

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 781**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07000627 .5**
96 Fecha de presentación: **26.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1803466**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Tratamiento de la inflamación articular crónica mediante un anticuerpo aglicosilado anti-CD3**

30 Prioridad:
26.09.2001 GB 0123156

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)
EWERT HOUSE, EWERT PLACE
SUMMERTOWN, OXFORD OX2 7SG, GB**

72 Inventor/es:
**ISAACS, JOHN;
WALDMANN, HERMAN y
HALE, GEOFFREY**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 781 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

Tratamiento de la inflamación articular crónica mediante un anticuerpo aglicosilado anti-CD3.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al tratamiento de la inflamación crónica de una articulación, en particular sinovitis inflamatoria crónica, más en particular artritis reumatoide y afecciones relacionadas, usando anticuerpos dirigidos al antígeno CD3.

Antecedentes de la invención

10 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones y otros tejidos, y que tiene una incidencia anual de 1 a 10 personas por cada 10.000 de la población de adultos en los países desarrollados y una prevalencia de aproximadamente un 1 %. Aparte del dolor y el sufrimiento que produce esa afección, la naturaleza progresiva de la enfermedad tiene un efecto significativo sobre la morbilidad y la mortalidad, con una relación estándar de la mortalidad de hasta 3,0. El coste anual de la enfermedad solo en EE.UU. se ha estimado que supera los 1.000 millones de dólares (Brooks, The Lancet, 30 de enero de 1993, pág. 286). Los procedimientos actuales de tratamiento de la enfermedad distan mucho de ser satisfactorios y los problemas incluyen la dificultad de predicción de la respuesta y el hecho de que muchos fármacos no son bien tolerados y/o tienen potencialmente efectos adversos peligrosos. Hay otras enfermedades relacionadas "reumáticas" con una inflamación comparable del tejido sinovial, entre ellas la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica y algunas formas de la osteoartritis que se pueden considerar también bajo la denominación de inflamación sinovial crónica.

20 El documento WO 93/97899 se refiere al tratamiento de la inflamación de articulaciones mediada por células T usando un anticuerpo que reconoce el antígeno CD_w52, solo o en combinación con un anticuerpo anti-CD4. Se describe en particular el uso de un anticuerpo monoclonal humanizado, Campath-1H, para tratar la artritis reumatoide. Si bien esta terapia ofrece la esperanza de una mejora significativa, implica una intensa depleción de linfocitos T sistémicos. Mientras que los niveles de los linfocitos T en el paciente son bajos y, por ello, al menos en teoría están inmunocomprometidos y son vulnerables a la infección, los síntomas de enfermedad retornan. El equilibrio entre riesgo de infección y la eficacia terapéutica hace que los médicos no encuentren atractivo el Campath-1H para afecciones crónicas tales como la artritis reumatoide. También ha sido sugerido el uso de anticuerpos anti-CD4 para tratamiento de inflamaciones crónicas de articulaciones, pero hasta la fecha no se ha demostrado que tales anticuerpos no sean adecuadamente eficaces en la clínica.

30 Se puede encontrar una discusión del antígeno CD3 en, por ejemplo, el informe de la First International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. También se describen varios anticuerpos glicosilados dirigidos contra el antígeno CD3 en los informes de esta serie de Talleres y Conferencias, en particular en la Tercera y la Cuarta, publicadas por Oxford University Press. Por tanto, los anticuerpos anti-CD3 se conocen desde hace aproximadamente 20 años, pero han tenido sólo un uso limitado como agentes inmunosupresores en, por ejemplo, el tratamiento de episodios de rechazo después de trasplantes de aloinjertos renales, hepáticos y cardíacos debido a las reacciones a la primera dosis, que pueden ser graves.

35 Se sabe que los anticuerpos monoclonales anti-CD3 se pueden usar para sensibilizar células T a estímulos proliferativos secundarios tales como IL1 (interleuquina 1) e IL2 (interleuquina 2). Además, ciertos anticuerpos monoclonales de CD3 son en sí mismos mitógenos para las células T. Esta propiedad depende del isotipo y es resultado de la interacción del dominio Fc del anticuerpo de CD3 con receptores Fc sobre la superficie de células accesorias. Se han usado anticuerpos de CD3 de roedores para influir sobre el estado inmunológico por supresión, intensificación o redirección de respuestas de células T a antígenos.

40 El documento U.S. n.º. 5.968.509 se refiere a anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos a CD3 y describe su uso para controlar el rechazo de injertos y tratar linfomas. El documento U.S. n.º. 5.585.097 se refiere a anticuerpos anti-CD3 del tipo descrito en la patente U.S. n.º. 5.968.509, en cuanto a que son aglicosilados y por ello tienen efectos secundarios reducidos asociados con la "respuesta a la primera dosis" cuando se usan en terapia.

45 Malfait y col., Arthritis and Rheumatism vol. 44, n.º. 5, mayo de 2001, págs. 1215-1224, se refieren a artritis crónica inducida por colágeno en ratones DBA/1 como modelo para ensayar terapias que modifican la enfermedad e inducen la remisión. Una terapia investigada era terapia combinada de anticuerpo anti-CD3 más anticuerpo factor de necrosis antitumoral administrada después de haberse manifestado los síntomas que bloqueaban la progresión de la artritis en el ratón durante el resto del período de estudio de 56 días.

Hughes y col., J. Immunol., 150, no. 8(2), página 81A, Resumen 450 también se refiere a artritis inducida por colágeno en ratones DBA/1 como modelo de artritis reumatoide. La administración simultánea de fragmentos F(ab')₂ anti-CD3 con el colágeno tuvo como resultado una disminución significativa de la gravedad de la enfermedad.

55 El documento CA-2 224 256-A1 se refiere al tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero con un principio activo anti-CD3 no nitrogenado. Se divulga el tratamiento de ratones NOD diabéticos con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos monoclonales anti-CD3. También se indica el efecto de los fragmentos de la transcripción génica de

citoquinas y la producción de citoquinas por las células del bazo estimuladas en los ratones.

El documento US-5 183 657 se refiere al uso de anticuerpos contra el TNF α humano para prevenir o tratar las condiciones relacionadas con el shock que surgen de la terapia con anticuerpos anti-linfocitos, por ejemplo con OKT3.

- 5 El modelo de murino descrito antes depende mucho del estímulo impulsado por antígeno para provocar la actividad de células T. Hasta el momento no se han identificado tales antígenos estimuladores para la artritis reumatoide humana, la espondilitis anquilosante o la artropatía psoriásica. En ausencia de indicadores de que la enfermedad de murinos es comparable a los trastornos sinoviales humanos, no es posible extrapolar datos sobre beneficios terapéuticos para la artritis reumatoide humana y trastornos sinoviales inflamatorios.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo anti CD3 aglicosilado para usar en el tratamiento de una inflamación crónica de una articulación.

Tal como se usan en el presente documento, los términos tienen las definiciones indicadas:

“CD3” significa designación de grupo 3;

- 15 “aglicosilado” significa en el presente documento un anticuerpo que ha perdido su sitio de glicosilación principal por una mutación de asparagina en la posición 297 a alanina;

- 20 “reacción de la primera dosis” significa una reacción de liberación de citoquinas que se sabe que sigue a la administración de la primera dosis de anticuerpos de CD3 y frecuentemente asociada con una morbilidad e incomodidad significativas para el paciente; “afinidad” en relación a un anticuerpo significa la capacidad de cada uno de los brazos del anticuerpo para unirse a su ligando (el antígeno).

- 25 El tratamiento de acuerdo con la invención usando un anticuerpo anti CD3 aglicosilado tiene la principal ventaja de que sólo se requiere un tratamiento a corto plazo para proporcionar beneficios sostenidos a largo plazo. Por ejemplo, el tratamiento se puede llevar a cabo durante un período de hasta 2 semanas, por ejemplo de 1 a 5 días, sin una nueva administración posterior durante al menos 6 meses. Este tratamiento proporciona al paciente un beneficio sostenido durante un período de como mínimo 6 meses y, en muchos casos, mucho mayor, por ejemplo, de hasta 24 meses o más.

El uso de un anticuerpo anti CD3 de acuerdo con la presente invención tiene también la ventaja de que no da por resultado depleción de linfocitos T, como es el caso con Campath 1-H.

- 30 La terapia con un anticuerpo anti-CD3 de acuerdo con la invención es tal se eviten las reacciones a la primera dosis asociadas con anticuerpos anti CD3 o que al menos se reduzcan a un nivel que pueda ser tolerado por el paciente. De acuerdo con la invención, las reacciones a la primera dosis se reducen mediante la modificación del anticuerpo y, especialmente aglicosulación. Dicha mutación en la región Fc del anticuerpo está diseñada para prevenir la unión a los receptores Fc.

- 35 Opcionalmente, el anticuerpo se puede administrar con otra sustancia que reduzca la reacción. Ejemplos de sustancias que pueden reducir las reacciones a la primera dosis cuando se administran con un anticuerpo anti-CD3 son la profilaxis con esteroides y antihistamínicos.

- 40 El anticuerpo anti-CD3 se puede administrar con otros agentes terapéuticos para tratar la inflamación crónica de articulaciones y los anticuerpos se pueden usar junto con tales agentes como parte de una terapia global para esa afección. Entre los ejemplos de estos otros agentes terapéuticos están incluidos esteroides, anticuerpos anti-TNF. Muchas terapias para la inflamación crónica de articulaciones son inmunosupresoras y éstas pueden ser eficaces para reducir la reacción a la primera dosis del anticuerpo anti-CD3. Puede haber también una demora del tiempo entre la administración del anticuerpo anti CD3 y el paciente que experimenta cualquier beneficio terapéutico y esta demora del tiempo puede extenderse a semanas. El uso del anticuerpo anti CD3 como parte de una estrategia global junto con otros agentes terapéuticos puede ayudar a aliviar los síntomas de la afección durante esta demora del tiempo.

Descripción detallada de la invención

El documento WO 00/05268 describe la secuencia completa del anticuerpo anti CD3 quimérico preferido, que es parte humanizado, adecuado para uso en la presente invención.

- 50 Los anticuerpos preferidos para uso en el presente procedimiento son uno o más de los anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos aglicosilados y anticuerpos que tienen las CDR contenidas en los anticuerpos OKT3 e YTH 12.5.14.2. El anticuerpo OKT3 se trata en publicaciones tales como la de Chatenoud y col., Transplantation, 1991, 51, 334 y The New England Journal of Medicine paper, 1985, 313, 339 y también en la patente europea n°. 0 018 795 y la patente de EE.UU. n°. 4.361.539. El anticuerpo YTH 12.5.14.2 (denominado en lo sucesivo en el

presente documento YTH 12.5) se trata en publicaciones tales como las de Cobbold, S.P. y Waldmann, H., 1984 Nature 308, 460-462 y Clark y col., European J. Immunol. 1989, 19, 381-388, y los anticuerpos 12.5 YTH reconfigurados son objeto de la patente de EE.UU. nº 5.968.509 y sus equivalentes, describiendo en esta solicitud con detalle las CDR presentes en este anticuerpo. Si bien la presente invención no está limitada al uso de cualquier anticuerpo anti CD3 particular, preferentemente, los anticuerpos de la invención tienen al menos una CDR seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) Ser-Phe-Pro-Met-Ala (SEC ID Nº 1)

(b) Thr-Ile-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Arg-Thr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (SEC ID Nº 2)

(c) Phe-Arg-Gln-Tyr-Ser-Gly-Gly-Phe-Asp-Tyr (SEC ID Nº3)

10 (d) Thr-Leu-Ser-Ser-Gly-Asn-Ile-Glu-Asn-Asn-Tyr-Val-His (SEC ID Nº 4)

(e) Asp-Asp-Asp-Lys-Arg-Pro-Asp (SEC ID NO. 5)

(f) His-Ser-Tyr-Val-Ser-Ser-Phe-Asn-Val (SEC ID Nº6),

y sus variantes modificadas de forma conservadora.

15 La expresión "variantes modificadas de forma conservadora" es un término bien conocido en la técnica e indica variantes que contienen cambios que sustancialmente no tienen efecto sobre la afinidad anticuerpo-antígeno.

Las CDR están situadas dentro de las regiones estructurales en la cadena pesada para (a), (b) y (c) y en la cadena ligera para los dominios variables (d), (e) y (f). El anticuerpo también comprende un dominio constante.

20 En una realización preferente, el anticuerpo aglicosilado tiene tres CDR que corresponden a las secuencias de aminoácidos (a), (b) y (c) anteriores o sus variantes modificadas de forma conservadora y/o tres CDR que corresponden a las secuencias de aminoácidos 5 (d), (e) y (f) o sus variantes modificadas de forma conservadora, siendo los CDR (a), (b) y (c) de máxima importancia:

Un anticuerpo aglicosilado preferido para el presente uso o el procedimiento en la presente invención, que tiene una afinidad de unión por el antígeno CD3 tiene así una cadena pesada con al menos una CDR y particularmente tres CDR seleccionadas entre las SECUENCIAS ID Nº 1 a 6 (a a f) y sus variantes modificadas de forma conservadora.

25 Cuando un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con la invención contiene CDR preferidas según se ha descrito en el presente documento anteriormente, contiene convenientemente uno o más de las CDR de cadena pesada especificadas y una o más de las CDR especificadas de cadena ligera. Las CDR (a), (b) y (c) están dispuestas en la cadena pesada en la secuencia: región estructural 1/(a)/región de marco 2/(b)/región marco 3/(c)/región marco 4 en una dirección dominio líder → dominio constante (N terminal a C terminal), y las CDR (d), (e) y (f) están dispuestas en la cadena ligera en la secuencia: región marco 1/(d)/región marco 2/(b)/región marco 3/(f)/región marco 4 en una dirección líder → dominio constante. Se prefiere, por tanto, que cuando todos los tres están presentes en la cadena pesada, los CDR estén ordenados en la secuencia (a), (b), (c) en una dirección dominio líder → dominio constante en la cadena pesada y las CDR estén ordenadas en la cadena ligera en la secuencia (d), (e), (f) en una dirección dominio líder → dominio constante.

35 Se debe tener en cuenta, no obstante, que los anticuerpos aglicosilados para uso de acuerdo con la presente invención pueden contener CDR bastante diferentes de las descritas en lo que antecede y que, incluso cuando no sea éste el caso, puede ser posible tener cadenas pesadas y, en particular, cadenas ligeras que contienen sólo una o dos de las CDR (a), (b) y (c) y (d), (e) y (f) respectivamente. Sin embargo, aunque la presencia de la totalidad de las seis CDR definidas antes no es requerida necesariamente en un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con la presente invención, más habitualmente estarán presentes las seis CDR en los anticuerpos más preferidos.

40 Por tanto, un anticuerpo aglicosilado particularmente preferido tiene una cadena pesada con tres CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos (a), (b) y (c) o sus variantes modificadas de forma conservadora, y una cadena ligera con tres CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos (d), (e) y (f) o variantes de las mismas modificadas de forma conservadora, en el que las CDR de cadena pesada están dispuestas en el orden (a), (b), (c) en la dirección de la región líder constante y las CDR de cadena ligera están dispuestas en el orden (d), (e), (f) en la dirección de la región líder constante.

Las CDR pueden tener un origen diferente para la región de marco variable y/o la región constante y, puesto que usualmente las CDR procederán de rata o de ratón, esto es ventajoso para evitar una respuesta a la antiglobulina en seres humanos, aunque la invención se extiende a anticuerpos con tales regiones originarias de rata o ratón.

50 Más usualmente, las CDR tienen el mismo origen que la región marco pero de diferente origen del de la región constante, por ejemplo, en un anticuerpo quimérico en parte humano, o, más habitualmente, las CDR tienen un origen diferente al de la región marco variable.

Las CDR preferidas tratadas anteriormente en el presente documento se obtienen a partir de un anticuerpo de CD3 de rata. De acuerdo con esto, aunque la región marco de dominio variable puede tener varias formas, es conveniente que sea de las derivadas de un roedor, por ejemplo, una rata o ratón y, más preferentemente, de origen humano o derivado de ser humano. Una posibilidad para el anticuerpo es que tenga una región marco de dominio variable que corresponda a la del hibridoma de YTH 2.5, aunque la región constante preferentemente será de, o derivada de, las de origen humano. Sin embargo, el anticuerpo de la invención está preferentemente forma humanizada en tanto cuanto a la región marco del dominio variable y, como se trata más adelante en el presente documento, a la región constante, u otras formas no inmunógenas.

De acuerdo con esto, la invención comprende además el uso de un anticuerpo aglicosilado que tiene una afinidad de unión por el antígeno CD3 humano y en el que las regiones marco de dominio variable y/o la región constante son de origen humano o derivan de las de origen humano. Ciertas secuencias marco humanas de dominio variable serán preferibles para el injerto de secuencias preferidas de CDR, puesto que la conformación tridimensional de las CDR se mantendrá mejor en tales secuencias y el anticuerpo retendrá el alto nivel de la afinidad de unión por el antígeno. Características deseables en dichas regiones marco del dominio variable son la presencia de aminoácidos clave que mantienen la estructura de los bucles de CDR con el fin de asegurar la afinidad y especificidad del anticuerpo por el antígeno CD3, prefiriéndose el tipo lambda para la cadena ligera.

Los marcos de la región variable humana que son particularmente adecuados para uso junto con las CDR anteriores se han identificado previamente en la patente U.S. N° 5.968.509. Los marcos de la región variable (V) de la cadena pesada son los codificados por el gen VH26.D.J. de VH de tipo III humano, que procede de los hibridomas de células B de la línea 18/2 (Código de Genbank: Humbergath, Dersimonian y col., Journal of Immunology, 139, 2496-2501). Los marcos de regiones variables de cadena ligera son los del gen SUT de tipo VI de VLλ humano (código Swissprot: LV6CSHum, Solomon y col. En Glenner y col. (Eds.), Amyloidosis, Plenum Press N.Y. 1986, pág. 449).

La CDR preferida o las diversas CDR preferidas de la cadena pesada del anticuerpo anti CD3 de rata están, por tanto, preferentemente presentes en un marco de dominio variable humano que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos leyendo en la dirección región líder → región constante, indicando CDR una CDR (a), (b) o (c) según se ha definido anteriormente en el presente documento, una variante modificada de forma conservadora de él o una CDR alternativo:

Glu-Val-Gln-Leu-Leu-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Arg-Leu-Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-/CDR/-Trp-Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Gly-Lys-Gly-Leu-Glu-Trp-Val-Ser-/CDR/-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ser-Lys-Asn-Thr-Leu-Tyr-Leu-Gln-Met-Asn-Ser-Leu-Arg-Ala-Glu-Asp-Thr-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-/CDR/-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser

(SEC ID N° 7/CDR/SEC ID N°8/CDR/SEC ID N° 9/CDR/SEC ID N° 10)

En un anticuerpo aglicosilado que contiene las tres CDR preferidas, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia siguiente:

Glu-Val-Gln-Leu-Leu-Glu-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Arg-Leu-Ser-Cys-Ala-Ala-Ser-Gly-Phe-Thr-Phe-Ser-Ser-Phe-Pro-Met-Ala-Trp-Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Gly-Lys-Gly-Leu-Glu-Trp-Val-Ser-Thr-Ile-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Arg-Thr-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asp-Asn-Ser-Lys-Asn-Thr-Leu-Tyr-Leu-Gln-Met-Asn-Ser-Leu-Arg-Ala-Glu-Asp-Thr-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Phe-Arg-Gln-Tyr-Ser-Gly-Gly-Phe-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser (SEQUENCE ID NO. 11).

Análogamente, la CDR preferida o las diversas CDR preferidas de la cadena ligera del anticuerpo CD3 de rata están, por tanto, preferentemente presentes en un marco de dominio variable humano que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos leyendo en la dirección región líder → región constante, indicando CDR una CDR (d), (e) y (t) según se ha definido anteriormente en el presente documento, una variante modificada de ellos o una CDR alternativa:

Asp-Phe-Met-Leu-Thr-Gln-Pro-His-Ser-Val-Ser-Glu-Ser-Pro-Gly-Lys-Thr-Val-Ile-Ile-Ser-Cys-/CDR/-Trp-Tyr-Gln-Gln-Arg-Pro-Gly-Arg-Ala-Pro-Thr-Thr-Val-Ile-Phe-/CDR/-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Ile-Asp-Arg-Ser-Ser-Asn-Ser-Ala-Ser-Leu-Thr-Ile-Ser-Gly-Leu-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Asp-Tyr-Tyr-Cys-/CDR/-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu

(SEC ID Nº 12/CDR/SEC ID Nº 13/CDR/SEC. ID 14/CDR/SEC ID Nº 15).

- 5 En un anticuerpo aglicosilado que contiene las tres CDR preferidas, la región variable de la cadena ligera comprende la siguiente secuencia

Asp-Phe-Met-Leu-Thr-Gln-Pro-His-Ser-Val-Ser-Glu-Ser-Pro-Gly-Lys-Thr-Val-Ile-Ile-Ser-Cys-Thr-Leu-Ser-Ser-Gly-Asn-Ile-Glu-Asn-Asn-Tyr-Val-His-Trp-Tyr-Gln-Gln-Arg-Pro-Gly-Arg-Ala-Pro-Thr-Thr-Val-Ile-Phe-Asp-Asp-Asp-Lys-Arg-Pro-Asp-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Ile-Asp-Arg-Ser-Ser-Asn-Ser-Ala-Ser-Leu-Thr-Ile-Ser-Gly-Leu-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Asp-Tyr-Tyr-Cys-His-Ser-Tyr-Val-Ser-Ser-Phe-Asn-Val-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Thr-Val-Leu
(SEQUENCE ID NO. 16).

- 10 Los dominios variables que, por ejemplo, comprenden una o más CDR preferidas según se ha descrito antes, o preferentemente en forma humanizada que tienen regiones marco variables humanas derivadas de anticuerpo, están unidos a dominios constantes apropiados.

- 15 Las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera pueden estar basadas en anticuerpos de diferentes tipos sometidos según se desee al anticuerpo que es un anticuerpo de IgG, pero aunque pueden ser originarios o derivados de los de rata o ratón, preferentemente son de origen humano o derivados de los de origen humano. Para la cadena ligera, preferentemente, la región constante es del tipo lambda y para la cadena pesada, preferentemente es un isotipo de IgG, especialmente IgG1, modificado para efectuar la aglicosilación según sea apropiado. Se sabe que todas las regiones constantes humanas del isotipo de IgG están glicosiladas en el resto de asparagina en la posición 297, lo que hace parte del motivo de N-glicosilación Asparagina297-X298-Serina299 o Treonina299, siendo X el resto de cualquier aminoácido excepto prolina. El anticuerpo de la invención puede así estar aglicosilado por reemplazo de Asparagina 297 en tal región constante con otro aminoácido que no puede ser glicosilado. Potencialmente se puede usar cualquier otro aminoácido, pero el más preferido es alanina. Alternativamente, se puede prevenir la glicosilación en Asparagina297 alterando uno de los otros restos del motivo, por ejemplo, reemplazando el resto 298 por prolina, o el resto 299 por cualquier aminoácido que no sea serina o treonina. Las técnicas para realizar esta mutagénesis dirigida al sitio son bien conocidas por los expertos en la técnica y se pueden realizar, por ejemplo, usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio tal como, por ejemplo, el disponible comercialmente de Amersham. El procedimiento se ejemplifica más adelante.

- 30 Es bien conocido en la técnica que la sustitución de un aminoácido en una CDR por otro que tiene similares propiedades, por ejemplo, la sustitución de un resto de ácido glutámico con un resto de ácido aspártico, puede no alterar sustancialmente las propiedades o la estructura del péptido o la proteína en la que se hizo la sustitución o las sustituciones. Así, los anticuerpos aglicosilados para uso en la presente invención incluyen aquellos anticuerpos que contienen los CDR preferidos pero con una secuencia de aminoácidos especificada en la que ha tenido lugar una o varias sustituciones sin alterar sustancialmente la afinidad y especificidad de unión de las CDR. Alternativamente, se pueden hacer supresiones en la secuencia de restos de aminoácidos de las CDR o las secuencias se pueden extender en uno de los términos N o C o en ambos al tiempo que se conserva la actividad.

- 35 Los anticuerpos aglicosilados preferidos de acuerdo con la presente invención son tales que la constante de afinidad por el antígeno es de 10^5 mol^{-1} o más, por ejemplo, de hasta 10^{12} mol^{-1} . Pueden ser adecuados para diferentes usos ligandos de diferentes afinidades de manera que, por ejemplo, en algunos casos puede ser apropiada una afinidad de 10^6 , 10^7 o 10^8 mol^{-1} o más. Sin embargo, frecuentemente serán adecuados anticuerpos con una afinidad en el

intervalo de 10^6 a 10^8 mol⁻¹. Es conveniente que los anticuerpos no presenten una afinidad de unión sustancial por otros antígenos. Las afinidades de unión del anticuerpo y la especificidad del anticuerpo se pueden evaluar por procedimientos de ensayo tales como los descritos en la sección de Ejemplos que figura más adelante (ensayo de eficacia en el redirección de células) o por técnicas tales como ELISA y otros inmunoensayos.

5 Los anticuerpos de acuerdo con la invención son anticuerpos de IgG frente a CD3 aglicosilados que tienen una configuración en forma de "Y" que pueden tener dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas y, por tanto, son bivalentes, teniendo cada sitio de unión a antígeno una afinidad por el antígeno CD3. Alternativamente, la invención es aplicable también a anticuerpos en los que sólo uno de los brazos tiene una afinidad de unión por el antígeno CD3. Tales anticuerpos pueden tener varias formas. Por tanto, el otro brazo puede tener una afinidad de unión por un antígeno que no es CD3, de manera que el anticuerpo sea un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, el descrito en la patente de EE.UU. nº 4.474.893 y las solicitudes de patente europea N° 87907123.1 y 87907124.9. Alternativamente, el anticuerpo puede tener sólo un brazo que presenta afinidad de unión, tal como un anticuerpo que denomina "monovalente".

15 Los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) monovalentes se pueden preparar de varias maneras. Glennie y Stevenson (Nature, 295, 712-713, (1982)) describen un procedimiento para preparar anticuerpos monovalentes por digestión enzimática. Stevenson y col. describen un segundo enfoque para la preparación de anticuerpos monoclonales en el que fragmentos Fab' y Fc producidos enzimáticamente se reticularán químicamente (Anticancer Drug Design, 3, 219, 230 (1989)). En estos procedimientos, los anticuerpos monovalentes resultantes han perdido uno de sus brazos Fab'. Se describe un tercer procedimiento de preparación de anticuerpos monovalentes en la patente europea nº 131424, En este enfoque, se mantiene la forma en "Y" del anticuerpo, pero sólo uno de los dos dominios de Fab' se unirá al antígeno. Esto se consigue introduciendo en el hibridoma un gen que codifica una cadena ligera irrelevante que se combinará con la cadena pesada del anticuerpo para producir una mezcla de productos en la que el anticuerpo monovalente es el de interés.

25 Más preferentemente, sin embargo, los anticuerpos de CD3 aglicosilados monovalentes para uso en la invención se preparan por el procedimiento siguiente. Éste implica la introducción en un sistema de expresión adecuado, por ejemplo, un sistema celular como se describe más adelante, junto con genes que codifican cadenas pesadas y ligeras, de un gen que codifica una cadena pesada truncada en la que no están presentes el dominio de la región variable y el dominio de la primera región constante de la cadena pesada, careciendo el gen de exón para cada uno de estos dominios. Esto da por resultado la producción por el sistema celular de una mezcla de (a) anticuerpos que son anticuerpos completos bivalentes; (b) fragmentos de anticuerpos constituidos por sólo dos cadenas pesadas truncadas (esto es, un fragmento Fc) y (c) fragmentos de anticuerpo que son monovalentes para el antígeno CD3, constituidos por una cadena pesada truncada y una cadena ligera en asociación con la cadena pesada normal. Tal fragmento de anticuerpo (c) es monovalente puesto que tiene sólo un brazo Fab'. Se prefiere la producción de un anticuerpo monovalente en forma de tal fragmento por este procedimiento por una serie de motivos. Así, el fragmento de anticuerpo resultante es fácil de purificar a partir de una mezcla de anticuerpos producida por el sistema celular; por ejemplo, puede separarse simplemente sobre la base de su peso molecular. Esto no es posible en el procedimiento de la patente europea nº 131424 en el que el anticuerpo monovalente producido tiene características similares a las de un anticuerpo bivalente en cuanto a su tamaño y aspecto exterior.

35 Además, la producción de un fragmento de anticuerpo monovalente por el nuevo procedimiento utiliza condiciones que se pueden controlar más fácilmente y, por tanto, no es tan fortuito como un procedimiento de digestión/acoplamiento químico que requiere la separación de un producto de reacción complejo, con la ventaja adicional de que la línea celular usada continuará produciendo fragmentos de anticuerpo monoclonal sin necesidad de procedimientos continuos de síntesis, como se requiere en el procedimiento de digestión con enzimas/acoplamiento químico.

45 Los anticuerpos aglicosilados para uso en el procedimiento de la presente invención pueden, en general, producirse sintéticamente por varios procedimientos. Más convenientemente, sin embargo, se obtienen separadamente construcciones génicas apropiadas para las regiones constante y variable de las cadenas pesadas y ligeras que están presentes en el anticuerpo y luego se insertan en un sistema de expresión adecuado.

50 Se pueden producir genes que codifican los dominios variables de un ligando de la estructura deseada y unidos convenientemente a genes que codifican los dominios constantes de un anticuerpo que ha experimentado mutagénesis dirigida al sitio. Estos genes constantes se puede obtener a partir de cADN de hibridoma o de ADN cromosómico y han experimentado mutagénesis (dirigida al sitio) para producir las regiones constantes aglicosiladas. También se pueden derivar genes que codifican las regiones variables por técnicas de síntesis usadas en la identificación de las CDR contenidas aquí. Las técnicas de clonación adecuadas para ADN pueden ser de varios tipos.

55 La expresión de estos genes mediante cultivo de un sistema de células para producir un ligando de CD3 monofuncional se efectúa muy convenientemente por transformación de un sistema adecuado de células procarióticas o particularmente células eucarióticas, en particular una línea de células de mamífero inmortalizadas, por ejemplo, la célula de mieloma de rata YB2/3.01/Ag2O (denominada en lo sucesivo en el presente documento YO), o células de ovario de hámster chino (aunque también es de interés el uso de células vegetales), con vectores

de expresión que incluyen ADN que codifica varias regiones del anticuerpo, y cultivando luego el sistema de células transformadas para producir el anticuerpo deseado. Tales técnicas generales de uso para la preparación de ligandos de acuerdo con la presente invención son conocidas en la técnica muy considerable de la ingeniería genética y se describen en publicaciones tales como *Molecular Cloning*, por Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 (2ª edición). Las técnicas se ilustran más con los Ejemplos contenidos en el presente documento.

Los anticuerpos para uso de acuerdo con la invención se pueden formular para administración a pacientes administrando el mencionado anticuerpo junto con un diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. Preferentemente, los anticuerpos se administran en forma inyectable junto con tal diluyente o vehículo, que es estéril y está exento de pirógenos. La dosis de anticuerpo a administrar a un paciente dependerá de la afección del paciente y es a discreción del médico que le atiende. Por ejemplo, se pueden usar dosis de aproximadamente 1 a 40 mg al día, preferentemente de 10 a 30 mg al día. La dosis total a lo largo de un período de hasta 10 días estará en el intervalo de aproximadamente 50 a 100 mg, preferentemente será de aproximadamente 60 a 80 mg.

El beneficio terapéutico de la terapia de acuerdo con la invención puede evaluarse mediante la reducción de la inflamación local/sistémica con la reducción concomitante del dolor y la mejora de la capacidad funcional y la calidad de vida. Esto se puede evaluar mediante los criterios de respuesta EULAR o ACR (véase Van Gestel y col., *Arthritis Rheum.*, 1996; 39: 34-40, y Felson y col., *Arthritis Rheum.*, 1995; 38: 727-35).

La invención se ilustra con los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1 Producción de anticuerpo

Se produjo una forma quimérica de anticuerpo CD3 aglicosilado usando un montaje de PCR para unir la región variable de cadena ligera de CD3 de rata a la región constante lambda humana usando cebadores que introducen sitios de enzimas de restricción Hind III y EcoR1 para permitir la clonación en el vector PEE12 de expresión de Celltech (véase Bebington y col., (1992) *Biotechnology* 10, 169). Las secuencias del cebador para poder clonar en PEE12 la forma de CD3 de cadena ligera son las siguientes:

Cebador Hind 111: GAC TAC AAG CTT ACA CAG GAC CTC ACC ATG CGA TGG (SEC ID Nº 17).

Cebador EcoR1: GAT GCT GAA TTC TGC AGC TCT AGT CTC CCG TGG TGG (SEC ID Nº 18).

Se secuenció la construcción final y se clonó en PEE12 que contenía ya la cadena pesada de aglicosilo de CD3 humanizado y ésta se transfectó en la línea celular de mieloma N50 (ECACC nº 851 10503 -Galfre y Milstein (1981), *Enzymology* 73 (B) 3-46) por electroporación. Los clones resultantes se sometieron a detección selectiva respecto a la producción de anticuerpo usando ELISA para IgG1 humano y la cadena ligera lambda humana y sobre FACS para unión a la línea celular Jurkat de clones de células I humanae. El ELISA usa IgFc antihumano de cabra (Sigma 12136) como anticuerpo de captura e IgG antihumano de oveja biotinilado (Amersham RPN 1003) o cadena ligera lambda antihumana de cabra biotinilada (Amersham RPN 1188) como anticuerpo detector (véase Routledge y col., *Eur. J. Immunol* (1991) 21:2717-2725).

Después de una transfección, de 16 clones expresados de 60 µg/ml a 100 µg/ml, los transfectantes se clonaron mediante clonación con dilución límite y algunos de estos mejoraron a 120 µg/ml. Estos permanecieron estables en cultivo a largo plazo y producción de anticuerpo a gran escala sin problemas en el crecimiento de las células.

Ejemplo 2

Se administraron en vehículo acuoso, es decir solución salina normal, a una dosis de 70 mg durante 5 días, a cuatro pacientes, un anticuerpo anti CD3 aglicosilado divalente que tenía cadena pesada humanizada, cadena ligera variable de rata que contenía las CDR que correspondían en cuanto a la secuencia a las del anticuerpo de rata YTH 12.5, y una región constante lambda humanizada como se describe en el Ejemplo 1 de PCT/GB99102380 (véase Ejemplo 1 anterior).

Paciente 1

El paciente era una mujer de 50 años con una historial de 5 años de artritis reumatoide seropositiva. No había manifestaciones extraarticulares adicionales pero tenía el síndrome de Felty. Las terapias previas habían incluido sulfasalazina y ciclosporina A. Cuando se le reclutó para el estudio estaba tomando metotrexato, 20 mg a la semana y prednisona a 20 mg/día. Estaba seriamente incapacitada a causa de su enfermedad y había perdido su empleo como enfermera dental. Era incapaz de vestirse por sí o de lavarse el pelo. Encontraba también que era difícil levantarse de la silla o acostarse o levantarse de la cama. No podía cortar la carne que comía ni abrir un envase de leche. Le era difícil bañarse, como lo era estirarse y flexionarse. Era incapaz de agarrar cosas tales como grifos o jarras y no podía comprar por sí misma.

Se le administró aglicosil anti CD3 durante 5 días. Se le prescribieron 30 mg para el primer día y después 10 mg en los siguientes 4 días. No se le administró premedicación alguna. La primera infusión se complicó con náuseas y

vómitos, y la fiebre alcanzó 40,5 °C y estaba asociada con hipotensión y diarrea. Se administró un agente expansor del plasma. Estos síntomas duraron 36 horas y la segunda infusión se retrasó 24 horas. Con la segunda infusión, sin embargo, se había reducido ya el dolor y la inflamación de las articulaciones afectadas. Las posteriores 4 infusiones se realizaron sin complicaciones.

- 5 Se produjo un brote de la artritis reumatoide el día 43 y se trató con una única dosis de depomedrona intramuscular. Se continuó durante el tratamiento anti CD3 su medicación basal y reumatoide. Se han cumplido 21 meses desde que el paciente recibió terapia. La paciente no ha requerido medicación adicional para su artritis reumatoide y actualmente se siente mucho mejor que al principio. Su enfermedad no está en fase de remisión, pero ahora puede tener una existencia relativamente normal y realiza por sí sola muchas tareas que antes era incapaz. Se ha reducido
10 marcadamente el número de articulaciones dolorosas y sensibles a la palpación. como también su puntuación global. Antes de la terapia, su CRP estaba consistentemente entre 100 y 200 mg/l. Actualmente está entre 40 y 60 mg/l. El recuento de linfocitos está en el intervalo normal.

Paciente 2

- 15 El paciente era un varón de 62 años con una historial de 30 años de artritis reumatoide nodular seropositiva. Entre las terapias previas están incluidos oro intramuscular, penicilamina y metotrexato. Nunca recibió esteroides orales. En el momento que entró en el estudio estaba tomando intramuscularmente 25 mg de metotrexato una vez a la semana y 150 mg de ciclosporina a diario. Estaba menos incapacitado que el paciente 1, pero tenía dificultades con la mayor parte de las tareas diarias. Se le había prescrito un régimen de tratamiento de 10 mg del anticuerpo el día 1 y luego 20 mg los siguientes 4 días. El plan era de infundir lentamente la primera dosis. Se le aconsejó suspender la ciclosporina A pero continuar con metotrexato durante la terapia.
20

- El día 1 se manifestó rigor después de 1 hora y a las 8 horas se manifestó diarrea y vómitos que duraron otras 12 horas y que estaban asociados con una caída menor de la presión sanguínea. Estos síntomas se trataron con hidrocortisona y petidina. El día 2 se manifestó una erupción macular ampliamente extendida que duró varias semanas. El tratamiento completo se administró en el transcurso del tiempo establecido. No hubo efectos adversos los días 2-5.
25

- A diferencia del paciente 1, no había un beneficio agudo del tratamiento y el día 22 empeoró su enfermedad, requiriéndose una dosis intramuscular de metilprednisolona. Sus dolores articulares eran refractarios al tratamiento con esteroides parenterales. El día 42 se empezó con sulfasalazina, Ig bd, y prednisolona 7,5 mg diariamente. Se continuó con metotrexato intramuscular. La terapia con sulfasalazina se interrumpió aproximadamente el día 150 como resultado de dolores de cabeza y recibió una dosis única de 80 mg de triamcinolona por inyección intramuscular. A partir de este momento mejoró su enfermedad sustancialmente. Él describió una caída completa de sus síntomas y capacidad para tener una vida normal sin tener unas articulaciones hinchadas o delicadas. Su CRP antes del tratamiento variaba entre 70 y 90 mg/l. Usualmente a los 18 meses del tratamiento está en el intervalo normal (<10 mg/l) o es marginalmente elevado. El título del factor reumatoide ha caído también de 1:1280 a 1:40. En comparación con antes del anti CD3, ahora está tomando 7,5 mg de prednisolona al día pero actualmente está estrechando la dosis de esta medicación. Además, la prednisolona no era tan efectiva cuando se comenzó el día 42.
30
35

Paciente 3

- El paciente era un caballero anciano refractario a terapias reumatoides estándar que también tenía enfermedad cardíaca isquémica y enfermedad obstructiva de vías respiratorias. Estaba seriamente discapacitado. El plan era como el de un paciente pero con premedicación el día uno con metilprednisolona.
40

La premedicación con metilprednisolona el día 1 no produjo reacción. El día 2, sin premedicación, el paciente tuvo una severa diarrea e insuficiencia respiratoria. La infusión se paró después de haber infundido aproximadamente un cuarto y no se dieron más infusiones. No había evidencia de eficacia a corto plazo ni a largo plazo (hoy, aproximadamente el día 300).

45 Paciente 4

- El paciente era una mujer de 58 años con artritis reumatoide seropositiva con una duración de 30 años. Previamente había sido tratada con penicilamina, sulfasalazina, ciclosporina A, hidroxicloroquina, metotrexato, leflunomida, que fracasaron. Además de la artritis reumatoide, sufría diabetes controlada con dieta y posible angina. La única terapia que estaba tomando para su artritis reumatoide cuando fue admitida era 2,5 mg de prednisolona al día. Estaba significativamente discapacitada por su enfermedad y requería ayuda para vestirse, y también tenía una movilidad limitada. Raras veces salía de casa. Podía subir escaleras y se esforzaba para lavarse y vestirse. La terapia planeada era 10 mg de anticuerpo los días 1-3 y 20 mg los días 4-5. La primera dosis estuvo precedida por 50 mg de una proteína de fusión de IgG1 humano receptor de NF soluble como profilaxis contra la reacción de la primera dosis. Durante la primera infusión, sufrió broncoespasmo con cierto dolor de pecho. Tenía mucha ansiedad y presentaba cianosis periférica. La presión arterial llegó a ser de 225/100 mm de Hg. Esta reacción se trató con salbutamol nebulizado e hidrocortisona intravenosa. Posteriormente tuvo rigor. Su temperatura alcanzó 39°C durante la infusión. Su segunda infusión fue premedicada usando metilprednisolona y no fue complicada, como tampoco la tercera. El día 4 se despertó con dificultad respiratoria y opresión en el pecho, sufriendo seguidamente un ligero fallo
50
55

cardíaco con un ECG hisquémico. El elcocardiógrama posterior reveló una moderada regurgitación mitral con una atrio izquierdo dilatado. También había una suave regurgitación aórtica en un ventrículo izquierdo ligeramente dilatado. El perfil enzimático cardíaco era normal durante los días de las infusiones y no había así evidencia de infarto miocárdico al tiempo de tratamiento anti CD3. A pesar de la mejora clínica en su actividad de RA (posiblemente secundaria a la premedicación con TNFR-Ig), no recibió las infusiones 4 y 5.

A aproximadamente dos semanas, tuvo serios dolores de las articulaciones y el desarrollo posterior fue bastante similar al del paciente 2 a corto plazo. Los síntomas de las articulaciones eran refractarios a esteroides parenterales y finalmente ella comenzó el día 35 con 20 mg de prednisolona al día. Fue vista últimamente el día 90. Actualmente está tomando 10 mg al día de prednisolona. Su CRP estaba entre 100-200 al pretratamiento, inmediatamente después del pretratamiento cayó a 30 mg por litro el día 7 (lo que puede reflejar el concurrente bloqueo de TNF- α). Posteriormente la CRP subió a niveles próximos a la línea de base. Desarrollo una linfocitosis que se evidenció primeramente en torno al día 23 pero que se resolvió posteriormente.

Por tanto, se trató a cuatro pacientes con anti CD3-aglicosilado. Dos de ellos con terapia completa (70 mg de anticuerpo en total) y parece que tienen una buena respuesta a largo plazo. El paciente 3 recibió menos de 13 mg divididos entre dos infusiones y no ha habido obvios efectos beneficiosos. El paciente 4 recibió 25-30 mg en tres dosis. A los tres meses, no hay evidencia de eficacia terapéutica pero se continúa el seguimiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Innovation Limited

20 <120> TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA DE LAS ARTICULACIONES

<130> JIM/G17311WO

25 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 5

30 <212> PRT

<213> rattus

<400> 1

Ser Phe Pro Met Ala
1 5

35

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

40 <213> rattus

<400> 2

Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> rattus

50

ES 2 389 781 T3

<400> 3

Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> rattus

10 <400> 4

Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn Tyr Val His
1 5 10

15 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> rattus

20 <400> 5

Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp
1 5

25 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> rattus

<400> 6

His Ser Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val
1 5

30 <210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> rattus

<400> 7

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

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

40 <210> 8

ES 2 389 781 T3

<211> 14
<212> PRT
<213> rattus

5 <400> 8

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

<210> 9
10 <211> 32
<212> PRT
<213> rattus

<400> 9
15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 10
20 <211> 11
<212> PRT
<213> rattus

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
25

<210> 11
30 <211> 119
<212> PRT
<213> rattus

<400> 11

ES 2 389 781 T3

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 22

5 <212> PRT

<213> rattus

<400> 12

Asp Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Ile Ile Ser Cys
20

10

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

15 <213> rattus

<400> 13

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Arg Ala Pro Thr Thr Val Ile Phe
1 5 10 15

20

<210> 14

<211> 34

<212> PRT

<213> rattus

<400> 14

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser
 1 5 10 15

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

Tyr Cys

5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> rattus

10

<400> 15

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

15

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> rattus

20

<400> 16

Asp Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Ile Ile Ser Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Arg Ala Pro Thr Thr Val
 35 40 45

Ile Phe Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 17

ES 2 389 781 T3

<211> 36
<212> ADN
<213> rattus

5 <400> 17

gactacaagc ttacacagga cctcaccatg cgatgg
36

<210> 18
10 <211> 36
<212> ADN
<213> rattus

<400> 18

15

gatgctgaat tctgcagetc tagtctcccg tggatgg
36

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD3 aglicosilado para su uso en el tratamiento de la inflamación crónica de articulaciones.
- 5 2. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento implica la administración del anticuerpo en un periodo de hasta 2 semanas sin la posterior readministración tras este periodo durante el menos 6 meses.
3. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tratamiento implica la administración del anticuerpo en un periodo de 1 a 5 días.
4. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el tratamiento de la sinovitis inflamatoria crónica.
- 10 5. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el tratamiento de la artritis reumatoide.
6. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el tratamiento tiene como resultado una reducción de la inflamación local y sistémica.
- 15 7. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el tratamiento **se caracteriza porque** la inflamación local y sistémica es sustancialmente invertida.
8. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento implica la administración del anticuerpo según una dosis total de 50 a 100 mg.
9. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento implica la administración del anticuerpo junto con un agente terapéutico adicional para el tratamiento de la inflamación crónica de las articulaciones.
- 20 10. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el tratamiento implica la administración del anticuerpo con un esteroide o un anticuerpo TNF.
11. Un anticuerpo anti CD3 para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo está en forma de una composición farmacéutica que también comprende un diluyente o 25 vehículo fisiológicamente aceptable.