos para diferentes dosis de FR104:

Tabla 2: Simulación de % de ocupación CD28 en los seres humanos después de diferentes dosis i.v. individuales de FR104 (0,005 a 8 mg/kg) después de diferentes periodos de observaciones (semanas)

Tiempo (semana)	0,005 mg/kg	0,05 mg/kg	0,2 mg/kg	0,5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg
0	13	61	86	94	97	98	99	100
1	3	28	70	87	93	97	98	99
2	1	12	54	81	90	95	98	99
3	0	5	34	71	86	93	97	98
4	0	2	17	56	80	91	96	98
6	0	0	3	19	54	80	91	96
8	0	0	0	3	17	55	81	92
10	0	0	0	0	3	18	57	82
12	0	0	0	0	0	3	20	61

Conclusión

[0060] Usando el enfoque de modelado PK/TE, se determinó que la dosis de MABEL seleccionada de dosis de 0,005 mg/kg debe conducir a un 13% de ocupación del receptor CD-28 en humanos como se representa en la Figura 2A.

Ejemplo 2: Diseño del estudio

2.1. Principio

[0061] Como se describe en el Ejemplo 1, la dosis seleccionada como MABEL era de 5 µg/kg que corresponde a aproximadamente el 13% de la ocupación del receptor CD28.

[0062] Se decidió realizar el (los) segmento(s) de escalada de dosis del estudio con las administraciones individuales. La duración de la ocupación del receptor CD28 en los linfocitos T sanguíneos circulantes después de la administración de FR104 depende de la dosis. En el estudio de toxicología en monos cinomolgos, la infección/linfomas se desarrolló principalmente con un 100% de ocupación del receptor CD28 en los linfocitos T sanguíneos circulantes durante al menos 8/11 semanas, respectivamente.

[0063] Con el fin de reducir los riesgos, el solicitante decidió primero probar dosis muy bajas que inducen menos de 4 semanas de 100% de ocupación del receptor CD28 (RO) en los linfocitos T de sangre y un máximo de aproximadamente el 50% RO a las 8 semanas en base al modelo poblacional PK/PD de los datos no clínicos adaptados alométricamente para humanos (ver Tabla 2).

[0064] Como medida de seguridad, la dosis de 0,5 mg/kg se seleccionó para sujetar el estudio y realizar PK/PD y análisis de seguridad antes de pasar a las dosis superiores, así como repetidas.

[0065] De acuerdo con esta simulación, las próximas dosis de 1 y 2 mg/kg debían ser adaptadas con el fin de cumplir con la regla de aproximadamente 50% RO a las 8 semanas después de la dosis. Es posible que se haya probado una dosis adicional opcional. También cumpliría con la regla de aproximadamente 50% de RO a las 8 semanas después de la dosis.

2.2 Materiales y Métodos

Prueba de Producto, Dosis, Modo de Administración

[0066] FR104 se administró por vía intravenosa a todos los niveles de dosis por infusión de 100 ml en al menos 30 min, después de la dilución a la concentración correcta en solución de lactato de Ringer.

[0067] Seis grupos de dosis fueron programados para la Parte 1, Cohorte A (6 dosis ascendentes individuales, solamente

4 de los cuales fueron finalmente realizadas), con la siguiente escala de escalada basada en un nivel de efecto biológico mínimo anticipado (enfoque MABEL): 0,005; 0,050; 0,200; 0,500; 1,0; 2,0 mg/kg (los dos últimos se cancelaron después del análisis de los resultados de PK/PD obtenidos de los grupos 1-4).

- 5 [0068] Se programaron inicialmente dos grupos de dosis para la Parte 1, Cohorte B: 0,5 y 1,0 mg/kg, y se cambiaron a 0,5 y 0,2 mg/kg, como se explica a continuación.

Descripción física del fármaco del estudio

- 10 [0069] GMP FR104 se proporcionó al sitio en viales de volumen extraíble de 5 ml que contenían 100 mg de FR104 (20 mg/ml) en manitol al 4% + 0,02% de Tween 80. Diluciones apropiadas en solución de lactato de Ringer se hicieron en el sitio.

- 15 [0070] Todos los productos en investigación fueron preparados de acuerdo con buenas prácticas de fabricación (GMP) como se requiere por el GCP actual.

Otro medicamento administrado en el estudio

- 20 [0071] La inyección de placebo correspondiente contiene vehículo (solución de lactato de Ringer). Para la dosificación de placebo, se administraron 100 ml de vehículo.

Cálculos farmacocinéticos

- 25 [0072] Cálculos farmacocinéticos se realizaron con Phoenix WinNonlin 6.2 o superior (Pharsight Corporation, Palo Alto, CA, EE.UU.).

[0073] Los siguientes parámetros individuales PK, en su caso, se determinaron para FR104 a partir de perfiles de concentración-tiempo individuales en suero, utilizando un método no compartimental:

- 30 C_{max} : la concentración máxima observada de suero
 t_{max} el tiempo de ocurrencia de C_{max}
 AUC_{inf} el área bajo la curva de concentración sérica frente a tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito, calculada a partir de $AUC_{0-t} + (C_t/\lambda_z)$, donde C_t es la última concentración cuantificable observada y λ_z la constante de velocidad terminal de primer orden
35 AUC_{0-28d} área bajo la curva de concentración de fármaco en suero-tiempo durante el intervalo de dosificación (es decir, 28 días) calculada por la regla trapezoidal lineal-logarítmica
 $t_{1/2}$ vida media terminal, calculada a partir de $(\ln 2)/\lambda_z$
 R_{ac} acumulación relación, calculada como AUC_{0-28d} Día 29/ AUC_{0-28d} Día 1 (solo la Parte 2)
40 CL aclaramiento sistémico calculado como Dosis iv/ AUC_{inf}
 V_z volumen de distribución calculado como CL/λ_z
Se evaluaron parámetros normalizados de dosis ($C_{max}/dosis$, $C_{media}/dosis$, $AUC_{0-28d}/dosis$).

[0074] Otros parámetros PK se calcularon como se considere apropiado.

Farmacodinámica

Ocupación de receptor CD28

- 50 [0075] La variable PD primaria es grupo de diferenciación (CD)28 RO con el tiempo, evaluada como RO por FR104 en muestras de sangre recogidas en cada punto de tiempo durante el estudio utilizando un método validado apto para el propósito. Se calcularon los parámetros de DP apropiados.

Exposición a hemocianina de lapa californiana

- 55 [0076] Para la Parte 1, Cohorte B solamente.

[0077] Anti-KLH Abs humanos en el suero se detectaron utilizando el método Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

- 60 [0078] Las muestras de sangre de 1,5 ml se recogieron mediante punción venosa o a través de cánula permanente en el antebrazo en tubos de suero estándar.

Mediciones de anticuerpos anti-KLH mediante ELISA

- 65 [0079] El análisis de las muestras de suero de estudio se realizó usando el kit comercial "IgG anti-KLH humana", catálogo N° 700-140-KLG de Alpha Diagnostic International. Los límites inferior y superior de cuantificación se determinaron como

7,20 y 86,0 U/ml. Este kit de Elisa se basa en la unión de anticuerpos anti-KLH humanos en muestras al antígeno KLH inmovilizado en los micropocillos, y el anticuerpo IgG anti-KLH se detecta mediante un anticuerpo anti-IgG humano específico conjugado con la enzima HRP. Después de una etapa de lavado, se agrega sustrato cromogénico (TMB) para terminar la reacción y luego se mide la absorbancia a 450 nm usando un lector de micropocillos ELISA.

Pruebas de sangre/suero

[0080] Muestras de sangre enteras se obtuvieron de distintos donantes y se recogieron en tubos vacutainer de recogida de sangre K3-EDTA o K2-EDTA. Las muestras para la determinación de la ocupación de los receptores FR104 PK y CD28 se obtuvieron de sangre recolectada en los siguientes momentos:

Día 1, antes de la dosis y a las 0,5, 0,75, 1, 2, 4 y 8 horas después del inicio de la infusión
 Día 2, 24 horas después del inicio de infusión
 Día 3, 48 horas después del inicio de la infusión
 Día 5, 96 horas después del inicio de la infusión
 Día 8, 1 semana después del inicio de la infusión
 Día 15, 2 semanas después del inicio de la infusión
 Día 29, 3 semanas después del inicio de la infusión
 Día 43, 6 semanas después del inicio de la infusión solo para 0,5 mg/kg (grupo 4 cohorte A)
 Día 57, 8 semanas después del inicio de la infusión, no debe realizarse si la dosis es <0,2 mg/kg
 Día 85, 12 semanas después del inicio de la infusión, no debe realizarse si la dosis es <0,2 mg/kg
 Día 113, 16 semanas después del inicio de la infusión (visita de seguimiento para el grupo con una dosis ≥ 1 mg/kg)

Medición de la concentración de FR104-PEG mediante ELISA

[0081] La molécula de FR104 (anti-CD28.3 Fab) se incubó en placas recubiertas con CD28Fc. El FR104 unido se detectó luego con un anticuerpo monoclonal de conejo dirigido a PEG (grupo metoxi), que fue revelado por un anticuerpo policlonal anti-conejo marcado con peroxidasa.

Reactivos y tampones

[0082]

- CD28- Ig (CD28/Fc Chimera, R&D Systems # 342-CD-200, reconstituido a 200 µg/mL en PBS),
- Tampón de recubrimiento: NaHCO₃ 0,05 M pH 9,2 (80 mL Na₂CO₃ 0,05 M + 920 mL NaHCO₃ 0,05 M, pH 9,2)
- BSA (Sigma # A-7906)
- Tween 20 (Sigma # P7949)
- Muestra
- Estándar: FR104 # CAA-1 (0,5 mg/ml)
- Anticuerpo monoclonal Conejo anti-PEG (grupo metoxi) (Epitomics # 2061-1, 0,97 mg/ml)
- Peroxidasa marcada con anticonejo policlonal de cabra (Jackson ImmunoResearch # 111-035-144, 0,8 mg/ml)
- Sustrato: TMB (Sigma # T8665)
- H₂SO₄ (VWR 20704,292)

[0083] Las placas se recubrieron con CD28-Ig a 1 µg/ml en tampón carbonato 0,05M pH 9,2 (50 µL/pocillo) y se incubaron durante 2h a 37°C o durante la noche a 4°C. Los pocillos se vaciaron y lavaron 3 veces sucesivamente con 200 µl de PBS-Tween al 0,05%. Se añadieron 100 µl de PBS Tween 0,1% BSA 1% y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C.

- *Estándar:* FR104 # L27221/G1/2 (10,01 mg/ml) se diluyó para el primer punto a 100 µg/ml y se diluyó en serie por un factor de 5 para los 7 puntos siguientes, por duplicado. El suero (50 ml) se diluyó al menos a 1/10 en PBS-Tween al 0,1% y se incubó durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se vaciaron y lavaron 3 veces sucesivamente con 200 µl de PBS-Tween al 0,05% y se diluyeron. A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-PEG de conejo a 1/500 en PBS-Tween al 0,1%, seguido de incubación durante 1 hora a 4°C. Los pocillos se vaciaron y lavaron 3 veces sucesivamente con 200 µl de PBS-Tween al 0,05%. Se añadió una peroxidasa anticonejo de cabra (anti-Rb PO) a 1/2000 en PBS-Tween al 0,1% (50 µl/pocillos) y se incubó durante 1 hora a 4°C (etapa de lavado) Se añadió TMB (50 µl/pocillo) y se incubó 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió el tampón de parada (50 µl/pocillo H₂SO₄ 0,5 M). La medición de la absorbancia a 450 nm, (ref. 630 nm) se adquirió luego usando una placa de microtitulación (Nunc Immunoplate, Nunc, nº 442404). El programa SoftMaxPro se utilizó para el análisis y para determinar las concentraciones de FR104 en las muestras.

Receptor de medición de expresión por citometría de flujo

Determinación de ocupación del receptor:

[0084] Cada muestra de sangre fue dividida en medio y se mezcló o no con el anticuerpo FR104. Tras la lisis de glóbulos

rojos, se investigó la unión de FR104 a CD28 mediante citometría de flujo en linfocitos teñidos con un anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC, utilizando sucesivamente un anticuerpo monoclonal de conejo anti-PEG y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa fluor 405. Por tanto, se determinó la intensidad fluorescente media (MFI) de la tinción con PEG en ambos pocillos que contenían la segunda mitad del volumen de sangre, del mismo donante suplementado con un exceso de anticuerpo FR104. A continuación, se calculó la saturación de CD28 promovida por FR104 para cada donante de sangre realizando la relación entre el MFI de ambos pocillos (sin exceso de FR104/con exceso de FR104).

Solución de trabajo y tampones

[0085]

Reactivo	Proveedor	Condición de almacenamiento de referencia	
NH ₄ Cl	Sigma	A9434	TA
KHCO ₃	Sigma	60339	TA
Na ₂ -EDTA	Sigma	E1644	TA
Azida de sodio	Sigma	S2002	TA
HCl	Merck	1.09063,1000	TA
PBS (sin Mg ²⁺ , Ca ²⁺) 1X	Gibco	14190-094	TA antes de abrir y en RF al abrir
BSA-7,5%	Sigma	A8412	RF
Alexa Fluor 405 cabra anti-conejo IgG	Molecular probes	A31556	RF
IgG anti-CD3 humana de ratón FITC	BD Biosciences	556611	RF
IgG monoclonal anti-PEG de conejo	Abeam	51257	FZ
Cuentas BD C&ST	BD Biosciences	650621	RF
Solución de enjuague FACS	BD Biosciences	340346	TA
Solución limpia FACS	BD Biosciences	340345	TA
Fluido de vaina de flujo FACS	BD Biosciences	342003	TA
RF: Refrigerador (+5°C ± 5°C), TA: Temperatura ambiente; FZ: (-24°C ± 6°C)			

Tabla 3

Preparación de reactivos y solución			
Soluciones y tampones	Componentes	Preparación	Condiciones de almacenaje
Solución de lisis de glóbulos rojos 1X	NH ₄ Cl, KHCO ₃ , Na ₂ -EDTA y dd-H ₂ O	1,658 g NH ₄ Cl, 0,2 g KHCO ₃ , 0,00744 g Na ₂ -EDTA, 200 mL dd-H ₂ O. Ajuste el pH entre 7,2 y 7,4	Hasta 4 semanas, +5°C±5°C
Tampón FACS	DPBS (sin Mg ²⁺ , Ca ²⁺) 1X, albúmina de suero bovino, azida de sodio	40 ml de solución de BSA al 7,5%, 0,3 g de azida sódica, s.q.f. 300 ml DPBS 1X	Hasta 4 semanas, +5°C±5°C

Tabla 4

Preparación de solución de anticuerpo diluida							
Solución diluida de anticuerpos		Componentes		Preparación		Condiciones de almacenaje	
Solución diluida de conejo anti-PEG IgG		Solución madre de conejo anti-PEG IgG, tampón FACS		5 µl de IgG anti-PEG de conejo, 254 µl de tampón FACS		Sin almacenamiento, recién preparado	
Preparación de soluciones de trabajo de anticuerpos							
Solución de trabajo de anticuerpos		Componentes		Preparación		Condiciones de almacenamiento	
FITC ratón anti-humano CD3 IgG/conejo anti-PEG IgG solución de trabajo		Solución diluida de IgG anti-PEG de conejo, Solución madre de IgG marcada con FITC anti- CD3 humano de ratón, Tampón FACS		90 µl anti-PEG Conejo IgG, 240 µl de ratón anti-humano CD3 FITC marcado con IgG, 270 µl tampón FACS		Sin almacenamiento, recién preparado	
Solución de trabajo de conejo anti-PEG IgG		Solución diluida de conejo anti-PEG IgG, tampón FACS		90 µl anti-PEG Conejo IgG, 510 µl tampón FACS		Sin almacenamiento, recién preparado	
Alexa Fluor 405 solución de trabajo IgG anti conejo de cabra		Solución madre de IgG anti-conejo de cabra Alexafluor 405, tampón FACS		3 µl de solución madre de IgG anti-conejo de cabra, 597 µl de tampón FACS		Sin almacenamiento, recién preparado	
Tabla de dilución FR104							
Tubo	Concentración (µg/mL)	Desde	De concentración (µg/mL)	µL	Volumen de DPBS (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final en ensayo con células (µg/mL)
S2	500	S1	21000	3	123	126	-
CO1	50	S2	500	20	180	200	5
Tabla proporcionada para una solución madre de FR104 (S1) a 21 mg/ml, y luego puede ajustarse dependiendo de la concentración de stock del lote de FR104. CO: concentración							

Tablas 5-7

[0086] El ensayo se realizó por triplicado para las muestras de ensayo tratadas o no con la dosis saturada de FR104 (5 µg/ml). Las muestras se distribuyeron en placas de 96 pocillos.

[0087] El volumen apropiado de una solución FR104 a 50 µg/ml se llevó a cabo y suavemente se homogeneizó en tubo de la sangre tratado con EDT. Se sembraron en placa 50 µl de cada muestra de sangre humana completa en 6 pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en V. 5,5 µl de FR104 (50 µg/ml se añadió en D-PBS) en primer conjunto de tres bien y 5,5 µl de D-PBS en el segundo conjunto de tres pozos. Después de homogeneizar suavemente, las placas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 150 µl/pocillo de solución de lisis de glóbulos rojos y luego se centrifugó 1 min a 1200 g. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 150 µl/pocillo de solución de lisis de glóbulos rojos. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, las placas se centrifugaron 1 minuto a 1200 g (repetición 3 veces). Luego se agregaron 150 µl de tampón FACS y se centrifugaron. Se añadieron 30 µl/pocillo de la solución de mezcla de IgG anti-CD3 humana de ratón FITC/IgG anti-PEG de conejo de ratón y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad a 4°C. Las células se lavaron con tampón FACS y se centrifugaron, el paso se repitió dos veces. Se añadieron 30 µl/pocillo de solución de trabajo de IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor 405 y se incubó durante 15 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS. A continuación, las células se resuspendieron en 300 µl de tampón FACS para el análisis FACS.

2.3 Diseño del estudio

[0088] Este diseño del estudio de fase I FR104 es cauteloso y en línea con la Directiva Europea para los ensayos clínicos primero en humanos con medicamentos en investigación (EMEA/CHMP/SWP/28367/07).

[0089] Este estudio es un estudio primero en humanos, fase I, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de un solo centro, que evalúa una y varias dosis intravenosas ascendentes de FR104 en sujetos sanos.

[0090] Hasta 71 sujetos masculinos y femeninos sanos fueron seleccionados según los criterios de inclusión y exclusión, es decir, 57 sujetos en la Parte 1 (SAD: 3 cohortes de 36 [Cohorte A], 14, [Cohorte B], y 7 sujetos [Cohorte C opcional], respectivamente). La duración total prevista del estudio fue de 9 meses (36 semanas).

[0091] Todas las dosis FR104 se administraron por vía intravenosa mediante una infusión lenta de al menos 30 minutos. Se observó un enfoque escalonado en todos los niveles de dosis. Se observó un intervalo de al menos 14 días (desde la última hasta la primera administración) entre todos los niveles de dosis. A los sujetos individuales en el mismo día de la dosificación se les administró la dosis al menos con 60 minutos de diferencia.

Dosis de selección

[0092] La primera dosis del estudio planeado primero en humanos se basó en la MABEL como se determina por el modelado de población PK/PD de los datos no clínicos alométricamente adaptados a los seres humanos (véase el Ejemplo 1 anterior para más detalles). La dosis seleccionada fue de 5 µg/kg correspondiente a aproximadamente un 13% de ocupación del receptor CD28 (RO).

[0093] El (los) segmento(s) de escalada de dosis del estudio se llevaron a cabo con las administraciones individuales. Con el fin de reducir los riesgos, se programó una espera de aproximadamente 12 semanas después del nivel de dosis de 1 mg/kg, es decir, antes del inicio de los niveles de dosis que se supone que inducen 100% de RO CD28 durante un período de tiempo de 4 semanas o más (según el modelo poblacional de PKPD). Este período de 4 semanas se consideró lo suficientemente corto como para hacer muy poco probable en el hombre que una reactivación viral genere alguna patología. La espera de 12 semanas permitió evaluaciones de seguridad y PK/PD antes de pasar a las dosis más altas de 1,2 mg/kg que estaban programadas inicialmente.

[0094] De acuerdo con la simulación, se suponía que las dosis de 1 y 2 mg/kg inducían, respectivamente, 84 y 92% de RO a las 4 semanas y 18 y aproximadamente el 50% RO a las 8 semanas. Como medida de seguridad, se ha seleccionado la dosis de 0,5 mg/kg para realizar el estudio y realizar análisis de FC/FD y de seguridad antes de pasar a las dosis más altas.

Parte 1 Sola parte de dosis ascendente (SAD)

[0095] Los sujetos fueron reclutados sobre la base de su historial médico y estado de salud, a juzgar por el Principal Investigador (o co-investigador designado). Durante cada período de tratamiento, los sujetos fueron alojados en el centro de estudio desde el día anterior a la dosificación (Día 1) hasta el Día 5. Las comidas se estandarizaron durante el período residencial. Para los grupos 1 a 4 (0,005; 0,05; 0,2 y 0,5 mg/kg), se planificaron visitas ambulatorias el día 8, el día 15, el día 29 y el día 57. Para el grupo 4 (0,5 mg/kg), una visita ambulatoria adicional se planificó el día 43. La última visita ambulatoria fue seguida de una visita de seguimiento el día 85 (semana 12). Los grupos 5 y 6 deberían haber recibido una dosis de 1 y un máximo de 2 mg/kg de FR104, respectivamente, pero los resultados obtenidos con dosis más bajas llevaron a los investigadores a cancelar estas dosis.

Cohorte A

[0096] Veintidós sujetos se inscribieron en uno de los grupos de nivel de 4 dosis en la cohorte A. Grupos secuenciales (nivel de dosis) de sujetos sanos recibieron dosis en aumento de FR104 IV administrada.

[0097] En los primeros 2 grupos de nivel de dosis (Grupo 1 a 2), 4 sujetos, cada uno, fueron asignados al azar a cualquiera de FR104 o placebo en una proporción de 3:1 para que 3 sujetos recibieron FR104 y 1 sujeto recibió placebo.

[0098] Se aplicó un enfoque de dosis escalonada, es decir, un sujeto se dosificó seguido por un segundo sujeto 48h más adelante, y los dos sujetos restantes del grupo de nivel de dosis 48h después del segundo sujeto (total 5 días):

Día 1: n = 1

Día 3: n = 1

Día 5: n = 2

[0099] En los Grupos 3 y 4, 7 sujetos, cada uno, fueron aleatorizados a FR104 o placebo en una proporción de 5:2 de modo que 5 sujetos recibieron FR104 y 2 sujetos recibieron placebo. La aleatorización aseguró que en el primer grupo de 2 sujetos 1 recibió FR104 y 1 recibió placebo.

[0100] Se aplicó enfoque de dosis escalonada, es decir, 2 sujetos fueron dosificados seguidos por 2 sujetos 48h más tarde, y los restantes 3 sujetos del grupo de nivel de dosis 48h después del cuarto sujeto (total 5 días):

Día 1: n = 2

Día 3: n = 2

Día 5: n = 3.

[0101] El mismo protocolo se programó para los grupos 5 y 6 (7 sujetos, cada uno, con un nivel de dosis de 1 mg/kg y 2 mg/kg) pero se canceló después del análisis de los datos de los primeros 4 grupos.

Cohorte A	Dosis (mg/kg)	FR104 número de sujetos	PLACEBO número de sujetos
Grupo 1	0,005	3	1
Grupo 2	0,050	3	1
Grupo 3	0,200	5	2
Grupo 4	0,500	5	2
Aproximadamente 12 semanas de espera para PK, PD y evaluación de seguridad			
Tabla 8: Dosis única ascendente			

Cohorte B

[0102] Catorce sujetos se inscribieron en uno de los grupos de nivel de 2 dosis (7 en cada grupo) en la cohorte B.

[0103] Los sujetos fueron asignados al azar a FR104 o placebo en una relación 5:2 de manera que 5 sujetos recibieron FR104 y 2 sujetos recibieron placebo. La aleatorización aseguró que en el primer grupo de 2 sujetos, 1 recibió FR104 y 1 recibió placebo.

[0104] Además de las evaluaciones comunes, los sujetos en esta cohorte recibieron una exposición de hemocianina de lapa californiana (KLH) en el día de la inyección FR104.

[0105] Se aplicó enfoque de dosis escalonada es decir, dos sujetos fueron dosificados seguidos por dos sujetos 48h más tarde, y los tres sujetos restantes del grupo nivel de dosis 48h después del cuarto sujeto (total 5 días):

Día 1: n = 2

Día 3: n = 2

Día 5: n = 3

[0106] El diseño inicial fue el siguiente: exposición de KLH, dosis única.

Tabla 9: diseño inicial para SAD incluyendo exposición a KLH

Parte 1		Dosis única ascendente	
Cohorte B	Dosis (mg/kg)	FR104 número de sujetos	PLACEBO número de sujetos
Grupo 7*	0,500	5	2
Grupo 8*	1,000	5	2
* Los sujetos sanos que no conocen KLH recibirán una exposición de KLH			

[0107] Este diseño se modificó para tener en cuenta los resultados obtenidos en los Grupos 1-4:

Exposición a KLH, dosis única.

Tabla 10: diseño modificado para SAD que incluye exposición a KLH

Cohorte B	Dosis (mg/kg)	FR104 número de sujetos	PLACEBO número de sujetos
Grupo 7 *	0,500	5	2
Grupo 8 *	0,200	5	2
Grupo 9 *	1,5	5	2
Grupo 9 bis *	0,02	5	2
* sujetos sanos sin experiencia con KLH recibieron una exposición a KLH			

Criterios de inclusión

[0108] Los sujetos que cumplen todos los criterios siguientes son elegibles para participar en este estudio:

1. Hombre o mujer, de 18 a 60 años, extremos incluidos;
 2. En buen estado de salud [medicamente estable] según lo determinado sobre la base de la historia clínica, los signos vitales, las pruebas de laboratorio clínico y el examen físico general realizado en la evaluación;
- Nota: se puede realizar una nueva prueba en caso de un valor de prueba de laboratorio clínico fuera del rango que determinará la elegibilidad de un sujeto. Esta nueva prueba debe realizarse preferiblemente en una visita no programada. El resultado de la nueva prueba se considerará para la elegibilidad del sujeto. Si la nueva prueba está fuera de los rangos de referencia normales, el sujeto puede incluirse solo si el investigador considera que

las anomalías no son clínicamente significativas.

3. Electrocardiograma (ECG) dentro del rango normal, o que no muestra desviaciones clínicamente relevantes, según lo juzgue el investigador;

Nota: se puede realizar una nueva prueba en caso de un valor de ECG fuera de rango que determinará la elegibilidad de un sujeto.

4. Pesa al menos 50 kg y no más de 100 kg y tiene un índice de masa corporal (IMC) dentro del rango normal: $18,0 \leq \text{IMC} < 30,0 \text{ kg/m}^2$;

5. Prueba de orina negativa para determinadas drogas de abuso en la selección;

6. Prueba de aliento con alcohol negativa en la selección;

7. La mujer es posmenopáusica o quirúrgicamente estéril (ha tenido una histerectomía, ooforectomía bilateral o ligadura de trompas);

8. La mujer tiene una prueba de embarazo negativa en la selección;

9. Los varones no vasectomizados que tengan una pareja femenina en edad fértil deben aceptar el uso de un método anticonceptivo eficaz hasta 90 días después de la última administración del fármaco del estudio;

10. El sujeto masculino tiene que aceptar no donar esperma hasta 90 días después de la última administración del fármaco del estudio;

11. Dispuesto a adherirse a las prohibiciones y restricciones especificadas en este protocolo;

12. Formulario de consentimiento informado (ICF) firmado voluntariamente antes de realizar cualquier procedimiento relacionado con el estudio, indicando que el sujeto comprende el propósito y los procedimientos requeridos para el estudio y está dispuesto a participar en el estudio;

13. Los sujetos deben ser EBV positivos según PCR;

14. No fumador o fumador leve, es decir, fuma un máximo de 5 cigarrillos (o 3 puros o 3 pipas llenas) por día, y capacidad y voluntad para abstenerse de fumar durante el confinamiento y las visitas ambulatorias en el centro de investigación clínica.

Para la Parte 1, Cohorte B solamente:

15. El sujeto no se sometió a una exposición a KLH.

Ejemplo 3: Los resultados iniciales de la dosis individual ascendente (SAD) del estudio

[0109] La concentración de FR104 se midió en la sangre de los pacientes por ELISA y el nivel de receptor de ocupación se midió por citometría de flujo en los días 0, 1, 2, 5, 8, 15 y 29 después de dosis únicas ascendentes. Los resultados farmacocinéticos se representan en la Figura 1 en ng/ml de FR104 en el plasma y los resultados farmacodinámicos como porcentaje de la ocupación de los receptores CD28 en las células T CD3+ diana. La Figura 1A muestra la concentración de FR104 después de solo inyecciones i.v., FR104 de 0,005, 0,05, 0,2 y 0,5 mg/Kg, administradas durante 30 minutos, las concentraciones plasmáticas pico medidas 2 horas después de las inyecciones alcanzaron 117 ± 11 , 1012 ± 48 , 4922 ± 853 y 11620 ± 1076 ng/ml, respectivamente. A partir de las concentraciones plasmáticas medidas durante el primer mes, se demostró que la vida media depende de la dosis con valores de 3,4 días para la dosis de 0,05 mg/kg, 5,7 días para la dosis de 0,2 mg/kg y 7,9 días para la dosis de 0,5 mg/kg. La Figura 1.B muestra sorprendentemente que la ocupación del receptor alcanzó el 80% después de una única inyección i.v. de 0,005 mg/kg de FR104 y el 100% después de una única inyección i.v. de 0,05 o 0,2 mg/kg de FR104 en lugar de aproximadamente el 13% de RO para 0,005 mg/kg de FR104 como se esperaba. El receptor CD28 se desaturó por completo después de 15 días después de la inyección i.v. de 0,005 mg/kg y 28, 56 y 84 días después de la inyección intravenosa de 0,05, 0,2 y 0,5 mg/kg.

[0110] La Figura 2 muestra los diferentes porcentajes de RO a diferentes concentraciones FR104 determinaron previamente con resultados *in vitro* (Figura 2A) en comparación con porcentaje RO observado después del ensayo clínico. La Figura 2B compara el % de RO predicho determinado con la Kd de FR104 modificada después del análisis de la primera cohorte A del estudio clínico con el % de RO observado calculado por citometría de flujo como se explica en el material y el método. Esta figura muestra la correlación perfecta entre ambas situaciones, lo que confirma que el Kd medido *in vitro* en Poirier et al, 2012 fue subestimado para uso humano y que la constante de disociación FR104 es aproximadamente 0,3 nM en lugar de 4,6 nM (10 veces menor). Estos resultados no eran predecibles porque el RO% determinado en el modelo de primates no humanos encajaba muy bien con las predicciones. Las dosis terapéuticas de FR104 calculadas en 2012 para estudios preclínicos mostraron una buena eficacia y se publicaron abundantemente ((Haanstra et al, JI 2015) (Poirier et al, JI 2015) (Poirier et al, Experimental Dermatol. 2015) (Vierboom et al, Clinical and experimental immunol 2015)).

[0111] La expresión de CD28 en la superficie de células T se analizaron a continuación durante 1 mes después de FR104 de infusión por el flujo de citometría. La Figura 3 muestra la media de fluorescencia del FR104 pegilado que refleja la presencia del receptor CD28 en la superficie celular. Los resultados muestran que en los 4 grupos diferentes de voluntarios que recibieron FR104, CD28 todavía está presente en la superficie de las células T incluso después de la unión de FR104, lo que subyace a que FR104 no induce la internalización del receptor ni la regulación negativa.

[0112] La exposición a KLH se realizó en una infusión de dosis única de FR104 (concentraciones modificadas de 0,02, 0,2, 0,5 y 1,5 mg/kg) para ensayar la respuesta inmune al antígeno KLH en humanos. La concentración de anticuerpo anti-KLH se analizó mediante ELISA usando un kit comercial. La Figura 4 representa la respuesta de anticuerpos anti-KLH. Este resultado indica una inhibición dependiente de la dosis de FR104 de la respuesta anti-KLH en comparación con los voluntarios que recibieron placebo. A partir de una dosis terapéutica de 0,2 mg/kg, la respuesta se reguló

negativamente. Se observó un 100% de inhibición para los voluntarios que recibieron 0,5 mg/kg de FR104. Las nuevas dosis terapéuticas de FR104 son eficaces a partir de 0,02 mg/kg para inhibir el sistema inmunológico.

Ejemplo 4: Informe de estudio primero en humanos

MÉTODO

Diseño del estudio

[0113] Este estudio es un estudio primero en humanos, de fase I, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de centro único evaluando dosis intravenosas ascendentes únicas y múltiples de FR104 en sujetos sanos. Fue aprobado por el Comité de Ética Independiente de Ziekenhuisnetwerk Antwerpen (número de protocolo FR104-CT01; número de EudraCT 2015-000302-19; identificador Clinical-Trials.gov: NCT02800811). El estudio se llevó a cabo en SGS Life Science Services, Unidad de Farmacología Clínica Amberes-Amberes, Bélgica, de conformidad con las directrices de Buenas Prácticas Clínicas y los principios de la Declaración de Helsinki.

Participantes

[0114] Sujetos masculinos y femeninos apropiados firmaron el consentimiento informado y estaban en buen estado de salud. Los criterios de inclusión clave fueron buena salud general, 18-60 años de edad, ≥ 50 kg y no más de 100 kg con un IMC de 18-30 kg/m². Los criterios de exclusión fueron cualquier historial médico previo significativo o pruebas de laboratorio anormales.

Intervención

[0115] El fármaco de prueba fue FR104 (suministrado por OSE Immunotherapeutics SA., Nantes, Francia), mientras que el comparador de drogas (placebo coincidente) fue solución de lactato de Ringer. El FR104 se suministró como una solución de 5 ml que contenía 100 mg (20 mg/ml) de FR104 y se almacenó a 2-8°C (36-46°F) protegido de la luz. La farmacia SGS preparó jeringas con la dilución apropiada o placebo y se las proporcionó al investigador de forma doble ciego.

[0116] Las dosis se seleccionaron inicialmente basándose en el modelado PK-PD de la población de datos de primates no humanos (con adaptación alométrica) y los datos humanos se incluyeron más tarde después del análisis intermedio. La dosis inicial (MABEL, 0,005 mg/kg) correspondió a una RO de CD28 modelada a C_{max} de aproximadamente el 20%.

[0117] Para los niveles de dosis $\leq 0,05$ mg/kg, FR104 fue administrado por infusión IV de 10 ml en al menos 30 min, después de la dilución a la concentración correcta en solución de lactato de Ringer. Para otros niveles de dosis, FR104 se administró por infusión intravenosa de 100 ml en al menos 30 min, después de la dilución a la concentración correcta en solución de lactato de Ringer.

Regímenes de tratamiento

[0118] Se seleccionaron 50 sujetos en la Parte 1 (SAD: 2 cohortes de 22 [Cohorte A] y 28 [Cohorte B] sujetos) y 14 sujetos en la Parte 2 (MAD). Durante cada período de tratamiento, los sujetos fueron alojados en el centro de estudio desde el día anterior a la dosificación (día 1) hasta el día 5. Se aplicó un enfoque de dosis escalonada, es decir, se dosificó a 1 o 2 sujetos (día 1) seguido de 1 o 2 sujetos 48 h después (día 3), y los sujetos restantes del grupo de dosis 48 h después del cuarto sujeto. La duración total del estudio fue de 36 semanas, incluidas 11 semanas de seguimiento después de la última dosis repetida. Se aplicó un intervalo de al menos 14 días (desde la última hasta la primera administración) entre todos los niveles de dosis. A los sujetos individuales en el mismo día de la dosificación se les administró la dosis al menos con 60 minutos de diferencia.

[0119] **Parte 1: Parte de dosis ascendente individual (SAD)** - Veintidós sujetos debían ser inscritos en uno de los 4 grupos de nivel de dosis en la cohorte A: 0,005 mg/kg en el Grupo 1, 0,050 mg/kg en el Grupo 2, 0,200 mg/kg en el Grupo 3 y 0,500 mg/kg en el Grupo 4. En los Grupos 1 y 2, 4 sujetos fueron asignados aleatoriamente a FR104 o placebo en una proporción de 3:1 de modo que 3 sujetos recibieron FR104 y 1 sujeto recibió placebo. En el Grupo 3 a 4, 7 sujetos fueron asignados aleatoriamente a FR104 o placebo en una proporción de 5:2, de modo que 5 sujetos recibieron FR104 y 2 sujetos recibieron placebo. La aleatorización aseguró que en el primer grupo de 2 sujetos, 1 recibió FR104 y 1 recibió placebo. Se realizó una suspensión predefinida de aproximadamente 12 semanas después de la dosificación en el grupo 4, para la evaluación intermedia de la farmacocinética, la DP y la seguridad en función de las decisiones para los siguientes niveles de dosis. Veintiocho sujetos debían inscribirse en uno de los 4 grupos de niveles de dosis (7 en cada grupo) en la Cohorte B: 0,500 mg/kg en el Grupo 7, 0,200 mg/kg en el Grupo 8, 1,5 mg/kg en el Grupo 9, y 0,020 mg/kg en el Grupo 9 bis. Los sujetos fueron asignados al azar a FR104 o placebo en una proporción de 5:2. Además de las evaluaciones comunes, los sujetos de esta cohorte recibieron una prueba de KLH el día de la inyección de FR104.

[0120] **Parte 2: Parte de dosis ascendente múltiple (MAD)** - Se inscribieron catorce sujetos en uno de los 2 grupos de niveles de dosis (7 en cada grupo) en la Parte 2: 0,2 mg/kg en el Grupo 10 y 0,5 mg/kg Grupo 11. Cada sujeto recibió 2

administraciones de FR104 o placebo separadas por un intervalo de 28 días.

Evaluación de citoquinas

5 **[0121]** Las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis y después de la dosis en las horas 1, 2, 4, 8, 24 (día 2). También se recogieron muestras los días 15, 43, 57, 85, 113. Citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10.

10 **[0122]** IL 12p70 y TNF- α se dosificaron en suero usando un método ECLIA validado usando el kit comercial de ensayo Pro Inflammatory Panel I V-plex (# K15049G de Meso Scale Discovery, Rockville, MA). Las placas MULTI-SPOT® están prerrevestidas con anticuerpos de captura. Las muestras se cargan en pocillos con una solución que contiene anticuerpos de detección conjugados con marcadores electroquimioluminiscentes (MSD SULFO-TAG™). Los analitos de la muestra se unen para capturar anticuerpos inmovilizados en la superficie del electrodo de trabajo; el reclutamiento de los anticuerpos de detección por el analito unido completa el sándwich. Después de agregar el tampón de lectura MSD, se aplica voltaje a los electrodos de la placa y se produce una emisión de luz si se han unido a la placa anticuerpos marcados con SULFO-TAG™ significativos. El instrumento mide la intensidad de la luz emitida para proporcionar una medida cuantitativa del analito en la muestra.

Análisis PK

20 **[0123]** Las muestras de sangre en serie para las evaluaciones de PK se recogieron en los siguientes puntos de tiempo en relación con el tiempo de inicio de infusión: antes de la dosis y después de la dosis en horas 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 8, 24 (día 2), 48 (día 3), días 5, 8, 15, 29, 43, 57, 85, 113 (solo grupos de dosis > 0,5 mg/kg). Las concentraciones de FR104 en suero se determinaron usando un método validado que involucra el ensayo inmunoabsorbente de electroquimioluminiscencia cuantitativo (ECLIA) en un MSD Sector Imager 6000 (MSD, Gaithersburg, MD, EE. UU.). Los cálculos farmacocinéticos fueron realizados por SGS-LSS utilizando Phoenix WinNonlin 6.2 o superior (Pharsight Corporation, Palo Alto, CA, EE. UU.). Los límites inferior y superior de cuantificación (LLOQ y ULOQ) para el ensayo fueron 100 y 2000 ng/mL, respectivamente. La precisión general y la exactitud de los controles y estándares de calidad fueron $\leq 20\%$ y dentro del $\pm 20\%$, respectivamente. Se construyó una curva estándar que permite estimar las concentraciones de las muestras por interpolación de la curva ajustada.

Análisis PD

35 **[0124]** Se recogieron muestras de sangre en los mismos puntos de tiempo como para los análisis de PK para la ocupación de receptor CD28 (RO), utilizando un método validado parcialmente implica citofluorimetría. Cada muestra de sangre a analizar se dividió por la mitad y una muestra se mezcló con un exceso de FR104. Tras la lisis de glóbulos rojos, se investigó la unión de FR104 a CD28 mediante citometría de flujo, en linfocitos teñidos con un anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC, usando sucesivamente un anticuerpo monoclonal de conejo anti-PEG y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa fluor 405. Por lo tanto, la RO se calculó realizando la relación entre el MFI del pozo sin exceso de FR104 y el pozo con exceso de FR104. La sensibilidad del método fue de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de FR104. La precisión de las réplicas intradonantes osciló entre el 1% y el 9% (CV) y la precisión entre donantes osciló entre el 16% y el 22% (CV). El nivel de expresión de CD28 se midió mediante el MFI de FR104 en condiciones de exceso.

45 **[0125]** Subpoblaciones de linfocitos T periféricos y estado de activación se evaluaron por citometría de flujo en sangre entera estabilizada usando tubos de recogida de sangre al vacío TransFix/EDTA (Cytomark, Buckingham, Reino Unido). Se midieron los marcadores CD45, CD3, CD28, CD45RO, CD4, CD8, CD25, CD127, CD69 y CCR7 para definir las siguientes subpoblaciones: células T ingenuas, células T activadas, células T de memoria, células T de memoria central, células T de memoria efectora y TEMRA, en los compartimentos CD4+ y CD8+. También se han registrado nTreg.

50 **[0126]** Todos los demás ensayos de laboratorio incluyendo EBV PCR y los anticuerpos EBV IgG e IgM se han realizado por el laboratorio de biología clínico del centro de investigación, utilizando procedimientos estándar.

55 **[0127]** La capacidad de respuesta inmune de las células de sangre se investigó ex-vivo. Las muestras de sangre se recolectaron por punción venosa o mediante cánula permanente en el antebrazo en tubos de recolección de sangre TruCulture® (Myriad RBM, Austin, Tx) que contenían estímulos SEB + LPS y en tubos de control, para cada extracción de sangre. Los tubos se mantuvieron a 37°C durante 24 h antes de que el plasma se extrajera mecánicamente y se congelara hasta el análisis de las citocinas IL-2, IFN γ e IL-8. Las citocinas se analizaron utilizando el mismo método ELISA utilizado para evaluar las citocinas en el suero.

Inmunoevaluación

60 **[0128]** Se recogieron muestras de sangre para detección de anticuerpos anti-FR104 en el cribado y en el día 1 (antes de la dosis), días 15, 29, 57, 85 y/o 113. La titulación de anticuerpos anti-FR104 en suero se realizó usando un ensayo de inmunogenicidad puente de electroquimioluminiscencia validado. El método utilizó un tratamiento ácido de las muestras de suero para permitir, cuando fuera necesario, la disociación de FR104/FR104-ADA seguida de un formato puente de ensayo de un solo paso mediante el cual los anticuerpos anti-FR104 (ADA) se capturan en solución mediante una combinación de biotinilado y formas etiquetadas sulfo-TAG de FR104. La formación de complejos es posteriormente

detectada por ECL en la plataforma MSD. La sensibilidad del ensayo fue de 3,46 ng/ml (con un CV del 31%) y la tolerancia media al fármaco fue de 179 µg/ml (con un CV del 26%).

Inmunización de KLH

[0129] Se recogieron muestras de sangre para la detección de anticuerpos anti-KLH en el cribado y en los días 15, 29, 57, 85 y/o 113. Los anticuerpos anti-KLH fueron dosificados por un ELISA cualificado en el suero usando el kit comercial "IgG Anti-KLH Humano" (nº 700-140-KLG de Alpha Diagnostic International, San Antonio, Tx).

Métodos estadísticos

[0130] El tamaño de la muestra se determinó para este estudio basándose en un precedente establecido por otros estudios de Fase 1 de diseño similar y después de consultar con la Agencia Reguladora de Medicina y Atención Sanitaria (Reino Unido), el Instituto Paul Ehrlich (Alemania), la Agencia Federal de Medicamentos y Productos Sanitarios (Bélgica) y Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Se consideró suficiente un tamaño de muestra de 64 voluntarios sanos para cumplir los objetivos del protocolo. Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software SAS (versión 9,2) para cálculos estadísticos y SAS para fines gráficos.

RESULTADOS

Flujo participante

[0131] El estudio se realizó en 1 centro clínico del 27 de marzo 2015 al 19 de febrero de 2016. Un total de 65 sujetos se dividió en 2 partes de estudio. En la Parte 1, a 37 sujetos se les administró una única dosis intravenosa de FR104 (que varía de 0,005 a 1,5 mg/kg) y a 14 sujetos se les administró una única dosis intravenosa de placebo. En la Parte 2, a 10 sujetos se les administraron dos dosis de FR104 (entre 0,200 y 0,500 mg/kg) y a 4 sujetos se les administraron dos dosis intravenosas de placebo, separadas por un intervalo de 28 días. Todos menos uno de los sujetos (en la Parte 1, Cohorte A, Grupo 2) recibieron el fármaco del estudio según lo planeado (ver arriba). Todos los sujetos fueron aleatorizados y tratados. Todos los sujetos completaron el estudio y fueron incluidos para el análisis de seguridad. Un sujeto (Parte 1, Cohorte A, Grupo 2) fue excluido de los análisis de PK y PD debido a una desviación del protocolo relacionada con una disfunción de la bomba de infusión. Debido a la administración de esta dosis incorrecta, se incluyó un sujeto adicional en el Grupo 2. Un sujeto de la Parte 2 no recibió la segunda dosis de FR104 de 0,500 mg/kg debido a que recibió medicamentos concomitantes prohibidos después de un tratamiento EA no relacionado. El sujeto completó todas las visitas según el protocolo. El sujeto no fue excluido de la población de PK y PD, pero los datos tomados después del día 29 se excluyeron del análisis. No hubo sujetos para los que el investigador o el patrocinador rompieron el código de cegamiento.

Datos de referencia

[0132] Se muestran los datos demográficos de los sujetos en la Tabla 11. Blanco representó la mayor parte de los sujetos en todos los grupos de tratamiento. La edad, el peso y el IMC de todos los sujetos cayeron dentro de los criterios de inclusión definidos en el protocolo.

Tabla 11: Datos demográficos de los sujetos al inicio del estudio

	Placebo	FR104 total
Población de seguridad	18	47
Género, n (%)		
Varón	12 (67)	26 (55)
Hembra	6	21
Edad (años)		
Media (DE)	52,7 (9,28)	52,1 (7,88)
Mediana	56,7	55,5
Intervalo	20; 60	22; 60
Raza, n (%)		
Blanco	17 (94)	46 (98)
Asiático	1 (6)	0
Negro/Africano	0	1 (2)
Americano		

(Continuación)

Tabla 11: Datos demográficos de los sujetos al inicio del estudio

	Placebo	FR104 total
IMC (kg/m ²)		
Media (DE)	25,04 (2,25)	25,64 (2,196)
Mediana	24,88	25,78
Intervalo	20,2; 28,8	19,9; 29,7

Farmacocinética

[0133] Dosis más bajas de FR104 a 0,005, 0,020 y 0,050 mg/kg resultó en concentraciones medibles insuficientes para la estimación de parámetros de PK fiable. La Figura 5A ilustra los datos de concentración-tiempo de FR104 para los grupos de dosis restantes. En la cohorte A (grupos 1-4, sin inmunización de KLH, dosis FR104 de 0,005 a 0,500 mg/kg), la farmacocinética de FR104 fue aproximadamente lineal desde la dosis de 0,200 mg/kg con un rango de 1/2 entre 146 (0,200 mg/kg) a 182 horas (0,500 mg/kg). En la cohorte B (grupos 7-9bis, inmunización con KLH), como en la cohorte A, la farmacocinética de FR104 fue aproximadamente lineal desde la dosis de 0,200 mg/kg con un rango de 1/2 entre 150 (0,200 mg/kg) y 210 horas (1,500 mg/kg). La Cmax media de FR104 osciló entre 117 y 37700 ng/ml tras dosis de 0,004-1,5 mg/kg y el AUCinf osciló entre 0,705 y 7,010 mg/ml tras dosis de 0,2-1,5 mg/kg.

[0134] El PK de FR104 también se evaluó después de dos infusiones de FR104 a 0,200 y 0,500 mg/kg dado 28 días de diferencia (Parte 2). La farmacocinética fue aproximadamente lineal con una media de entre 169 y 203 horas. Los parámetros farmacocinéticos fueron similares después de la perfusión de FR104 0,200 mg/kg en el día 1 y el día 29. Se observó acumulación de concentraciones séricas después de la perfusión de FR104 0,500 mg/kg, con un aumento de aproximadamente un 20% en el AUC0-28d y el AUCinf normalizados por dosis.

Farmacodinámica

[0135] Después de la infusión de FR104, un CD28 RO dependiente de la dosis sobre las células T en sangre periférica se observó (Figura 5B). Los receptores CD28 se saturaron en el primer momento de muestreo (0,5 horas) después de la infusión de FR104 a dosis de 0,020 mg/kg y superiores. El día 29, la RO todavía estaba por encima del 50% después de la infusión de FR104 a dosis de 0,500 mg/kg y 1,500 mg/kg. El RO de CD28 volvió al 50% de una manera dependiente de la dosis, entre el día 15 (0,020 mg/kg) y el día 85 (1,500 mg/kg). El RO de CD28 se mantuvo por encima del 50% cuando las concentraciones séricas de FR104 estaban justo por encima del límite inferior de cuantificación (<100 ng/mL) y por encima del 80% cuando las concentraciones séricas de FR104 estaban por encima de 200 ng/mL. Esto sugiere que FR104 tiene una alta afinidad por su receptor in vivo y que incluso concentraciones bajas de FR104 pueden ser farmacológicamente activas. Después de la infusión de la segunda dosis a 0,200 mg/kg, los receptores se volvieron a saturar, lo que resultó en una saturación superior al 50% que duró más de 60 días. Dos dosis de 0,500 mg/kg administradas con 28 días de diferencia dieron como resultado una saturación del 100% de los receptores durante más de 60 días.

[0136] No hubo ningún cambio significativo en el recuento total de linfocitos y subconjuntos de linfocitos, incluyendo células naive T, células T de memoria y células Treg, causadas por FR104 a cualquier dosis y cualquier régimen de dosis y los niveles de estos subconjuntos no cambió significativamente en cualquier grupo durante el curso del estudio. El nivel de expresión de CD28 por subconjuntos de linfocitos evaluados midiendo MFI tampoco se vio afectado (Figura 6).

[0137] Debido a la liberación de citoquinas que previamente se produjo después de la administración en el hombre de anti-CD28 mAb de superagonista o divalente antagonista, la liberación potencial de citoquinas ha sido seguido de cerca. No se observó elevación de citocinas en el suero de ningún voluntario. Solo se han registrado los niveles de fondo, que se han considerado no clínicamente relevantes (Figura 7e Figura 8A). Debido a esta variabilidad, el ensayo solo detectó una inhibición significativa de la síntesis de IL-2 inducible después de la administración de FR104 a dosis superiores a 0,100 mg/kg en los puntos de tiempo de 2 y 96 horas, pero no en otros puntos de tiempo (Figura 8B). La síntesis inducida por SEB + LPS de INF γ e IL-8, citocinas también secretadas por células no T, no se moduló mediante el tratamiento con FR104 en ningún grupo.

Control de anticuerpos anti-KLH

[0138] El efecto de FR104 de la respuesta a la exposición a KLH se evaluó mediante la medición de anticuerpos anti-KLH. La formación de anticuerpos anti-KLH se retrasó significativamente y en menor grado con dosis crecientes de FR104. Después de una dosis única de 0,020 mg/kg, ya era visible una reducción en la producción de anticuerpos anti-KLH el día 15 después de la inmunización con KLH, que alcanzó un promedio del 50% del grupo placebo el día 29. La respuesta anti-KLH fue mantenida en ese nivel en comparación con el grupo de placebo hasta el último día de observación (día 85). Después de la dosis única de 0,200 mg/kg, la reducción media en la producción de anticuerpos anti-KLH fue de aprox. 85% los días 15 y 29, y del 70% y 60% los días 57 y 85, respectivamente, en comparación con la respuesta del grupo

placebo. Después de la dosis única de 0,500 mg/kg, la reducción media en la producción de anticuerpos anti-KLH fue >90% en los días 15 y 29, y aprox. de 80% y 75% en los días 57 y 85, respectivamente. En el nivel de dosis más alto (FR104 1,500 mg/kg), la formación de anticuerpos anti-KLH se suprimió esencialmente hasta el día 57. Sin embargo, en los días 85 y 113, se registró alguna respuesta (reducción de aproximadamente 75%) (Figura 9).

Inmunogenicidad

[0139] En la Parte 1 Cohorte A (sin inmunización KLH), 0 (0%), 2 (50%), 3 (60,0%) y 1 (20,0%) sujetos fueron informados como positivos con anticuerpos contra FR104 (ADAS) en la última muestra (día 85) después de una infusión de FR104 a 0,005 mg/kg, 0,050 mg/kg, 0,200 mg/kg y 0,500 mg/kg, respectivamente. En la Cohorte B de la Parte I (inmunización KLH), 1 (20%), 3 (60,0%), 4 (80,0%) y 2 (40,0%) sujetos tenían anticuerpos contra FR104 en la última muestra después de FR104 0,020 mg/kg, 0,200 mg/kg, 0,500 mg/kg (día 85) y 1,500 mg/kg (día 113), respectivamente. En la Parte 2 (dosis repetidas), 3 sujetos (60,0%) tenían anticuerpos contra FR104 después de la infusión de FR104 0,200 mg/kg y 0,500 mg/kg en la última muestra (Día 113). Los primeros anticuerpos anti-FR104 se detectaron desde el día 29 en la Parte 1 (cohortes A y B) y desde el día 57 en la Parte 2. Aproximadamente la mitad de los sujetos ADA + (10/22) tenían títulos relativamente bajos (<30). No indujeron EA ni modificaron la liberación de citocinas. Dado que los anticuerpos anti-FR104, cuando estaban presentes, aparecieron sólo después de la desaparición de FR104 en la sangre en todos los sujetos menos uno, no se puede llegar a ninguna conclusión sobre su impacto potencial sobre la PK.

Seguridad

[0140] No se registraron muertes ni eventos adversos graves se produjeron durante el estudio a excepción de un sujeto que se informó con la nefrolitiasis SAE que se consideró no relacionada con el fármaco en estudio por el investigador después de FR104 0,500 mg/kg de infusión y desafío KLH. Ninguno de los sujetos interrumpió el fármaco del estudio o el estudio debido a un evento adverso emergente del tratamiento (TEAE). Un sujeto en la Parte 2 no recibió la segunda dosis de FR104 0,500 mg/kg el Día 29 debido a que recibió medicación prohibida (ibuprofeno, paracetamol y tramadol) para la mialgia EA. El sujeto no fue retirado del estudio y completó todas las visitas del estudio según el protocolo. Todos los TEAE informados fueron de gravedad leve o moderada (Tabla 12). Se informaron TEAE que el investigador consideró al menos posiblemente relacionado con el fármaco del estudio en 5 de los 10 sujetos que informaron TEAE después de la infusión de FR104 y en ninguno de los sujetos después de la infusión de placebo. Por término preferido, los TEAE notificados con mayor frecuencia después de la infusión de FR104 fueron dolor de espalda, dolor de cabeza y vómitos. Posiblemente los eventos relacionados con el tratamiento después de la infusión de FR104 fueron dolor de cabeza, vómitos, estomatitis aftosa, herpes oral, sequedad de boca, náuseas, nasofaringitis, fatiga, gingivitis, disgeusia, diarrea, visión borrosa y enfermedad similar a la influenza.

[0141] No se observaron cambios clínicamente relevantes o consistentes en valores medianos para laboratorio, virología, signos vitales, saturación de oxígeno y parámetros ECG después de la administración del fármaco del estudio en cualquier voluntario.

[0142] Los resultados de carga viral EBV post-basal fueron negativos o débilmente positivos (excepto para 1 sujeto) y los resultados de anticuerpos IgM de cápside EBV post-basales fueron negativos o equívocos para todos los sujetos en el estudio (Figura 10). Los anticuerpos IgG de la cápside del VEB y del antígeno nuclear fueron positivos en todos los sujetos (ya que pertenecían a los criterios de inclusión) y se mantuvieron en su nivel basal durante todo el estudio (datos no mostrados). Un sujeto que recibió 2 dosis intravenosas de placebo tuvo un resultado positivo de carga viral de VEB el día 15 con una carga viral de log 3,83 UI/ml, un valor que se consideraría lo suficientemente alto como para ser de preocupación clínica en un entorno de trasplante, por ejemplo. En el siguiente momento del día 29, la prueba fue negativa. Las evaluaciones posteriores fueron negativas el día 43, positivas con una carga viral de 2,7 log UI/ml el día 57, negativas el día 85 y positivas el día 113 con una carga viral <2,5 log UI/ml.

[0143] Durante el estudio, un intervalo QTcF de >450 ms y un cambio desde la línea base QTcF de >30 ms se informaron en 1 sujeto en la cohorte B después de la infusión de placebo y la exposición a KLH. En la Parte 2, se informó un intervalo QTcF >450 ms en 1 sujeto después de la perfusión de FR104 0,200 mg/kg, un cambio de QTcF desde el inicio de >60 ms en 1 sujeto después de FR104 0,200 mg/kg y un cambio de QTcF desde el inicio de >30 ms se informó en 1 y 3 sujetos después de la infusión de FR104 0,200 mg/kg y FR104 0,500 mg/kg, respectivamente. No se observaron signos vitales clínicamente importantes, se observaron de oximetría de pulso o anomalías ECG en la Parte 1 (cohorte A y B) y la Parte 2.

[0144] No se informaron de anomalías en el examen físico durante el estudio, excepto para 2 sujetos en la Cohorte A y 3 sujetos en la Parte 2. Para estos sujetos, la anomalía se consideró clínicamente significativa y la observación fue notificada como TEAE: nasofaringitis y conjuntivitis para el sujeto en la cohorte A e infección del tracto respiratorio superior, mialgia y gota, para los sujetos de la Parte 2.

Tabla 12: Un resumen de los TEAE por tratamiento en la Parte 1 (Cohorte A y B) y la Parte 2.

Parte 1, Cohorte A						
	Placebo	FR104 0,005 mg/kg	FR104 0,050 mg/kg	FR104 0,200 mg/kg	FR104 0,500 mg/kg	Todos los sujetos FR104
Nº de sujetos con al menos uno:						
TEAE	2 (33,3)	1 (33,3)	3 (75,0)	4 (80,0)	2 (40,0)	10 (58,8)
SAE	0	0	0	0	0	0
TEAE que lleva a la muerte	0	0	0	0	0	0
TEAE suave (peor severidad)	1 (16,7)	0	3 (75,0)	1 (20,0)	0	4 (23,5)
TEAE moderado (peor severidad)	1 (16,7)	1 (33,3)	0	3 (60,0)	2 (40,0)	6 (35,3)
TEAE severo (peor severidad)	0	0	0	0	0	0
TEAE para el que el fármaco de estudio fue descontinuado	0	0	0	0	0	0
TEAE al menos posiblemente relacionado con el tratamiento	0	0	1 (25,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	5 (29,4)
Parte 1, Cohorte B						
	Placebo	FR104 0,005 mg/kg	FR104 0,050 mg/kg	FR104 0,200 mg/kg	FR104 0,500 mg/kg	Todos los sujetos FR104
Nº de sujetos con al menos uno:						
TEAE	7 (87,5)	3 (60,0)	3 (60,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	10 (500)
SAE	0	0	0	1 (20,0)	0	1 (5,0)
TEAE que lleva a la muerte	0	0	0	0	0	0
TEAE suave (peor severidad)	6 (75,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	6 (30,0)
TEAE moderado (peor severidad)	1 (12,5)	1 (20,0)	1 (20,0)	2 (40,0)	0	4 (20,0)
TEAE severo (peor severidad)	0	0	0	0	0	0
TEAE para el que el fármaco de estudio fue descontinuado	0	0	0	0	0	0
TEAE al menos posiblemente relacionado con el tratamiento	2 (25,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	0	3 (15,0)
Parte 2						
	Placebo	FR104 0,200 mg/kg	FR104 0,500 mg/kg	Todos los sujetos FR104		
Nº de sujetos con al menos uno:						
TEAE	3 (75,0)	5 (100,0)	4 (80,0)	9 (90,0)		
SAE	0	0	0	0		

(Continuación)

Parte 1, Cohorte B						
	Placebo	FR104 0,020 mg/kg	FR104 0,200 mg/kg	FR104 0,500 mg/kg	FR104 1,500 mg/kg	Todos los sujetos FR104
5	TEAE que lleva a la muerte	0	0	0		0
10	TEAE suave (peor severidad)	2 (50,0)	2 (40,0)	3 (60,0)		5 (50,0)
	TEAE moderado (peor severidad)	1 (25,0)	3 (60,0)	1 (20,0)		4 (40,0)
15	TEAE severo (peor severidad)	0	0	0		0
	TEAE para el que el fármaco de estudio fue discontinuado	0	0	0		0
20	TEAE al menos posiblemente relacionado con el tratamiento	1 (25,0)	2 (40,0)	3 (60,0)		5 (50,0)

25 DISCUSIÓN

[0145] Este ensayo representa la primera administración a seres humanos de FR104, un antagonista del fragmento de anticuerpo Fab' pegilado humanizado de CD28. El FR04 se toleró bien en todas las dosis, siendo el EA de tratamiento emergente más común el dolor de cabeza. La administración de FR104 no se asoció con el síndrome de liberación de citocinas o la activación de las células T. En intentos anteriores de apuntar a CD28 usando anticuerpos monoclonales anti-CD28 (TGN1412, (Suntharalingam et al), FK734 (Shiao et al)), el desarrollo clínico se complicó por la liberación de citocinas inducida. Como FR104 no se asoció con tales complicaciones, la selección de CD28 con anticuerpos antagonistas monovalentes sigue siendo una estrategia terapéutica atractiva para el bloqueo de la coestimulación.

[0146] La evaluación de citocinas en suero en el hombre demostró la ausencia completa de actividad agonista o superagonista de FR104 a cualquier dosis, incluso después de la administración de dosis repetidas. Los niveles de fondo o cercanos a los de fondo de IFN γ , TNF α e IL-8 en algunos sujetos registrados al inicio o después de la administración de FR104 (Figura 7) están muy por debajo de los medidos después de la administración de TGN1412, que alcanzaron un máximo de 5000 pg/ml para estas dos citocinas (Suntharalingam et al). Los anticuerpos anti-fármaco (ADA), cuando están presentes, se hicieron evidentes en la mayoría de los sujetos sólo después de la eliminación de FR104 del plasma. Por lo tanto, es difícil estimar el efecto de ADA sobre los parámetros de PK y PD y especialmente sobre las citocinas. Sin embargo, en un sujeto (Parte 2, dosis de 0,2 mg/kg de MAD), la ADA se hizo evidente mientras que la RO CD28 todavía era medible. En este sujeto tampoco hubo liberación de citocinas, lo que confirma la observación preclínica de que FR104 en presencia de ADA no recapitula las propiedades agonísticas de los anticuerpos anti-CD28 en su formato IgG. Es de destacar que la incidencia relativamente alta de inmunogenicidad para FR104 está en un rango similar a lo que se ha informado para Cimzia® biológico autorizado (Certolizumab Pegol), un fragmento de anticuerpo Fab' pegilado y algunos otros biológicos como Remicade y Humira; Farmacología clínica CIMZIA BLA 125160/0). FR104 no alteró el recuento total de linfocitos ni los subconjuntos de linfocitos. El fenotipo de las células T tampoco se modificó. Dado que CD28 también puede regular la migración de células T cebadas al tejido diana, estos datos junto con la ausencia de liberación de citocinas y la ausencia de activación de las células T diana refuerzan la actividad puramente antagonista de FR104.

[0147] El PK de FR104 puede ser considerado como aproximadamente lineal a dosis $\geq 0,200$ mg/kg. Solo se observaron ligeras variaciones en t_{1/2} y en AUC_{inf} y parámetros relacionados entre los grupos (SAD y MAD) para la misma dosis.

55 REFERENCIAS

[0148]

Bowen, M., Armstrong, N., y Maa, Y.-F. (2012). Investigating high-concentration monoclonal antibody powder suspension in nonaqueous suspension vehicles for subcutaneous injection. J. Pharm. Sci. 101, 4433-4443.
Findlay L, Eastwood D, Stebbings R, Sharp G, Mistry Y, Ball C, et al. Improved in vitro methods to predict the in vivo toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412. J Immunol Methods. 2010;352:1-12. Haanstra KG., Dijkman K., Bashir N., et al. Selective Blockade of CD28-Mediated T Cell Costimulation Protects Rhesus Monkeys against Acute Fatal Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol. 2015 Jan 14. pii: 1402563. [Epub antes de impresión].
Haley PJ. Small molecule immunomodulatory drugs: challenges and approaches for balancing efficacy with

toxicity. *Toxicol Pathol.* 2012;40(2):261-266.

Jackisch, C., Müller, V., Maintz, C., Hell, S., y Ataseven, B. (2014). Subcutaneous Administration of Monoclonal Antibodies in Oncology. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 74, 343-349.

Kean L. et al, T cell Costimulation Blockade in Transplantation. Oral communication at the Nantes Actualités Transplantation Meeting, June 5-6, 2014, Nantes, Francia

Melichar, B., Studentová, H., Kalábová, H., y Vitásková, D. (2014). Role of subcutaneous formulation of trastuzumab in the treatment of patients with HER2-positive breast cancer. *Immunotherapy* 6, 811-819.

Ohresser M, Olive D, Vanhove B, Watier H. Risk in drug trials. *Lancet.* 2006 368(9554):2205-6.

Poirier, N., Dilek, N., Mary, C., et al. FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody, Prevents Alloimmunization and Allows Calcineurin Inhibitor Minimization in Nonhuman Primate Renal Allograft. *Am J Transplant.* 2015 (1):88-100.

Poirier, N., Mary, C., Dilek, N. et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody. *Am J Transplant.* 2012 (10):2630-40.

Poirier, N., Mary, C., Le Bas-Bernadet, S., N. et al. Advantages of Papio anubis for preclinical testing of immunotoxicity of candidate therapeutic antagonist antibodies targeting CD28. *MAbs.* 2014 (3):697-707.

Shiao SL, McNiff JM, Masunaga T, Tamura K, Kubo K, y Pober JS. Immunomodulatory properties of FK734, a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities. *Transplantation.* 2007;83(3):304-13.

Shpilberg, O., y Jackisch, C. (2013). Subcutaneous administration of rituximab (MabThera) and trastuzumab (Herceptin) using hyaluronidase. *Br. J. Cancer* 109, 1556-1561.

Stebbins R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. 'Cytokine storm' in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve pre-clinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol.* 2007;179:3325-3331.

Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, y Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 2006;355(10):1018-28.

Vierboom et al., Clinical efficacy of a new CD28-targeting antagonist of T cell co-stimulation in a non-human primate model of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2015.

Weinblatt, M.E., Schiff, M., Valente, R., van der Heijde, D., Citera, G., Zhao, C., Maldonado, M., y Fleischmann, R. (2013). Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: findings of a phase IIIb, multinational, prospective, randomized study. *Arthritis Rheum.* 65, 28-38.

LISTA DE SECUENCIAS

[0149]

<110> INMUNOTERAPÉUTICA OSE

<120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS ANTI-CD28 FORMULADOS PARA ADMINISTRACIÓN A HUMANOS

<130>

<150> EP 15200281.2

<151> 2015-12-15

<150> EP 16306537.8

<151> 2016-11-22

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH-hCH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Gln o Ninguno

<400> 1

ES 2 862 395 T3

Xaa Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Gln Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 225 230

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL-hCkappa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (96)..(96)
 <223> Xaa = Cys o Ala o Asn

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Thr	Asn	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn	20	25	30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Asp	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Ala	Ala	Thr	His	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Xaa	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											210			

<210> 3
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH-hCH1

<400> 3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	20	25	30	
Ile	Ile	His	Trp	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Trp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Gln	Tyr	Asn	Ala	Gln	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Arg	Asp	Asp	Phe	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Pro	Tyr	Trp	Gly	100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Ala	Ala	225	230										

ES 2 862 395 T3

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL-hCkappa

<400> 4

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys
          85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205

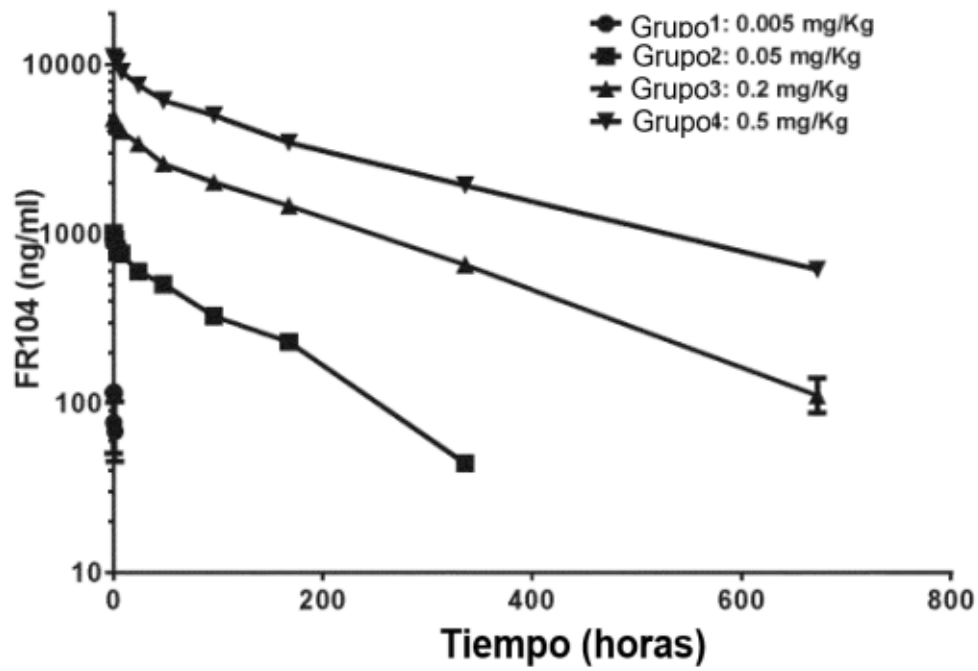
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
  
```

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' que consiste en un heterodímero de (i) una primera proteína de SEQ ID NO: 1, que está pegilada en su extremo C-terminal, y (ii) una segunda proteína de SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de una afección susceptible de mejorarse o prevenirse mediante la inhibición de una respuesta inmune de células T, siendo dicha afección un rechazo de tejido trasplantado, una vasculopatía crónica por aloinjerto, un injerto contra enfermedad huésped, una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T, aterosclerosis, una enfermedad inflamatoria o hipersensibilidad de tipo IV, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' se administra por vía intravenosa a un sujeto humano que lo necesita y donde la cantidad efectiva del fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' está entre 0,05 y 1,5 mg/kg de peso corporal en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada más de 8 semanas.
2. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y menos de 0,5 mg/kg de peso corporal, administrado en un horario de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas o una vez cada 6 semanas.
3. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,05 y 0,2 mg/kg de peso corporal administrados en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o una vez cada cinco semanas.
4. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz está entre 0,5 y 1,5 mg/kg de peso corporal, administrada en un horario de dosificación de una vez cada al menos cuatro semanas. de 0,5 mg/kg a una vez cada al menos 8 semanas para 1 mg/kg y una vez cada más de 8 semanas para dosis superiores a 1 mg/kg.
5. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' induce al menos un 80% de ocupación del receptor CD28 durante el período de tiempo entre dos administraciones de dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab'.
6. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es $0,5 \pm 10\%$ mg/kg de peso corporal administrado en un programa de dosificación de una vez cada dos semanas.
7. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es 0,5 mg/kg de peso corporal administrados en un programa de dosificación de una vez cada dos semanas.
8. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es $1,5 \pm 10\%$ mg/kg de peso corporal administrado en un programa de dosificación de una vez cada cuatro semanas.
9. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es 1,5 mg/kg de peso corporal administrado en un programa de dosificación de una vez cada cuatro semanas.
10. El fragmento de anticuerpo anti-CD28 Fab' de la reivindicación 1 para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la afección se selecciona del grupo de encefalomiелitis autoinmune, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o diabetes tipo 1.

Figura 1

A.



B.

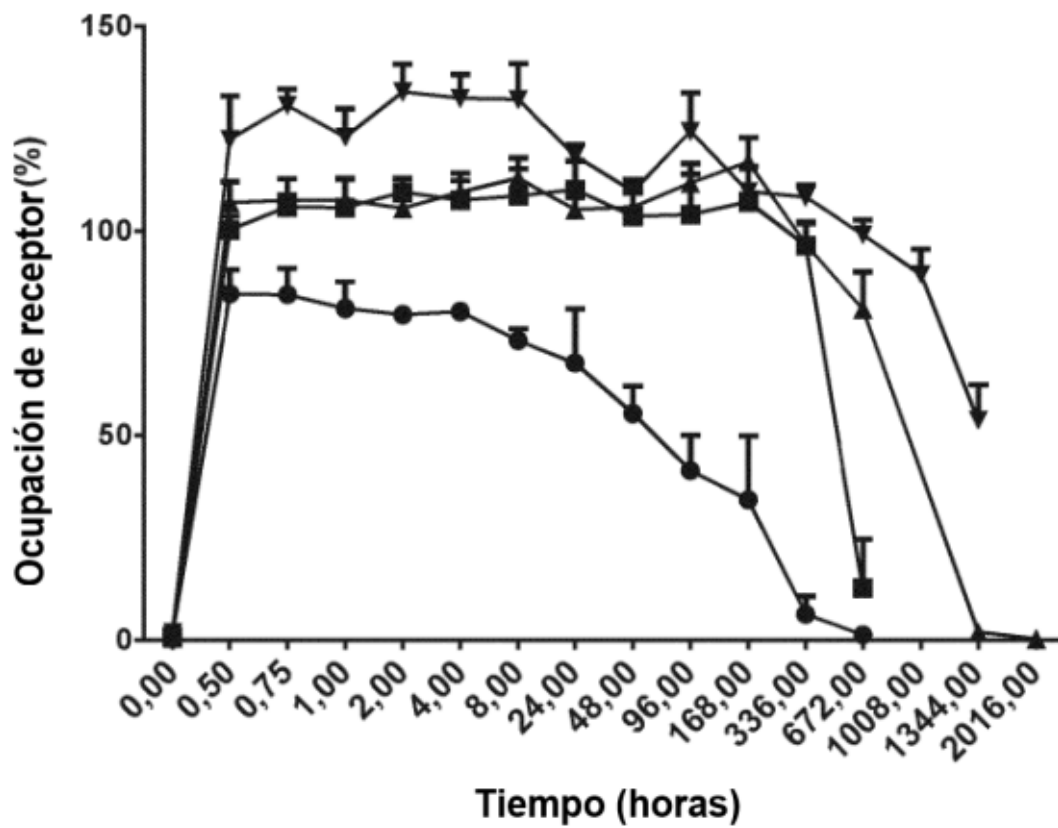


Figura 2

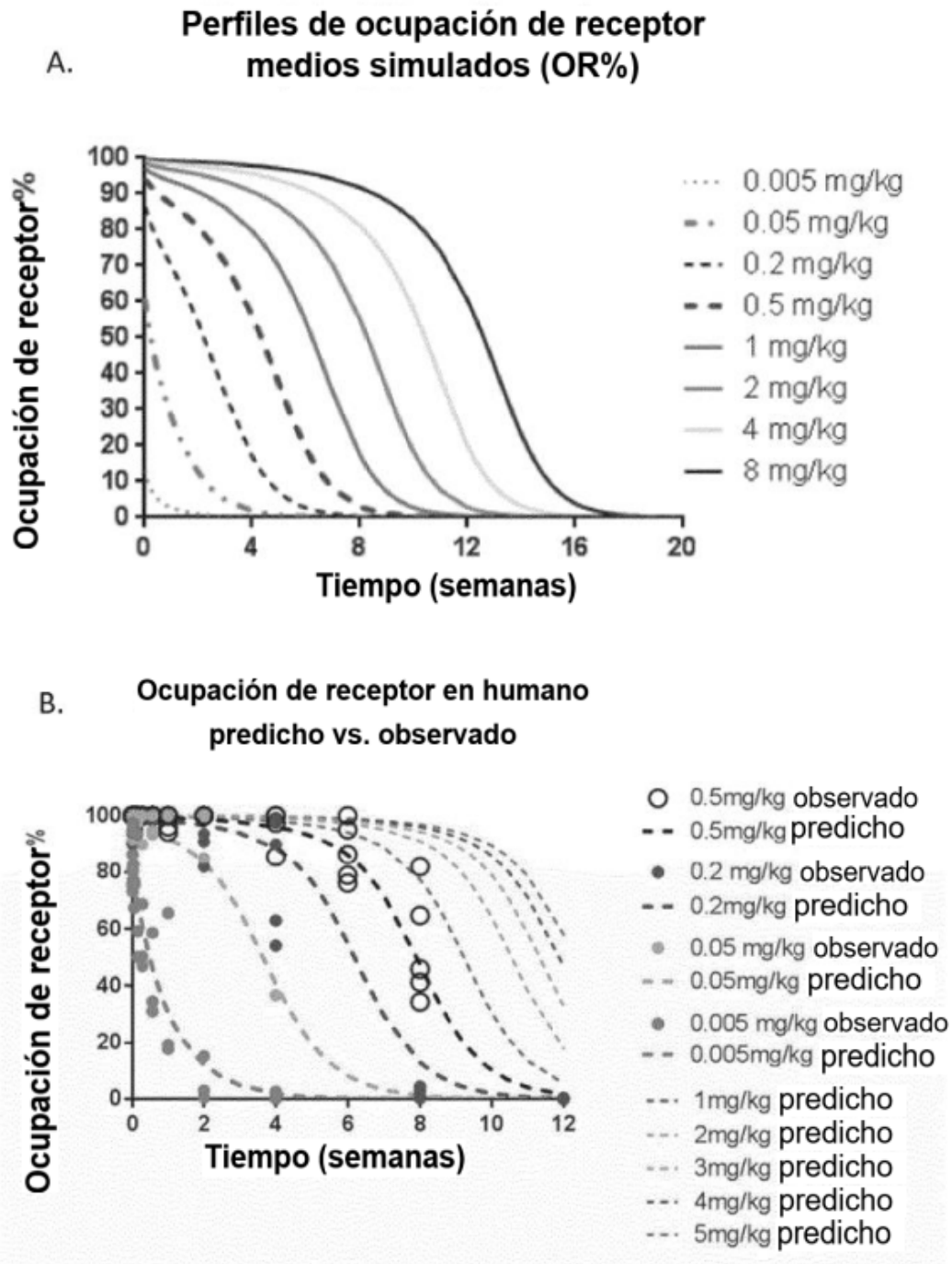


Figura 3

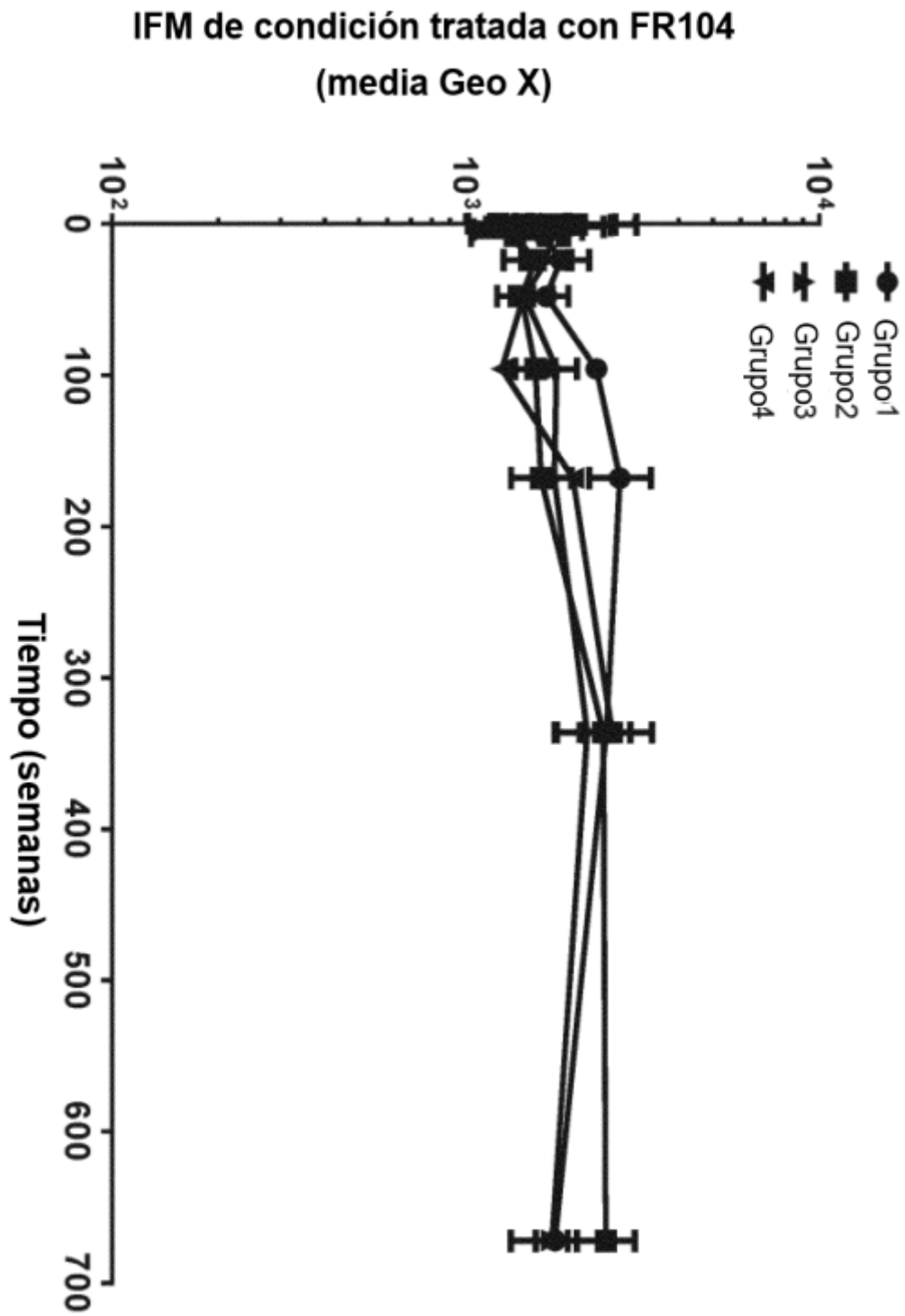


Figura 4

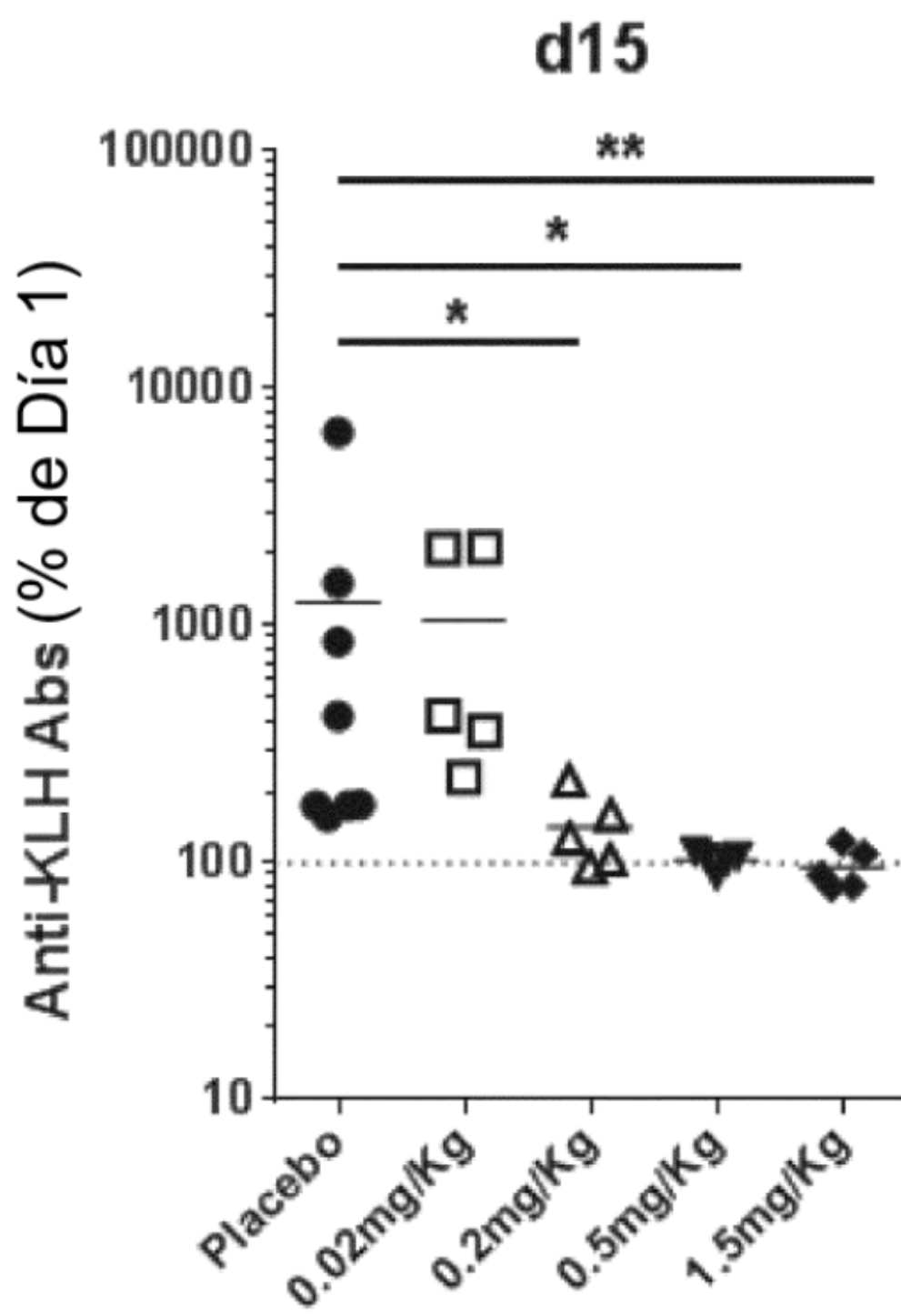


Figura 5

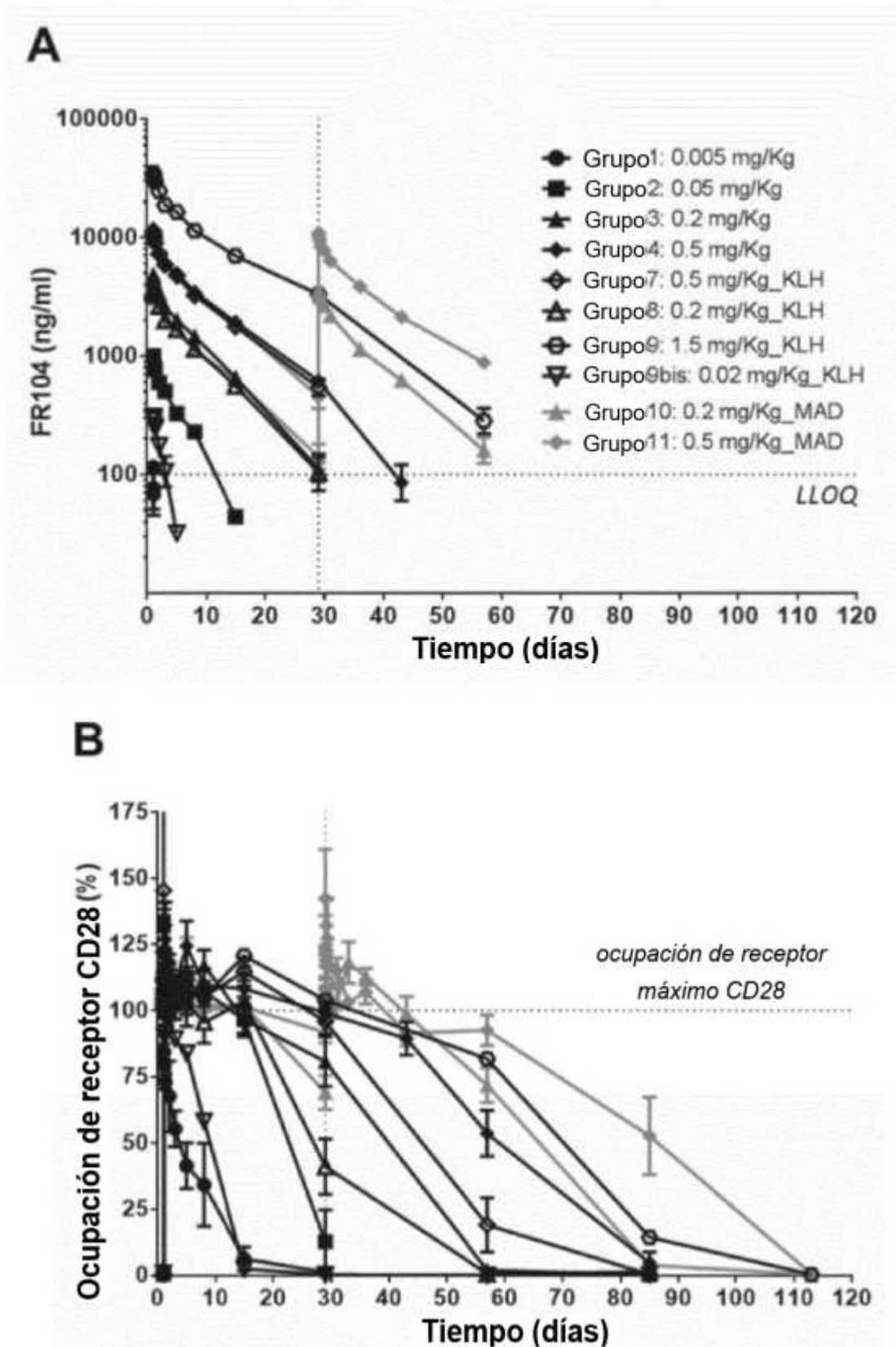


Figura 6

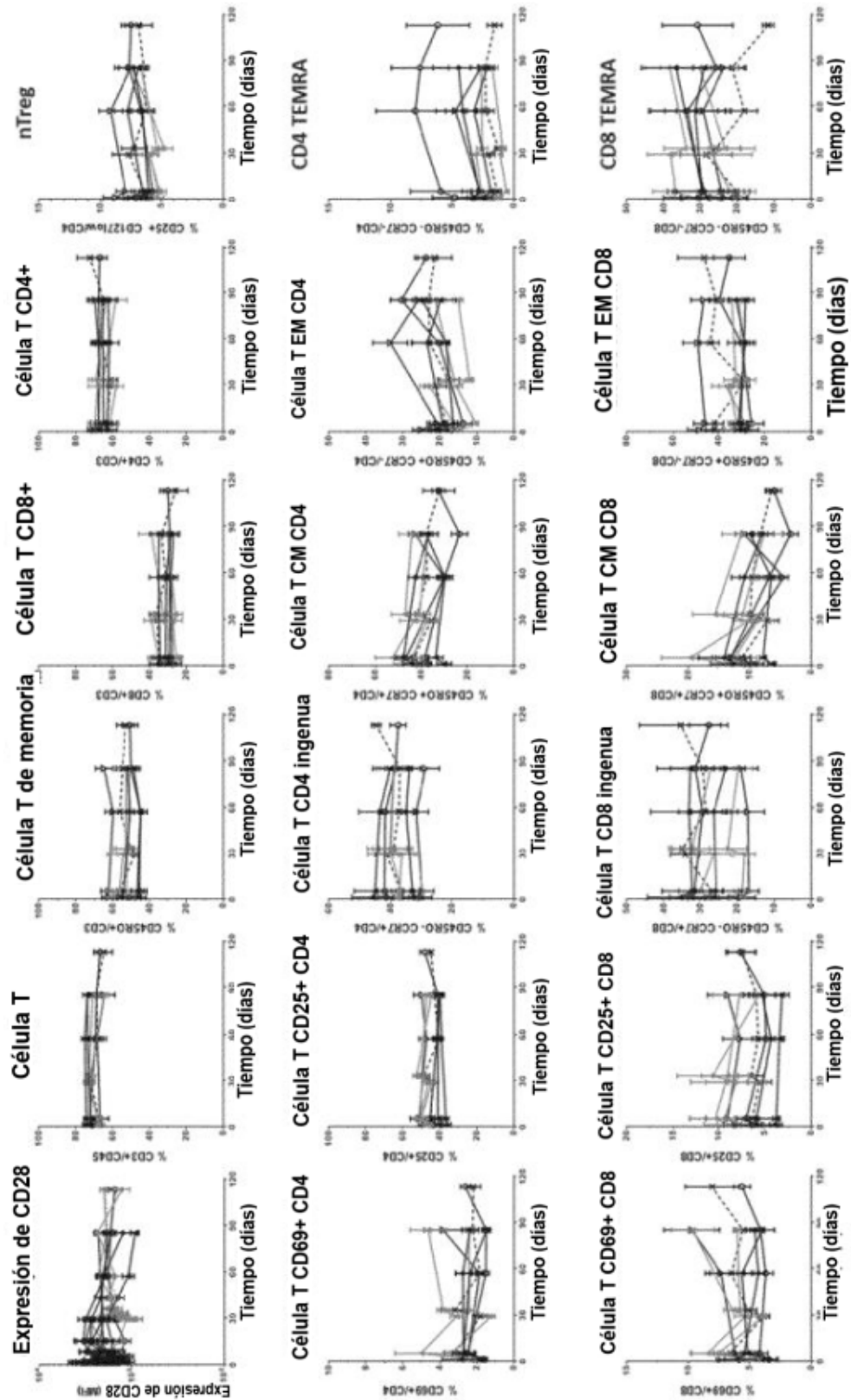


Figura 7

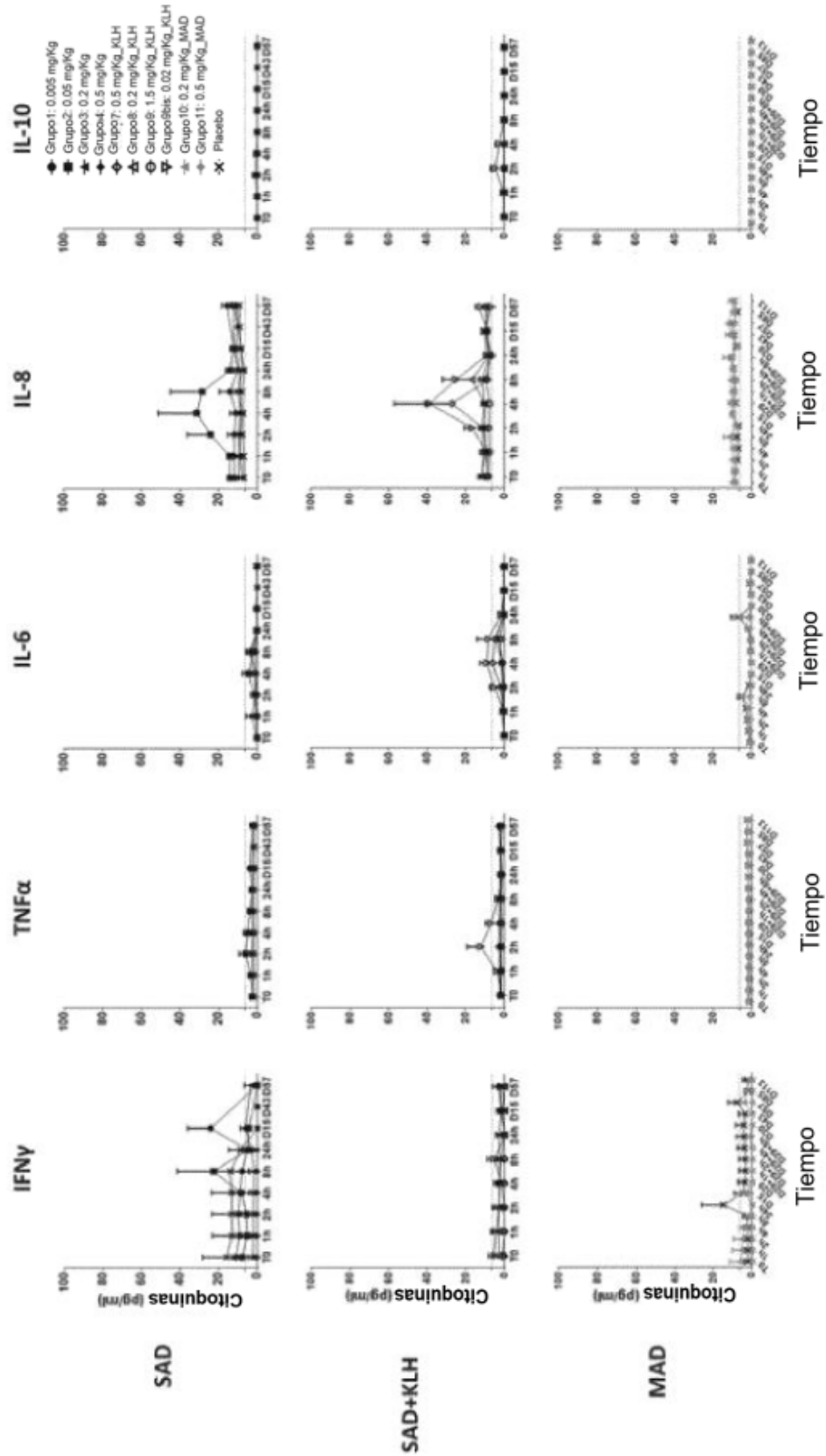


Figura 8

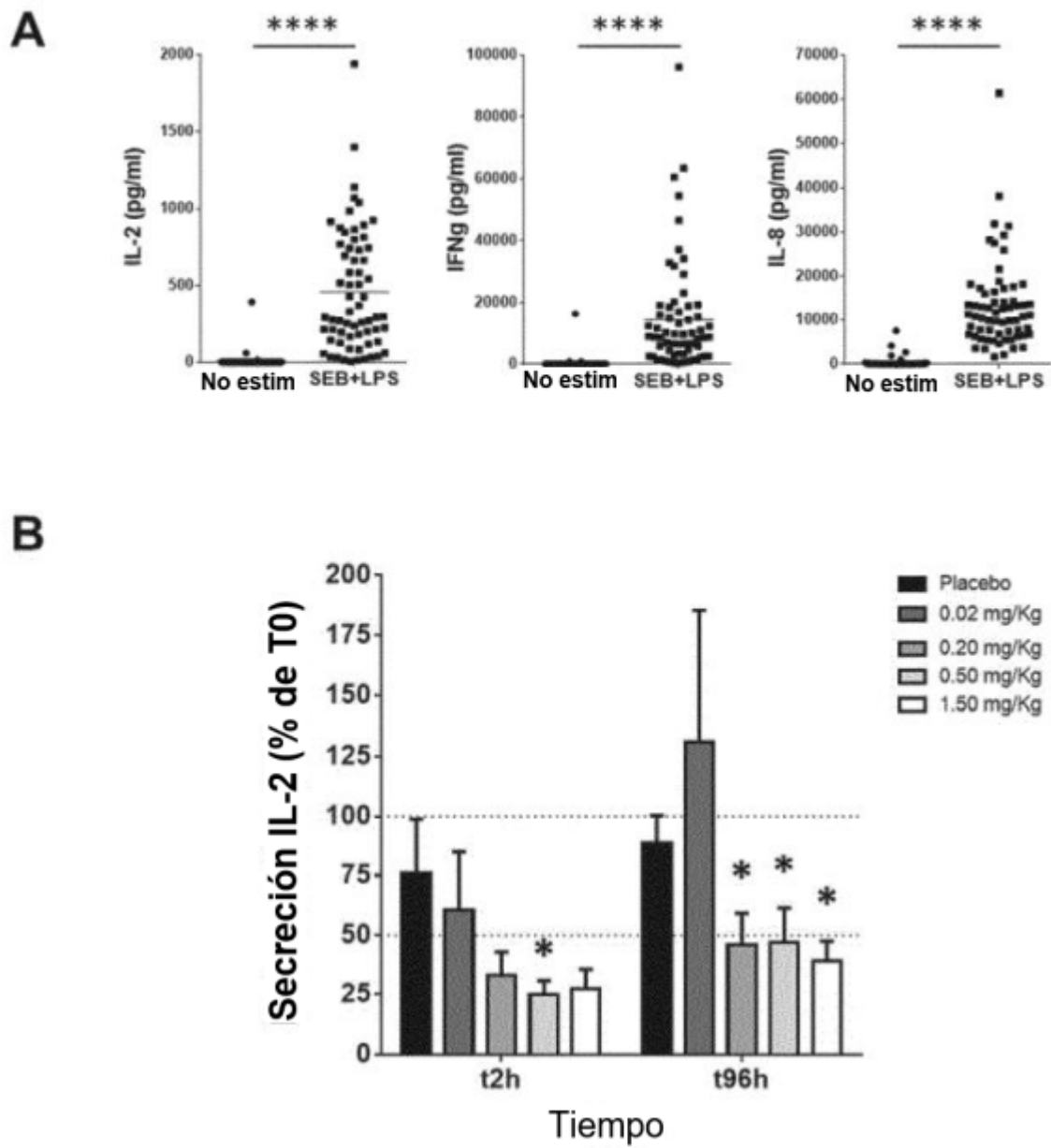


Figura 9

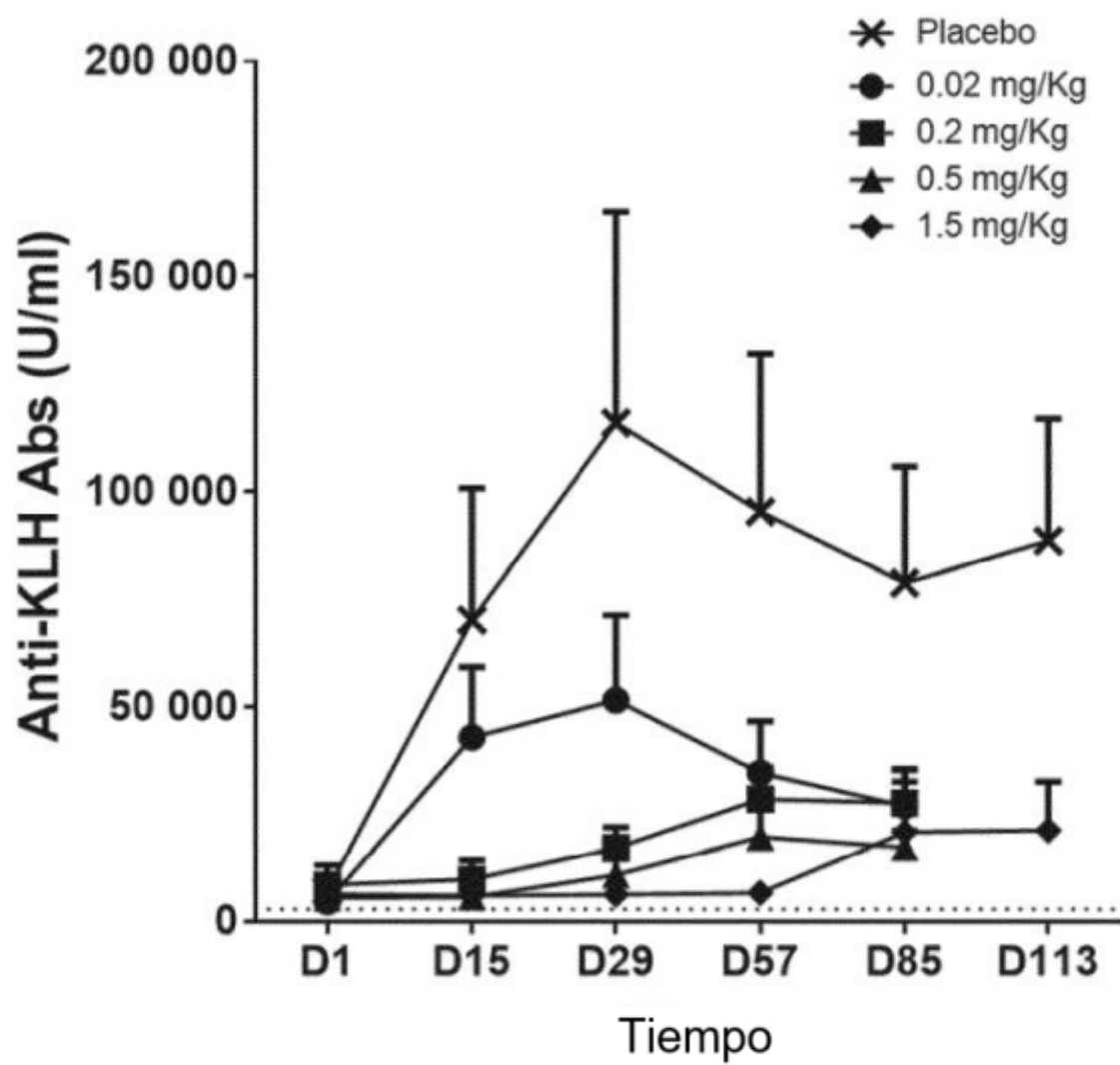


Figura 10

