

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 674**

51 Int. Cl.:

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04810895 .5**

96 Fecha de presentación: **12.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1687066**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **Métodos para modular la inmunidad**

30 Prioridad:

**14.11.2003 US 520148 P**

**03.05.2004 US 567741 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**27.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**27.12.2012**

73 Titular/es:

**BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.**

**(100.0%)**

**75 Francis Street**

**Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**WEINER, HOWARD y**

**SAYEGH, MOHAMED H.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 393 674 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**

Métodos para modular la inmunidad.

**Reivindicación de prioridad**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 USC § 119(c) de las solicitudes provisionales de patente de EEUU n<sup>os</sup> 60/520.148, solicitada el 14 de noviembre de 2003, y 60/567.741, solicitada el 3 de mayo de 2004.

**Desarrollo o investigación patrocinada federalmente**

Esta invención se realizó con el patrocinio del Gobierno bajo las becas N<sup>os</sup> NS-38037-01 y AI-435801, concedidas por el Instituto Nacional de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

**Campo técnico**

10 En la presente invención se describen anticuerpos anti-CD3 útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y para la prevención del rechazo de aloinjertos, particularmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias a través de la administración oral o mucosa de anticuerpos, que conduce a la estimulación del sistema inmunitario de la mucosa, p.ej. los anticuerpos anti-CD3.

**Antecedentes de la invención**

15 Se ha demostrado que las estrategias de inmunoterapia que implican señalización inducida por anticuerpos a través de receptores específicos de células T (TCR) mejoran las enfermedades autoinmunitarias, probablemente regulando la respuesta inmunitaria a los autoantígenos. En particular, la terapia de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD3 administrados parenteralmente, ha demostrado ser eficaz en la prevención e inversión de la aparición de la diabetes en ratones NOD (Chatenoud et al., J. Immunol. 158:2947-2954 (1997 ); Belghith et al., Nat. Med. 9:1202-1208 (2003 ))); para tratar sujetos con diabetes de tipo I (Herold et al., N. Engl. J. Med. 346(22)1692-1698 (2002 ), y para revertir la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratas de Lewis con un efecto supresor preferencial sobre células T-colaboradoras de tipo I (Th1), que participan en la inmunidad mediada por células (Tran et al., Intl. Immunol. 13(9):1109-1120 (2001 )). La FDA ha aprobado la Ortoclona OKT@3 (muromonab-cd3; Ortho Biotech Products, Bridgewater, NJ), un anticuerpo anti-CD3 murino, para inyección intravenosa para el tratamiento del rechazo de injertos tras el trasplante (Chatenoud, Nat. Rev. Immunol. 3:123-132 (2003)).

**Sumario**

La presente descripción se basa en parte en el descubrimiento de que la administración oral del anticuerpo monoclonal anti-CD3 es eficaz para tratar y prevenir la enfermedad autoinmunitaria. Según se describe aquí, la administración oral de anticuerpo anti-CD3 suprime la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE, en un modelo animal de esclerosis múltiple (MS), retrasa el rechazo de aloinjertos de forma dependiente de la dosis, reduce la gravedad de la artritis y evita la aparición de diabetes en los ratones NOD. Por tanto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD3 capaz de incrementar las concentraciones de células secretoras de IL-10 y/o TGF-beta en aproximadamente 20% o más, o capaz de incrementar la producción de IL-10 y/o TGF-beta por células T en la sangre periférica, en la fabricación de un medicamento oral para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis reumatoide y rechazo de aloinjertos, para la fabricación de un tratamiento nasal para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la esclerosis múltiple.

En otro aspecto de la invención, la enfermedad autoinmunitaria es el rechazo de aloinjerto en un sujeto. El uso incluye la administración al sujeto de un anticuerpo anti-CD3, en el que la administración es oral. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3, se administra al sujeto antes, durante y/o después de trasplantar una célula, tejido u órgano al sujeto. En algunas realizaciones, el trasplante comprende la totalidad o parte de un islote pancreático, hígado, riñón, corazón, pulmón, piel, músculo, tejido neuronal, estómago e intestinos.

Así mismo, se describen composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o mucosa, incluyendo un anticuerpo anti-CD3. Por ejemplo, la composición farmacéutica es adecuada para administración pulmonar, bucal, nasal, intranasal, sublingual, rectal o vaginal. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD3 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano y un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, la composición adecuada para administración oral está en una forma seleccionada de una forma de dosificación oral líquida y una forma de dosificación oral sólida, seleccionada p.ej. del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, polvos, glóbulos, gránulos, polvos en saquitos, comprimidos recubiertos entéricamente, glóbulos recubiertos entéricamente, polvos encapsulados, glóbulos encapsulados, gránulos encapsulados y cápsulas de gelatina blanda recubiertas entéricamente. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral es una formulación oral de liberación controlada.

En otro ejemplo, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente excipientes y/o vehículos. En algunos ejemplos, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente ingredientes activos adicionales.

Así mismo, se describen usos en los que un anticuerpo anti-CD3 está destinado a ser administrado a un sujeto. Los usos pueden incluir administrar al sujeto una forma de dosificación oral adecuada para suministrar una dosis de un anticuerpo anti-CD3 a través del tracto gastrointestinal, la cual, al administrarla oralmente, conduce a la estimulación del sistema inmunitario de la mucosa. Por ejemplo, los usos incluyen la administración al sujeto de una forma de dosificación mucosa adecuada para suministrar una dosis de un anticuerpo anti-CD3 a través de una membrana mucosa, de forma que dicha dosis, al administrarla a la mucosa, conduce a la estimulación del sistema inmunitario de la mucosa.

Así mismo, se describen usos en los que un anticuerpo anti-CD3 está destinado a ser administrado a un sujeto. Los usos incluyen la administración al sujeto de una forma de dosificación oral adecuada de un anticuerpo anti-CD3 a través del tracto gastrointestinal, la cual, al administrarla oralmente, conduce a la reducción de las células CD3+ en el suero a menos de aproximadamente 25 células/mm<sup>3</sup>. Alternativamente, los usos pueden incluir la administración al sujeto de una forma de dosificación oral adecuada de un anticuerpo anti-CD3 a través de una membrana mucosa, el cual, al administrarse por vía mucosa, conduce a la reducción de las células CD3+ en el suero a menos de aproximadamente 25 células/mm.

La invención proporciona varias ventajas. Primero, la administración oral o mucosa es más sencilla y se prefiere generalmente frente a la administración parenteral (p.ej., intravenosa o mediante inyección) por la mayoría de los sujetos, debido a la ausencia de agujas. Segundo, la administración oral o mucosa facilita la administración crónica del anticuerpo. Tercero, la administración oral o mucosa puede evitar o reducir los efectos secundarios negativos asociados con la administración parenteral, incluyendo el dolor en el sitio de la inyección. Otras ventajas incluyen los costes reducidos, ya que para la administración oral o mucosa no se requiere personal altamente entrenado, y existen menos problemas de seguridad. En algunas circunstancias, los anticuerpos anti-CD3 administrados por vía oral o mucosa inducen tolerancia a una dosis inferior que los anticuerpos anti-CD3 administrados por vía parenteral. Adicionalmente, los anticuerpos orales o mucosos pueden ser efectivos cuando se administran antes del desarrollo de la enfermedad y cuando se suministran en el estado máximo de la enfermedad, mientras que los anticuerpos administrados parenteralmente se cree normalmente que sólo son efectivos tras la aparición de la enfermedad (Chatenoud et al., *J. Immunol.* 158: 2947-2954 (1997) ; Tran et al., *Int. Immunol.* 13: 1109-1120 (2001) ). El sistema inmunitario del intestino y la mucosa es un medio único que induce preferentemente tolerancia y células T reguladoras ( Faria and Weiner, *Adv. Immunol.* 73:153-264 (1999) ). Finalmente, la tolerancia oral o mucosa es tolerancia sistémica; por ejemplo, aunque la inducción de tolerancia oral se produzca en el intestino, se origina también tolerancia periférica (Faria and Weiner, *Adv. Immunol.* 73:153-264 (1999) ; Mowat, *Nat. Rev. Immunol.* 3(4):331-41 (2003)).

En algunas realizaciones, en lugar de o además de la administración de un anticuerpo anti-CD3, los usos incluyen la administración de uno o más entre a) anticuerpos frente a moléculas co-estimuladoras que se sabe que están implicadas en la regulación inmunitaria, como CD2, ICOS, CD28, CTLA-4 y PD-1 o sus ligandos; b) anticuerpos frente a moléculas asociadas con células NK-T, como CD94, NK G2; c) anticuerpos frente a moléculas MHC o sus estructuras de reconocimiento como CD4 y CD8; d) moléculas de diferenciación de células T como moléculas TIM; y/o e) cualquier anticuerpo o combinación de los mismos que activa o promueva la tolerancia.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el que se entiende normalmente por un técnico medio en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos en la práctica o ensayos de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

#### 45 Descripción de los dibujos

FIG. 1 es un gráfico de líneas que ilustra el curso de EAE en ratones SJL inmunizados con péptido PLP (139-151) y alimentados con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3.

FIG. 2 es un gráfico de líneas que ilustra la proliferación de células del bazo aisladas de ratones SJL alimentados con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3 e inmunizados con péptido PLP (139-151), en respuesta a estimulación con el péptido PLP.

FIG. 3 es un gráfico de barras que ilustra la proliferación de células del bazo aisladas de ratones SJL alimentados con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3 e inmunizados con péptido PLP (139-151), en respuesta a estimulación con el péptido PLP.

FIG. 4 es un gráfico de barras que ilustra la proporción de células T CD4+/CD25+ en nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) aislados de ratones SJL alimentados con 5 µg de anticuerpo anti-CD3, o de un control de isotipo apareado.

FIGS. 5A y 5B son gráficos de barras que ilustran la proliferación de células T en el bazo (5A) y MLN (5B), aisladas de ratones SJL alimentados con 5 µg de anticuerpo anti-CD3 o de un control de isotipo apareado.

- FIG. 6 es un gráfico de líneas que ilustra el curso de EAE en ratones NOD inmunizados con péptido PLP (48-70), alimentados con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3.
- 5 FIG. 7 es un gráfico de líneas que ilustra la proliferación de células del bazo aisladas de ratones NOD alimentados con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 o con 5 µg de un control de isotipo apareado, e inmunizados con péptido PLP (48-70), en respuesta a estimulación con el péptido PLP *in vitro*.
- FIG. 8 es un gráfico de barras que ilustra la proliferación de células del bazo aisladas de ratones NOD alimentados con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 o con 5 µg de un control de isotipo apareado, e inmunizados con péptido PLP (48-70), en respuesta a estimulación con anticuerpo anti-CD3.
- 10 FIG. 9 es un gráfico de barras que ilustra la producción de IL-10 en células del bazo aisladas de ratones NOD alimentados con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 o con 5 µg de un control de isotipo apareado, e inmunizados con péptido PLP (48-70), en respuesta a estimulación con anticuerpo anti-CD3.
- FIGS. 10A y 10B son gráficos de barras que ilustran las concentraciones de IL-10 (10A) y TGF-β (10B) secretadas por células del bazo aisladas de ratones transgénicos (Tg) OVA alimentados con 50, 200 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3, en respuesta a estimulación *in vitro* con OVA.
- 15 FIG. 11 es un gráfico de líneas que ilustra la proliferación de células del bazo aisladas de ratones Tg OVA alimentados con 50, 200 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3, en respuesta a estimulación con OVA.
- FIG 12 es un gráfico de líneas que ilustra el curso de EAE en ratones NOD inmunizados con MOG, alimentados con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3.
- 20 FIG. 13A es un gráfico de barras que ilustra la proliferación de células del bazo estimuladas *in vitro* con 2 µg/ml de anti-CD3.
- FIG. 13B es un gráfico de barras que ilustra la proliferación de células PLN estimuladas con 100 µg/ml de PLP.
- FIG 14 es un gráfico de barras que ilustra la secreción de IL-10 a partir de células PLN, tras estimulación con anticuerpo anti-CD3.
- 25 FIG. 15A y 15B son gráficos de barras que ilustran la secreción de IL-2 (15A) e IL-10 (15B) a partir de células del bazo aisladas de ratones alimentados con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3.
- FIGS 16A y 16B son gráficos de líneas que ilustran el efecto de la inyección con células aisladas del bazo (16A) o MLN (16B) de ratones alimentados con anticuerpo anti-CD3, en el curso clínico de EAE.
- 30 FIGS. 17A, 17B y 17C son gráficos de líneas que ilustran el efecto de la administración oral de 0,5 µg (17A), 5 µg (17B) o 50 µg (17C) de anticuerpo anti-CD3 en el curso clínico de EAE, antes de la inducción de EAE o en el máximo de la enfermedad.
- FIG. 18 es un gráfico de líneas que ilustra el efecto de la administración oral de 0,5 µg (triángulos) o 5 µg (círculos) de anticuerpo anti-CD3 a ratones NOD recién nacidos sobre el desarrollo posterior de diabetes, comparado con el tratamiento con insulina (cuadrados) o 0,5 µg de un control de isotipo apareado (diamantes).
- 35 FIG. 19 es un gráfico de líneas que ilustra el efecto de la administración oral y nasal de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, en el curso clínico de EAE durante aproximadamente 44 días.
- FIG. 20 es un gráfico de líneas que ilustra el efecto de PBS (cuadrados rellenos), control de isotipo (diamantes rellenos), o anticuerpos anti-CD3 (triángulos rellenos), sobre la incidencia de diabetes en ratones tratados con estreptococina durante un periodo de 30 días.
- 40 FIG. 21 es un gráfico que muestra las concentraciones medias de glucosa sanguínea en el día 14, en los animales en los cuatro grupos mostrados en la FIG. 20.
- FIG. 22A es un gráfico de líneas que muestra el Índice Artrítico Máximo (MAI) en ratones control (cuadrados rellenos), ratones tratados con F(ab')<sub>2</sub> de control de isotipo (diamantes sin rellenar), y ratones tratados con F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 (círculos sin relleno).
- 45 FIG. 22B es un gráfico de líneas que muestra el índice Artrítico Máximo (MAI) en ratones tratados con colágeno nasal (diamantes rellenos), y ratones tratados con F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 nasal (diamantes sin relleno).
- FIG 22C es un gráfico de líneas que muestra el índice Artrítico Máximo (MAI) en ratones tratados con F(ab')<sub>2</sub> de control de isotipo (cuadrados rellenos), y ratones tratados con F(ab')<sub>2</sub> de IgG anti-CD3 oral (círculos sin relleno).
- FIG. 23A es un gráfico de barras que muestra la secreción de IL-2 en células T de péptido asociado con latencia (LAP) + y LAP-, en ratones alimentados con anti-CD3 (barras gris oscuro) o control de isotipo (barras gris claro).

FIG. 23B es un gráfico de líneas que muestra la secreción de IL-4 en células T de péptido asociado con latencia (LAP) + y LAP-, en ratones alimentados con anti-CD3 (barras gris oscuro) o control de isotipo (barras gris claro).

5 FIG. 23C es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN-gamma en células T de péptido asociado con latencia (LAP) + y LAP-, en ratones alimentados con anti-CD3 (barras gris oscuro) o control de isotipo (barras gris claro).

FIG. 23D es un gráfico de barras que muestra la secreción de IL-10 en células T de péptido asociado con latencia (LAP) + y LAP-, en ratones alimentados con anti-CD3 (barras gris oscuro) o control de isotipo (barras gris claro).

10 FIG. 24 es un gráfico de líneas que muestra las concentraciones de células T LAP+ en ratones alimentados con anticuerpo de control de isotipo (triángulos) o anticuerpo anti-CD3 (círculos), a diferentes proporciones de modulador frente a células LAP+.

FIG. 25 es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre la actividad supresora de células T LAP+ co-cultivadas con células LAP CD4+CD25 de ratones naive con o sin 10 mg/ml de LAP recombinante (rLAP).

15 FIG. 26 es un gráfico de líneas que muestra el efecto sobre los resultados clínicos promedio de EAE, del trasplante de células T, incluyendo células LAP+ de ratones alimentados con control de isotipo (cuadrados rellenos) o ratones alimentados con anti-CD3 (triángulos rellenos), frente a células T empobrecidas en LAP procedentes de ratones alimentados con control de isotipo (cuadrados sin rellenar) o ratones alimentados con anti-CD3 (triángulos sin rellenar).

20 FIG. 27 es un gráfico de líneas que muestra el efecto de la neutralización de TGFβ sobre la puntuación clínica media de EAE. A los ratones se les alimentó con control de isotipo y se les inyectó Ab anti-TGFβ (cuadrados rellenos), se les alimentó con anti-CD3 y se les inyectó Ab anti-TGFβ (triángulos sin rellenar), se les alimentó con Ab control de isotipo y se les inyectó Ab control de isotipo (cuadrados sin rellenar), o se les alimentó con anti-CD3 y se les inyectó Ab anti-control de isotipo (triángulos rellenos).

### Descripción detallada

25 Se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD3 son efectivos para tratar diversos trastornos autoinmunitarios, tanto en modelos animales como humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD3 revierten las reacciones de rechazo de injertos, probablemente bloqueando la función de las células T, que juegan un papel principal en el rechazo agudo de aloinjertos. Previamente, se había administrado terapia de anticuerpos anti-CD3 parenteralmente (es decir, administrada intravenosamente o mediante inyección), basada en la creencia general de que los anticuerpos se degradarán, descompondrán o desactivarán en el tracto intestinal y, por tanto, se tornarán inútiles si se administran oralmente.

30 La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD3 capaz de incrementar las concentraciones de células que secretan IL-10 y/o TGF-beta en aproximadamente 20% o más, o capaces de incrementar la producción de IL-10 y/o TGF-beta por las células T en la sangre periférica, en la fabricación de un medicamento oral para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, artritis reumatoide y rechazo de aloinjertos, o para la fabricación de un tratamiento nasal para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la esclerosis múltiple.

35 La utilidad de una formulación oral requiere que el principio activo sea biodisponible. La biodisponibilidad de los fármacos administrados oralmente puede estar afectada por diversos factores, como la absorción del fármaco a través del tracto gastrointestinal, la estabilidad del fármaco en el tracto gastrointestinal, y el efecto del primer pase. Por tanto, el suministro oral efectivo de una sustancia activa requiere que el principio activo tenga suficiente estabilidad en el estómago y el lumen intestinal para pasar a través de la pared intestinal. Muchos fármacos, sin embargo, tienden a degradarse rápidamente en el tracto intestinal o tienen escasa absorción en el tracto intestinal, de forma que la administración oral no es un método efectivo para la administración del fármaco. Sorprendentemente, no sólo los anticuerpos anti-CD3 se pueden administrar oralmente, sino que parece que la administración oral es, en algunos aspectos, superior a la administración parenteral.

40 En el sistema inmunitario, se pueden distinguir una serie de compartimentos anatómicamente distintos, cada uno especialmente adaptado para responder a los patógenos presentes en un conjunto particular de tejidos corporales. Un compartimento, el compartimento periférico, comprende los nódulos linfáticos periféricos y el bazo; este compartimento responde a antígenos que entran en el tejido o se diseminan hacia la sangre. Un segundo compartimento, el sistema inmunitario mucoso, se localiza cerca de las superficies mucosas a las que invaden la mayoría de los patógenos. El sistema inmunitario mucoso ha desarrollado mecanismos de tolerancia específicos para antígenos para evitar una respuesta inmunitaria deletérea frente a antígenos alimentarios y microorganismos comensales beneficiosos, que viven en simbiosis con su hospedador, manteniendo sin embargo la detección y destrucción de organismos patógenos que entran a través del intestino. Hablando en general, el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) es diferente del tejido linfoide de otras zonas; la estimulación del GALT induce preferentemente las células reguladoras. Las células del tejido linfoide del intestino secretan principalmente TGF-β e IL-10, y la oportunidad y frecuencia de estimular células reguladoras es mayor en el intestino.

Las respuestas inmunitarias inducidas en un compartimento están en su mayoría confinadas a ese compartimento particular. Los linfocitos están restringidos a compartimentos particulares por su expresión de receptores mensajeros que son fijados por ligandos, conocidos como adresasinas, que se expresan específicamente en los tejidos del compartimento. Es interesante que la tolerancia inducida en el compartimento mucoso también afecta al  
 5 compartimento periférico. Por ejemplo, a la alimentación de ovoalbúmina (un antígeno parenteral fuerte) le sigue un período prolongado durante el que la administración de ovoalbúmina mediante inyección, incluso en presencia de un adyuvante, no provoca ninguna respuesta de anticuerpos ni en el compartimento periférico ni en el compartimento mucoso. Como contraste, la tolerancia oral es una tolerancia sistémica; aunque la inducción de tolerancia oral se produzca en el intestino, también se produce tolerancia periférica.

10 Como teoría, los anticuerpos anti-CE3 administrados oralmente estimulan el sistema inmunitario de la mucosa. Según se indicó anteriormente, el intestino es un medio único en el cual se induce la tolerancia. En comparación con los anticuerpos administrados parenteralmente, se necesitan cantidades más pequeñas de anticuerpos anti-CD3 orales para inducir tolerancia, y los anticuerpos orales pueden ser efectivos cuando se administran antes del desarrollo de la enfermedad y cuando se administran en el máximo de la enfermedad, mientras que los anticuerpo  
 15 administrados parenteralmente sólo son útiles tras la aparición de la enfermedad.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral son formas de dosificación típicamente sólidas (p.ej., comprimidos), o preparaciones líquidas (p.ej., soluciones, suspensiones o elixires). Las formas de dosificación sólidas son deseables para la facilidad de determinación y administración de la dosis del ingrediente activo y para la  
 20 facilidad de administración, particularmente la administración por el sujeto en su casa. Las formas de dosificación líquidas también permiten a los sujetos tomar fácilmente la dosis requerida de ingrediente activo; las preparaciones líquidas se pueden preparar en forma de bebida, o administrarse, por ejemplo, mediante un tubo nasogástrico.

Las composiciones farmacéuticas orales líquidas requieren generalmente un sistema disolvente o vehículo adecuado en el que disolver o dispersar el principio activo, permitiendo así la administración de la composición al  
 25 sujeto. Un sistema disolvente adecuado es compatible con el principio activo y no tóxico para el sujeto. Típicamente, las formulaciones orales líquidas usan un disolvente acuoso.

Las composiciones orales se pueden formular también opcionalmente para reducir o evitar la degradación, descomposición, o desactivación del principio activo por el sistema gastrointestinal, p.ej., mediante el fluido gástrico estomacal. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular opcionalmente para pasar a través del estómago  
 inalteradas y disolverse en el intestino, es decir, composiciones con recubrimiento entérico.

30 Un experto medio en la materia apreciaría fácilmente que las composiciones farmacéuticas aquí descritas se pueden preparar aplicando procedimientos de fabricación farmacéutica conocidos. Tales formulaciones se pueden administrar al sujeto con métodos bien conocidos en el estado de la técnica farmacéutica. Así, la puesta en práctica de los presentes métodos empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de las ciencias farmacéuticas, incluyendo diseño de formas de dosificación farmacéutica, desarrollo de fármacos y farmacología, así  
 35 como química orgánica, incluyendo química de polímeros. Consecuentemente, estas técnicas se incluyen dentro de las capacidades de un técnico medio en la materia y están explicadas en su totalidad en la literatura (véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition. Alfonso R. Gennaro (Ed.): Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1995 ), a partir de aquí Remington.

#### Anticuerpos anti-CD3

40 Los anticuerpos anti-CD3 pueden ser cualquier anticuerpo específico para CD3. El término "anticuerpo", según se usa aquí, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una de sus porciones inmunológicamente activas, es decir, una porción que se una al antígeno. Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, que conservan la capacidad de unirse a CD3. Tales fragmentos se pueden obtener comercialmente, o usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden  
 45 generar fragmentos F(ab)<sub>2</sub> tratando el anticuerpo con una enzima, como pepsina, una endopeptidasa no específica que normalmente produce un fragmento F(ab)<sub>2</sub> y numerosos péptidos pequeños de la porción Fc. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante está compuesto por dos unidades Fab conectadas por un puente disulfuro. El fragmento Fc se degrada extensivamente y se puede separar de F(ab)<sub>2</sub> por diálisis, filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico. Los fragmentos F(ab) se pueden generar usando papaína, una tiol-endopeptidasa no específica que digiere  
 50 las moléculas de inmunoglobulina, en presencia de un agente reductor, en tres fragmentos de tamaño similar: dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. Cuando los fragmentos Fc son de interés, la papaína es la enzima apropiada porque produce un fragmento Fc de 50,00 Dalton; para aislar los fragmentos F(ab), los fragmentos Fc se pueden eliminar, p.ej. mediante purificación de afinidad, usando la proteína A/G. Se encuentran disponibles en el comercio diversos kits para producir fragmentos F(ab), incluyendo el ImmunoPure IgG1 Fab and F(ab')<sub>2</sub> Preparation Kit  
 55 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Además, se pueden usar servicios disponibles comercialmente para generar fragmentos que se unen a anticuerpos, p.ej., Bio Express, West Lebanon, NH.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, recombinante, p.ej., un anticuerpo quimérico, desimmunizado o humanizado, totalmente humano, no humano, p.ej., murino o monocatenario. En algunas realizaciones el anticuerpo tiene una función efectora y puede fijar el complemento. En algunas realizaciones el

anticuerpo tiene capacidad reducida o nula de unirse a un receptor Fc. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD3 puede ser un isotipo o subtipo, fragmento u otro mutante, que no soporta la unión a un receptor Fc. P.ej., tiene una región de unión al receptor Fc mutagenizada o eliminada. El anticuerpo puede estar acoplado a una toxina o una sustancia formadora de imágenes.

5 Se conocen diversos anticuerpos anti-CD3, incluyendo pero no limitados a OKT3 ((muromonab/Orthoclone OKT3(TM), Ortho Biotech, Raritan, NJ; N° de patente de EE.UU. 4,351,549 ); hOKT3 $\gamma$  ( Herold et al., N.E.J.M. 346(22):1692-1698 (2002 ); HuM291 (Nuvion(TM), Protein Design Labs, Fremont, CA); gOKT3-5 ( Alegre et al., J. Immunol. 148(11):3461-8 (1992 ); IF4 ( Tanaka et al., J. Immunol. 142:2791-2795 (1989 )); G4.18 ( Nicolls et al., Transplantation 55:459-468 (1993 )); 145-2C11 ( Davignon et al., J. Immunol. 141(6):1848-54 (1988 )); y según se describe en Frenken et al., Transplantation 51(4):881-7 (1991 ); N°s de patente de EE.UU. 6,491,9116 , 6,406,696 , y 6,143,297 ).

Se conocen también métodos para producir dichos anticuerpos. Se puede usar una proteína CD3 completa o un fragmento peptídico antigénico de CD3 como inmunógeno, o para identificar anticuerpos anti-CD3 obtenidos con otros inmunógenos, p.ej., células, preparaciones de membrana y similares, p.ej., células T periféricas humanas normales purificadas, positivas para E roseta, según se describen en la patente de EE.UU. N° 4.361.549 y 4.654.210. El anticuerpo anti-CD3 puede unirse a un epítipo o a cualquier dominio o región en CD3.

Son deseables anticuerpos quiméricos, humanizados, desinmunizados o completamente humanos para aplicaciones que incluyen la administración repetida, p.ej., tratamiento terapéutico de sujetos humanos.

Los anticuerpos quiméricos contienen porciones de dos anticuerpos diferentes, típicamente de dos especies diferentes. Generalmente, tales anticuerpos contienen regiones constantes humanas y regiones variables de otras especies, p.ej., regiones variables murinas. Por ejemplo se han descrito anticuerpos quiméricos ratón/humano que presentan características de unión del anticuerpo de ratón parental y funciones efectoras asociadas con la región constante humana. Véase, p.ej., Cabilly et al., U.S. Pat. No. 4,816,567 ; Shoemaker et al., U.S. Pat. No. 4,978,745 ; Beavers et al., U.S. Pat. No. 4,975,369 ; and Boss et al., patente de EE.UU. N° 4,816,397, todas las cuales se incorporan aquí mediante referencia. Generalmente, estos anticuerpos quiméricos se construyen preparando una biblioteca génica genómica de ADN extraído de hibridomas murinos preexistentes ( Nishimura et al., Cancer Research, 47:999 (1987 )). La biblioteca se escruta luego para genes de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras que presenten los patrones correctos de reordenación de fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, se preparan bibliotecas de ADNc de ARN extraídos de los hibridomas y escrutados, o las regiones variables se obtienen mediante reacción en cadena de la polimerasa. Los genes de la región variable clonados se ligan a continuación en un vector de expresión que contiene las casetes clonadas del gen de la región contante humana de cadena pesada o ligera apropiada. Los genes quiméricos se pueden expresar a continuación en una línea celular a elección, p.ej., una línea de mieloma murino. Tales anticuerpos quiméricos se han usado en terapia humana.

Los anticuerpos humanizados se conocen en la técnica. Típicamente, la "humanización" produce un anticuerpo que es menos inmunogénico, que conserva completamente las propiedades de unión a antígeno de la molécula original. A fin de conservar todas las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo original, la estructura de su sitio de combinación se tiene que reproducir de forma fidedigna en la versión "humanizada". Esto se puede lograr potencialmente trasplantando el sitio de combinación del anticuerpo no humano sobre una estructura humana, bien (a) injertando los dominios variables no humanos completos sobre regiones constantes humanas para generar un anticuerpo quimérico (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81:6801 (1984 ); Morrison and Oi, Adv. Immunol. 44:65 (1988) (que conserva las propiedades de unión a ligando, pero que también conserva la inmunogenicidad de los dominios variables no humanos); (b) injertando sólo los CDRs no humanos sobre la estructura humana y las regiones constantes con o sin conservación de los residuos estructurales críticos (Jones et al. Nature, 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1539 (1988 )); o (c) trasplantando los dominios variables no humanos completos (para conservar las propiedades de unión a ligando) pero también "envolviéndolos" con una superficie de tipo humano a través del reemplazo sensato de los residuos expuestos (para reducir la antigenicidad) (Padlan, Molec. Immunol. 28:489 (1991)).

La humanización mediante injerto de CDR implica típicamente trasplantar sólo los CDRs sobre un fragmento humano sobre una estructura y regiones constantes humanas. Teóricamente, esto debería eliminar sustancialmente la inmunogenicidad (excepto si existen diferencias alotípicas o idiotípicas). Sin embargo, se ha descrito que es necesario que algunos residuos estructurales del anticuerpo original también se conserven (Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10,029 (1989 )). Los residuos estructurales que se necesita que se conserven se pueden identificar mediante modelado por ordenador. Alternativamente, los residuos estructurales críticos se pueden identificar potencialmente comparando estructuras del sitio de combinación del anticuerpo conocidas (Padlan, Molec. Immun. 31(3):169-217 (1994)). La invención también incluye anticuerpos parcialmente humanizados, en los que los 6 CDRs de las cadenas pesada y ligera y un número limitado de aminoácidos estructurales del anticuerpo monoclonal murino se injertan mediante tecnología recombinante sobre el esqueleto de la igG humana empobrecida en CDR (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)).

Los anticuerpos desinmunizados se obtienen reemplazando epítopos inmunogénicos en los dominios variables murinos con secuencias de aminoácidos benignas, produciendo un dominio variable desinmunizado. Los dominios

variables desinmunizados se conectan genéticamente a los dominios constantes de la IgG humana, produciendo un anticuerpo desinmunizado (Biovation, Aberdeen, Scotland).

5 El anticuerpo anti-CD3 también puede ser un anticuerpo monocatenario. Se puede obtener mediante ingeniería genética un anticuerpo monocatenario (scFV) (véase, por ejemplo, Colcher et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 880:263-80 (1999); y Reiter, Clin. Cancer Res. 2:245-52 (1996)). El anticuerpo monocatenario se puede dimerizar o multimerizar para generar anticuerpos multivalentes con especificidades para diferentes epítopos de la misma proteína diana CD3. En algunas realizaciones, el anticuerpo es monovalente, p.ej., según se describe en Abbs et al., Ther. Immunol. 1(6):325-31 (1994), incorporado aquí por referencia.

#### Composiciones farmacéuticas

10 Los anticuerpos anti-CD3 aquí descritos se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración oral o mucosa, p.ej., mediante ingestión, inhalación o absorción, p.ej., por administración vía nasal, intranasal, pulmonar, bucal, sublingual, rectal o vaginal. Tales composiciones incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo (p.ej., un anticuerpo anti-CD3) se puede incorporar con excipientes y usarse en forma sólida o líquida (incluyendo gel). Se pueden preparar también composiciones orales anti-CD3 usando un excipiente. Se pueden incluir sustancias aglutinantes compatibles farmacéuticamente y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Se proporcionan formas de dosificación oral que comprenden anticuerpo anti-CD3, en las que las formas de dosificación, al administrarse oralmente, proporcionan una concentración sanguínea terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-CD3 a un sujeto. También se proporcionan formas de dosificación mucosa que comprenden un anticuerpo anti-CD3, en las que las formas de dosificación, al administrarse a la mucosa, proporcionan una concentración sanguínea terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-CD3 a un sujeto. Para el propósito de la administración terapéutica mucosa, el compuesto activo (p.ej., un anticuerpo anti-CD3) se puede incorporar con excipientes o vehículos adecuados para administración mediante inhalación o absorción, p.ej., a través de pulverizadores o gotas nasales, o supositorios rectales o vaginales.

25 Las formas de dosificación oral sólidas incluyen, pero no están limitadas a, comprimidos (p.ej. comprimidos masticables), cápsulas, comprimidos oblongos, polvos, glóbulos, gránulos, polvos en saquito, comprimidos con recubrimiento entérico, perlas con recubrimiento entérico y cápsulas de gel blando con recubrimiento entérico. También se incluyen comprimidos multicapa, en los que las diferentes capas pueden contener diferentes fármacos. Las formas de dosificación sólida también incluyen polvos, glóbulos y gránulos que están encapsulados. Los polvos, glóbulos y gránulos pueden estar recubiertos, p.ej., con un polímero adecuado o un material de recubrimiento convencional para lograr, por ejemplo, mayor estabilidad en el tracto gastrointestinal, o para lograr una velocidad deseada de liberación. Además, se puede recubrir adicionalmente una cápsula que comprenda el polvo, glóbulos o gránulos. Un comprimido o comprimido oblongo se puede marcar para facilitar la división para mayor comodidad de ajuste de la dosis, según las necesidades. Las formas de dosificación de la presente invención pueden ser formas de dosificación unitarias en las que la forma de dosificación está destinada a suministrar una dosis terapéutica por administración, p.ej., un comprimido es igual a una dosis. Tales formas de dosificación se pueden preparar mediante métodos de farmacia bien conocidos para los expertos en la materia (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990)).

40 Las formas de dosificación oral típicas se pueden preparar combinando los ingredientes activos en una mezcla íntima con al menos un excipiente según las técnicas de composición farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes utilizables para uso en formas de dosificación oral (p.ej. polvos, comprimidos, cápsulas y comprimidos oblongos) incluyen, pero no están limitados a almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, granulantes, lubricantes, aglutinantes y disgregantes. Ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación oral líquida incluyen, pero no están limitados a agua, glicoles, aceites, alcoholes, saborizantes, conservantes y colorantes.

50 Los comprimidos y cápsulas representan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación oral convenientes, en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar. Tales formas de dosificación se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia. En general, se preparan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación mezclando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y conformando luego el producto en la presentación deseada si es necesario.

55 Como ejemplo, se puede preparar un comprimido mediante compresión o moldeo. Se pueden preparar pastillas comprimidas, p.ej., comprimiendo los ingredientes activos (p.ej., un anticuerpo anti-CD3) en forma suelta, como polvo o gránulos, en una máquina adecuada, opcionalmente mezclados con un excipiente. Los comprimidos moldeados se pueden obtener, p.ej., mediante moldeo, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto de anticuerpo anti-CD3 en polvo humidificado, p.ej., con un diluyente líquido inerte.

Los excipientes que se pueden usar en las formas de dosificación oral de la invención incluyen, pero no están limitados a, aglutinantes, rellenos, disgregantes y lubricantes. Los aglutinantes adecuados para uso en

composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero no están limitadas a, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, goma de tragacanto o gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, alginato sódico, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (p.ej., etil-celulosa, acetato de celulosa, carboxi-metil-celulosa de calcio e hidroxipropil-metil-celulosa (p.ej., N<sup>o</sup>s 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina y sus mezclas.

Formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen, pero no están limitadas a materiales comercializados como AVICEL® PH-101, AVICEL® PH-103, AVICEL®RC-581, AVICEL® PH-105 (disponibles de FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, Pa.), y sus mezclas. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetil-celulosa sódica comercializada como AVICEL® RC-581. Excipientes o aditivos anhidros o con baja humedad adecuados incluyen AVICEL® PH-103 y Almidón 1500® LM.

Ejemplo de rellenos adecuados para uso en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación aquí descritas incluyen, pero no están limitados a, talco, carbonato cálcico (p.ej., gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado y sus mezclas. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención está típicamente presente en aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición o forma de dosificación farmacéutica.

Los disgregantes se pueden usar en las composiciones y formas de dosificación oral o mucosa de la invención para proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se exponen a un medio acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante se pueden disgregar durante el almacenamiento, mientras que aquéllos que contienen demasiado poco pueden no desintegrarse a una velocidad deseada o bajo condiciones deseadas. Por tanto, se debería usar una cantidad suficiente de disgregante que no sea ni demasiado ni demasiado poco para alterar deletéreamente la liberación de los ingredientes activos, para formar las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación oral sólidas aquí descritas. La cantidad de disgregante usada varía basándose en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible para los expertos en la materia. Típicamente, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación comprenden de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 15 por ciento en peso de disgregante, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso.

Los disgregantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación orales o mucosas de la invención incluyen, pero no están limitadas a, agar-agar, ácido algínico, carbonato cálcico, Primogel, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilin potásico, clicolato de almidón sódico, almidón de maíz, patata o papioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, gomas, y sus mezclas.

Los lubricantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, pero no están limitados a, estearato cálcico, estearato magnésico o Sterotes, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido estéarico, lauril-sulfato sódico, talco, aceite vegetal hidrogenado (p.ej., aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar y sus mezclas. Lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL® 200, fabricado por W. R. Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. of Plano, Tex.), CAB-O-SIL® (un producto de dióxido de silicio pirogénico comercializado por Cabot Co. of Boston, Mass.), y sus mezclas. Si se usan, los lubricantes se emplean en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación en las que se incorporan. También se puede usar un deslizante, como dióxido de silicio coloidal.

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación oral o mucosa pueden comprender adicionalmente uno o más compuestos que reduzcan la velocidad a la que se descompondrá el ingrediente activo. Por tanto, las formas de dosificación oral aquí descritas se pueden elaborar para formar una forma de dosificación de liberación inmediata o prolongada. Las formas de dosificación inmediata pueden liberar el anticuerpo anti-CD3 en un tiempo bastante corto, por ejemplo, de unos pocos minutos a unas pocas horas. Las formas de dosificación de liberación prolongada pueden liberar en anticuerpo anti-CD3 durante un período de varias horas, por ejemplo, hasta 24 horas o mayor, si se desea. En cada caso, la liberación se puede controlar para producirse sustancialmente a una velocidad predeterminada a lo largo del período de suministro. Por ejemplo, las formas de dosificación oral sólidas se pueden recubrir con un material polimérico u otros materiales de recubrimiento conocidos para conseguir, por ejemplo, mayor estabilidad durante el almacenamiento o en el tracto gastrointestinal, o para lograr el control durante la liberación del fármaco. Tales técnicas de recubrimiento y materiales usados aquí se conocen bien en la técnica. Tales compuestos, que se denominan aquí "estabilizantes" incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes como ácido ascórbico y tampones salinos. Por ejemplo, se pueden usar ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxi-propil-metil celulosa, copolímeros de éster de ácido metacrílico-ácido metacrílico, trimelitato de acetato de celulosa, carboxi-metil-etil celulosa y succinato de acetato de hidroxi-propil-metil- celulosa, entre otros, para conseguir un recubrimiento entérico. Se pueden usar mezclas de ceras, goma laca, zeína, etil celulosa, resinas acrílicas, acetato de celulosa, elastómeros de silicona, para conseguir un recubrimiento de liberación prolongada. Véase, por ejemplo, Remington, citado anteriormente, Chapter 93, para otros tipos de recubrimientos, técnicas y equipamiento.

Los líquidos para administración oral o mucosa representan otra forma de dosificación conveniente, en cuyo caso se puede emplear un disolvente. En algunas realizaciones, el disolvente es un líquido tamponado como solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se pueden preparar formas de dosificación oral líquidas combinando en ingrediente activo en un disolvente adecuado para formar una disolución, suspensión, jarabe o elixir del ingrediente activo en el líquido. Las soluciones, suspensiones, jarabes y elixires pueden comprender opcionalmente otros aditivos, incluyendo, pero no limitados a glicerina, sorbitol, propileno glicol, azúcares u otros endulzantes, aromatizantes y estabilizantes. Los aromatizantes pueden incluir, pero no están limitados a pipermin, salicilato de metilo o aromatizante de naranja. Los edulcorantes pueden incluir azúcares, aspartamo, sacarina, ciclamato sódico y xilitol.

A fin de reducir el grado de inactivación del anticuerpo anti-CD3 administrado oralmente al estómago del sujeto tratado, se puede administrar un antiácido simultáneamente con la inmunoglobulina, que neutraliza el carácter, de lo contrario ácido, del intestino. Por tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 se administra oralmente con un antiácido, p.ej., hidróxido de aluminio o hidróxido de magnesio como antiácido MAALOX®, antiácido MYLANTA® o un bloqueante de H<sub>2</sub>, como cimetidina o ranitidina. Un experto en la materia se dará cuenta de que la dosis de antiácido administrada conjuntamente con un anticuerpo anti-CD3, depende del antiácido particular usado. Cuando el antiácido es antiácido MYLANTA® en forma líquida, se pueden administrar entre 15 ml y 30 ml, p.ej., aproximadamente 15 ml. Cuando se usa el bloqueante de H<sub>2</sub>, se pueden usar entre 400 y 800 mg por día.

Los kits aquí descritos pueden incluir una composición oral de anticuerpo anti-CD3 en forma de forma de dosificación oral líquida ya preparada lista para administración o, alternativamente, pueden incluir una composición de anticuerpos anti-CD3 en forma de composición farmacéutica sólida que se puede reconstituir con un disolvente para proporcionar una forma de dosificación oral líquida. cuando el kit incluye una composición de anticuerpo anti-CD3 en forma de composición farmacéutica sólida que se puede reconstituir con un disolvente para proporcionar una forma de dosificación oral líquida (p.ej., para administración oral o nasal), el kit puede incluir opcionalmente un disolvente para reconstitución. en este caso, el disolvente para constitución o reconstitución se combina con el ingrediente activo para proporcionar una forma de dosificación oral líquida del ingrediente activo. Típicamente, el ingrediente activo es soluble en el disolvente y forma una disolución. El disolvente puede ser, p.ej., agua, un líquido no acuoso o una combinación de un componente no acuoso y un componente acuoso. Componentes no acuosos adecuados incluyen, pero no están limitados a aceites; alcoholes como etanol; glicerina; y glicoles, como polietilenglicol y propileno-glicol. En algunas realizaciones, el disolvente es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Para la administración por inhalación, los compuestos de anticuerpo anti-CD3 mucosos se pueden suministrar en forma de un pulverizador en aerosol desde un envase presurizado o dispensador que contiene un propelente adecuado, p.ej., un gas como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. N° 6.468.798.

La administración sistémica se puede realizar también por medios transmucosos. Para la administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados a la barrera a permear. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de gotas o pulverizadores nasales, o supositorios rectales o vaginales.

Los compuestos de anticuerpos anti-CD3 se pueden preparar también en forma de supositorios (p.ej. con bases de supositorio como manteca de cacao y otros glicéridos) o con enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, las composiciones de anticuerpos anti-CD3 orales o mucosas se preparan con vehículos que protegerán el anticuerpo anti-CD3 frente a la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, como acetato de vinil-etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Tales formulaciones se pueden preparar usando técnicas estándar. Los materiales se pueden obtener también comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos para infectar células con anticuerpos monoclonales frente a antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstas se pueden preparar según los métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, según se describió en la patente de EE.UU. N° 4.522.811.

La dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de tales composiciones de anticuerpos anti-CD3 se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares (p.ej., de células extraídas de un animal tras la administración mucosa de un anticuerpo anti-CD3) o animales experimentales, p.ej., para determinación de LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Se prefieren las composiciones que presentan mayores índices terapéuticos. Aunque se pueden usar composiciones de anticuerpos anti-CD3 que presentan efectos tóxicos, hay que tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado, a fin de minimizar el daño potencial y, por tanto, reducir los efectos secundarios.



producción de IL-10 y/o TGF-beta por las células T de la sangre periférica en la fabricación de un medicamento oral para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis reumatoide y rechazo de aloinjerto, o para la fabricación de un tratamiento nasal para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la esclerosis múltiple.

- 5 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de anticuerpos anti-CD3 oral o mucosa puede ser, p.ej., la cantidad necesaria para reducir la proliferación de células T en aproximadamente al menos 20%. En algunas realizaciones, la proliferación de células T se reduce en al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, o aproximadamente 90%, desde las concentraciones de pretratamiento. Además, se pueden medir concentraciones de IL-10 y/o TGF- $\beta$ , o concentraciones de células que secreten estas citoquinas, en la sangre periférica, p.ej., usando un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) o un ensayo basado en células, como escaneo FACS, para controlar la inducción de tolerancia. Según la invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de anticuerpos anti-CD3 nasal u oral, es la cantidad necesaria para incrementar las concentraciones de células que secretan IL-10 y/o TGF- $\beta$ , según se miden en sangre periférica, en aproximadamente 20% o más. En algunas realizaciones, las concentraciones de células que secretan IL-10 y/o TGF- $\beta$ , según se miden en sangre periférica, se incrementan en al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, p.ej., se dobla.

Los usos de la invención incluyen típicamente administrar a un sujeto una composición de anticuerpos anti-CD3 oral o mucosa, suficiente para estimular el sistema inmunitario mucoso. En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar una composición de anticuerpos anti-CD3 suficiente para incrementar la producción de IL-10 y/o TGF- $\beta$  por las células T en la sangre periférica, p.ej., las células T reguladoras, p.ej., en aproximadamente 100%, 200%, 300% o más. En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar una composición de anticuerpos anti-CD3 suficiente para reducir la proliferación de las células T en la sangre periférica, p.ej. en aproximadamente 20%; p.ej., en algunas realizaciones, en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más. En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar una composición de anticuerpos anti-CD3 oral o mucosa, suficiente para incrementar las concentraciones en suero de IL-10 y/o TGF- $\beta$ , p.ej., medidas usando un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), para controlar la inducción de tolerancia. En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar una composición de anticuerpos anti-CD3 orales, suficiente para incrementar las concentraciones de células reguladoras en el suero. En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar una composición anti-CD3 oral, suficiente para producir una mejora en uno o más marcadores clínicos de incapacidad; por ejemplo, en la esclerosis múltiple, tales marcadores podrían incluir lesiones promotoras de gadolinio visualizadas por MRI, o criterios de MRI de Paty, Fazekas o Barkhof, o criterios diagnósticos de McDonald; en la diabetes, tales marcadores podrían incluir las concentraciones de glucosa plasmática o sanguínea, glucosuria, cetonuria, poliuria, polidipsia, pérdida de peso con toma de alimentos normal o incluso incrementada, fatiga y visión borrosa.

No se espera que el síndrome de liberación de citoquina (CRS) esté asociado con anticuerpos anti-CD3 administrados oralmente, pero los métodos pueden incluir controlar los sujetos para señales y síntomas del síndrome de liberación de citoquina, particularmente tras las primeras pocas dosis, pero también tras el tratamiento del hiato con reanudación de terapia; tales métodos son particularmente útiles en la determinación de la seguridad de la administración oral o mucosa de los anticuerpos anti-CD3. El CRS está asociado con artralgias, mialgias, fiebres, tirtonas, hipoxia, náuseas y vómitos; el síndrome de liberación de citoquina grave puede producir edema pulmonar y sofoco. En algunas realizaciones, los usos incluyen bajar la temperatura del sujeto a menos de aproximadamente 37,8 °C (100°F), antes de la administración de cualquier dosis de composiciones de anticuerpos anti-CD3.

En algunas realizaciones, los usos incluyen escrutar al sujeto para evidencia clínica de sobrecarga de volumen, hipertensión sin controlar o insuficiencia cardíaca descompensada. En algunas realizaciones, los usos incluyen no administrar los anticuerpos anti-CD3 orales a sujetos que tengan cualquiera de las siguientes evidencias, sobrecarga de volumen, hipertensión sin controlar o insuficiencia cardíaca descompensada. En algunas realizaciones, los usos implican evaluar la función pulmonar del sujeto y no administrar los anticuerpos anti-CD3 orales a sujetos que no tengan una radiografía de tórax clara. En algunas realizaciones, los usos incluyen controlar el aclaramiento de células CD3+T y/o las concentraciones plasmáticas de anticuerpo anti-CD3, y ajustar la dosis de las composiciones anti-CD3 orales consecuentemente.

Se describe así mismo la administración al sujeto de 8,0 mg/kg de succinato de metil-prednisolona sódica, p.ej., intravenosamente, p.ej., de 1 a 4 horas antes de la administración de las composiciones de anticuerpos anti-CD3 orales o mucosas. En algunas realizaciones, los usos pueden incluir administrar al sujeto un antiinflamatorio, p.ej., acetaminofén o antihistamina, antes, concomitantemente con, o tras la administración de las composiciones de anticuerpos anti-CD3 orales.

En algunas realizaciones, los usos incluyen evaluar y/o controlar un sujeto para anticuerpos anti-ratón, y discontinuar la administración de las composiciones de anticuerpos anti-CD3 orales o mucosas si el sujeto tiene titulaciones de anticuerpos anti-ratón superiores a aproximadamente 1:1000. No se espera el desarrollo de anticuerpos anti-ratón con anticuerpos anti-CD3 administrados por vía oral o mucosa.

También se describe la administración de las composiciones de anticuerpos anti-CD3 orales o mucosas n simultáneamente con una o más segundas modalidades terapéuticas, p.ej., tratamiento sintomático, terapia inmunosupresora de dosis elevada y/o trasplante autólogo de células madre sanguíneas periféricas (HSCT). Tales métodos se conocen en la técnica y pueden incluir la administración de sustancias útiles para tratar un trastorno autoinmunitario, p.ej., NSAIDs (incluyendo inhibidores selectivos de COX-2); otros anticuerpos, p.ej., anticuerpos anticitoquina, p.ej., anticuerpos contra IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , y/o TNF- $\alpha$ , compuestos que contienen oro, proteínas de choque térmico (p.ej., según se describen en la patente de EE.UU. N° 6.007.821); fármacos inmunosupresores (como corticosteroides, p.ej., prednisolona y metil-prednisolona; ciclofosfamida; azatioprina; micofenolato de mofetilo (MMF); ciclosporina y tacrolimus; metotrexato; o cotrimoxazol) y preparaciones de células terapéuticas, p.ej., terapia celular específica de sujeto, terapia de células madre hematopoyéticas. Por ejemplo, los métodos incluyen administrar uno o más tratamientos para la esclerosis múltiple, p.ej., interferones  $\beta$  (p.ej., interferón  $\beta$ -1a, interferón  $\beta$ -1b), mitoxantrona o acetato de glatiramer. Por ejemplo, los métodos incluyen administrar uno o más fármacos inmunosupresores no anti-CD3 (como corticosteroides, p.ej., prednisolona y metil-prednisolona; ciclofosfamida; azatioprina; micofenolato de mofetilo (MMF); ciclosporina y tacrolimus; metotrexato; o cotrimoxazol) al sujeto, p.ej., antes, durante o después de la administración de las composiciones anti-CD3 orales o mucosas.

En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar uno o más tratamientos estándar para diabetes, p.ej., administración de una o más sustancias útiles para el tratamiento de la diabetes, p.ej., insulina, sulfonil-ureas (p.ej., meglitinidas y nateglinidas), biguanidas, tiazolidina-dionas, e inhibidores de alfa-glucosidasa, entre otros, así como modificación de la dieta o régimen de ejercicio.

#### 20 Tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (MS) se caracteriza clínicamente de forma típica por una disfunción neurológica progresiva recurrente o crónica, producida por lesiones en el SNC. Patológicamente, las lesiones incluyen múltiples áreas de desmielinización, que afectan al cerebro, nervios ópticos y médula espinal. La etiología subyacente es incierta, pero se cree ampliamente que MS es, al menos parcialmente, una enfermedad autoinmunitaria o en la que interviene el sistema inmunitario.

Por tanto, la invención incluye el uso de un anticuerpo anti-CD3, según se define en la reivindicación 1, para tratar, retrasar o evitar la aparición de MS, mediante administración oral o nasal de un anticuerpo anti-CD3.

Se incluyen usos en los que a un sujeto que tiene o presenta riesgo de tener MS, se le administra oralmente un anticuerpo anti-CD3. Se describen así mismo métodos de escrutinio de sujetos que presentan riesgo de MS, p.ej., mediante escrutinio de uno o más indicadores de MS, para evaluar si el sujeto presenta riesgo de desarrollar MS, y administración de anticuerpo anti-CD3 si se determina que el sujeto presenta riesgo. Como la susceptibilidad a MS es, al menos parcialmente, familiar, los sujetos que tienen un pariente con MS se puede considerar que tienen un riesgo incrementado de desarrollar MS.

En algunas realizaciones, los usos incluyen la administración oral o nasal de una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-CD3 a un sujeto diagnosticado de MS. El diagnóstico de MS se realiza típicamente basándose en señales y síntomas clínicos que incluyen termosensibilidad, oftalmoplegia internuclear, neuritis óptica y síntoma de Lhermitte (véase, p.ej., McDonald et al., Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines From the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann. Neurol. 50:121, 2001). Una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad suficiente para prevenir la aparición de un episodio agudo o para acortar la duración de un episodio agudo, o para reducir la gravedad de uno o más síntomas, p.ej., termosensibilidad, oftalmoplegia internuclear, neuritis óptica y síntoma de Lhermitte. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para prevenir la aparición o activar la cicatrización de una lesión desmielinizada en uno o más órganos de los siguientes: cerebro, nervios ópticos y médula espinal del sujeto, p.ej., según se demuestra con MRI.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 oral o nasal se administra en combinación con un tratamiento estándar para MS, p.ej., administración de terapia de corticosteroides, interferón beta-1b, glatiramer, mitoxantrona, cannabis o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 oral se administra en combinación con un tratamiento para uno o más síntomas de MS, p.ej., depresión y fatiga, disfunción de la vejiga, espasticidad, dolor, ataxia y temblor intencional; tales tratamientos incluyen sustancias farmacológicas, ejercicio y ortótica apropiada. Se puede encontrar información adicional sobre el diagnóstico y tratamiento de MS en el sitio web de la sociedad de MS, en internet en [nationalmssociety.org](http://nationalmssociety.org), cuyos contenidos se incorporan aquí mediante referencia.

El tiempo medio desde la aparición de la enfermedad hasta la discapacidad grave, suficiente para que el sujeto requiera ayuda para el movimiento es de aproximadamente 15 años; por tanto, se describe también un método para retrasar la aparición de la discapacidad debida a MS, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD3 oral.

Tratamiento y prevención de la diabetes mellitus

5 Existe una fuerte evidencia de que un proceso autoinmunitario en el que intervienen células está implicado en la destrucción de las células beta en la mayoría de los casos de diabetes mellitus tipo I. Por tanto, los métodos aquí descritos incluyen métodos de tratamiento o prevención de diabetes mellitus, p.ej., tipo I (denominada algunas veces diabetes insulino-dependiente o de aparición juvenil).

10 Se incluyen usos en los que a un sujeto que tiene o presenta riesgo de tener diabetes mellitus se le administra oralmente un anticuerpo anti-CD3, según se define en la reivindicación 1. También se describen métodos de prevención de diabetes mediante escrutinio de sujetos que presentan riesgo de diabetes, p.ej., escrutando para niveles elevados o anormales de glucosa sanguínea, para evaluar si el sujeto presenta riesgo de desarrollar diabetes, y administración de anticuerpo anti-CD3 oral si se determina que el sujeto presenta riesgo. Los sujetos que presentan riesgo de diabetes incluyen sujetos con una historia familiar de diabetes tipo I, ya que la descendencia y hermanos de sujetos con diabetes mellitus de tipo I presentan un riesgo incrementado de padecer la enfermedad. Otros que se puede considerar que presentan riesgo de diabetes tipo I incluyen individuos más jóvenes si son obesos (>120% del peso corporal deseable o un índice de masa corporal = 27), tienen un pariente de primer grado con diabetes, son miembros de una población étnica de alto riesgo (afroamericanos, hispanos americanos, nativos americanos y asiáticos americanos, han dado a luz un bebé que pese más de 4,08 kg (9 lb), han tenido previamente diabetes mellitus gestacional (GDM; la diabetes permanente se desarrollará en aproximadamente 50% de los sujetos en 10 años desde la GDM), son hipertensos (presión sanguínea = 140/90 mm H), tienen dislipidemia aterogénica (concentraciones de lipoproteínas de densidad elevada del colesterol [HDL] = 35 mg/dl o concentraciones de triglicéridos = 250 mg/dl) o tienen tolerancia a la glucosa dificultada (IGT) o glucosa en ayunas dificultada (IFG) en ensayos previos. Los individuos que tienen o presentan riesgo de desarrollar diabetes causada por pancreatitis crónica, pancreatectomía o carcinoma de páncreas, también se pueden tratar usando los métodos aquí descritos.

25 Un sujeto que se ha determinado que presenta riesgo de desarrollar diabetes se puede tratar por tanto profilácticamente con administración oral o mucosa de un anticuerpo anti-CD3 para prevenir o retrasar el desarrollo de diabetes, o reducir la gravedad de la diabetes, p.ej., reducir la dependencia del sujeto de la insulina inyectada; se pueden usar concurrentemente otras medidas para ayudar a prevenir la diabetes, p.ej. modificaciones en la dieta o ejercicio, administración de antidiabéticos orales, u otros métodos conocidos en la técnica.

30 La invención incluye también el uso de un anticuerpo anti-CD3 en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene diabetes, que comprende administrar oralmente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD3. Se puede realizar un diagnóstico de diabetes mellitus tipo I, p.ej., basándose en la historia de síntomas confirmada por una concentración de glucosa sanguínea o plasmática superior a 200 mg/dl, con la presencia de glucosuria y/o cetonuria. Los síntomas clásicos de diabetes son poliuria, polidipsia, pérdida de peso con toma de alimento normal o incluso incrementada, fatiga y visión borrosa, normalmente presente de 4 a 12 semanas antes de que se perciban los síntomas. Antes de la aparición clínica de diabetes mellitus tipo I, el diagnóstico puede ser posible con métodos serológicos, p.ej., complementados con ensayos de la función de las células beta.

40 Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral o mucosa, puede ser una cantidad suficiente para producir uno o más de los siguientes síntomas: (1) reducción de las concentraciones de glucosa plasmática de excreción de glucosa en la orina para eliminar la poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de calorías y efectos adversos como visión borrosa debido a la inflamación del cristalino y susceptibilidad a la infección, particularmente vaginitis en mujeres, (2) supresión de la cetosis, (3) inducción de un equilibrio de nitrógeno positivo para restaurar la masa corporal magra y la capacidad física y para mantener el crecimiento, desarrollo y funcionamiento vital normales, (4) evitar o reducir considerablemente las complicaciones tardías de la diabetes, es decir, retinopatía con pérdida potencial de visión, nefropatía que conduce a la enfermedad renal de etapa final (ESRD), y neuropatía con riesgo de úlceras de pie, amputación, articulaciones de Charcot, disfunción sexual, disfunción potencialmente incapacitante del estómago, intestino y vejiga, enfermedad vascular arteriosclerótica, vascular periférica y cerebrovascular. Los estándares actuales de cuidado de la American diabetes Association incluyen (1) mantener las concentraciones de glucosa sanguínea total de los capilares preprandiales de 80 a 120 mg/dl, las concentraciones de glucosa sanguínea al acostarse de 100 a 140 mg/dl, y las concentraciones de glucosa sanguínea máximas posprandiales a menos de 180 mg/dl, y (2) mantener un HbA1c de menos de 7,0% (relativo a un intervalo DCCT no diabético de aproximadamente 4,0% a 6,0%).

55 En anticuerpo anti-CD3 oral o mucoso se puede administrar solo o en combinación con una terapia de diabetes estándar, p.ej., incluyendo, pero no limitada a, la administración de una o más sustancias útiles en el tratamiento de la diabetes, p.ej., insulina, sulfonil-ureas (p.ej., meglitinidas y nateglinidas), biguanidas, tiazolidina-dionas e inhibidores de alfa-glucosidasa, entre otras, así como modificaciones de dieta o régimen de ejercicio. Se puede encontrar información adicional acerca del diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el capítulo Diabetes Mellitus del sitio web MD de Scientific American Medicine en internet en samed.com, cuyos contenidos se incorporan aquí mediante referencia.

Tratamiento de la artritis autoinmunitaria

La artritis reumatoide (RA) es la artritis inflamatoria crónica más común y afecta aproximadamente al 1% de adultos; es dos o tres veces más prevalente en mujeres que en hombres. RA puede empezar ya en la infancia, pero la aparición se produce típicamente en la quinta o sexta década. El diagnóstico se puede realizar de acuerdo con los American Rheumatism Association Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis. Una cantidad terapéuticamente efectiva producirá una mejora en uno o más de los siguientes síntomas: número de articulaciones inflamadas, extensión de la inflamación e intervalo de movimiento de la articulación. También se pueden realizar las mediciones de laboratorio (p.ej., ESR y valor de hematocrito) y las valoraciones de características subjetivas (p.ej., dolor y rigidez matutina). La invención incluye el uso de un anticuerpo anti-CD3 a través de la vía oral, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis autoinmunitaria, p.ej., RA, en un sujeto, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD3.

En algunas realizaciones, los usos incluyen la administración de una segunda sustancia terapéutica, p.ej., para analgesia, para controlar adicionalmente la inflamación, y/o alterar la historia natural de la enfermedad. Varias de tales sustancias son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden administrar uno o más de NSAIDs, metotrexato, prednisona, inhibidores de TNF, leflunomida o sulfasalazina (con o sin hidroxycloquina). También se pueden usar sustancias inmunosupresoras como azatioprina o ciclosporina.

Tratamiento o prevención del rechazo de aloinjertos

Los usos aquí descritos se pueden usar también para tratar o prevenir el rechazo de injertos en un receptor de trasplante. Por ejemplo, los usos se pueden utilizar en una amplia variedad de procedimientos de trasplante de tejidos y órganos, p.ej., los usos se pueden utilizar para inducir tolerancia central en un receptor de un injerto de células, p.ej., células madre como médula ósea y/o de un tejido u órgano como islotes pancreáticos, hígado, riñón, corazón, pulmón, piel, músculo, tejido neuronal, estómago e intestinos. Por tanto, los nuevos métodos se pueden aplicar en tratamientos de enfermedades o trastornos que conllevan trasplante de células, tejidos u órganos (p.ej., trasplante de hígado para tratar la hipercolesterolemia, trasplante de células musculares para tratar la distrofia muscular, o trasplante de tejido neuronal para tratar la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson). En algunas realizaciones, los usos incluyen administrar a un sujeto que precise tratamiento: 1) un anticuerpo anti-CD3, y 2) un órgano o tejido donador, p.ej., hígado, riñón, corazón, pulmón, piel, músculo, tejido neuronal, estómago e intestinos.

En algunas realizaciones, el tejido trasplantado comprende islotes pancreáticos. Consecuentemente, se describe un método para tratar la diabetes mediante trasplante de células de islotes pancreáticos. El método comprende administrar a un sujeto que precise tratamiento: 1) un anticuerpo anti-CD3; y 2) células de islotes pancreáticos donadoras. Típicamente, el anticuerpo anti-CD3 se administra al receptor previamente a y/o simultáneamente a la administración de los islotes pancreáticos.

Por ejemplo, el receptor se trata luego con un régimen de fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo del tejido u órgano. Se conocen regímenes de tratamiento inmunosupresor estándar. La tolerancia al antígeno donante se puede evaluar mediante métodos estándar, p.ej., mediante ensayos de MLR.

En algunas realizaciones, el donante es un ser humano viable, vivo, p.ej., un donador voluntario, p.ej., un pariente del receptor. En algunas realizaciones, el donante ya no está vivo, o está cerebralmente muerto, es decir, no tiene actividad del tronco encefálico. En algunas realizaciones, el tejido u órgano donante se crioconserva. En algunas realizaciones, el donante es uno o más mamíferos no humanos, p.ej., un cerdo consanguíneo o transgénico, o un primate no humano.

**Ejemplos**

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Material y métodos45 *Anticuerpos anti-CD3*

Se adquirieron de ATCC células de hibridoma que producían el hamster 145-2Cl.1 mAb (IgG anti-ratón CD3 cadena  $\epsilon$ ). Las células de hibridoma se cultivaron en un matraz Integra en medio DMEM que contenía FCS pobre en Ig al 10%; NCTC-109 al 10%; aminoácidos no esenciales al 1%; piruvato sódico al 1%; L-glutamina al 1%; antibiótico/antimicótico al 1%; gentamicina al 0,2%. Los matraces se dividieron dos veces por semana y se recogieron los sobrenadantes y se enviaron a Strategic Biosolutions (Newark, DE) para concentración y purificación.

Se usó IgG de hamster purificada (ICN Pharmaceuticals, Inc.) como isotipo de control (IC).

*Alimentación de anticuerpo anti-CD3: modelo de ratón SJL*

Se alimentaron ratones hembra SJL (una cepa que presenta encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) al sufrir inmunización con proteína del proteolípido de mielina (PLP)) con anticuerpo anti-CD3 (5,50 y 500 µg/ratón) a la edad de 8 semanas en PBS durante 5 días consecutivos mediante alimentación forzada, usando una aguja de alimentación de acero inoxidable de calibre 18. Se extrajeron los nódulos linfáticos del bazo y del mesenterio (MLN) del ratón, típicamente 24-48 horas después del último suministro de alimentos.

#### *Citometría de flujo bicolor*

Se realizó citometría de flujo bicolor como sigue.  $1 \times 10^6$  células aisladas del bazo y MLN extraídas 24 horas después del último suministro de alimentos se incubaron en tampón de tinción (PBS con BSA al 4% y azida sódica al 0,1%) durante 5 min. Las células se tiñeron luego con CD25 anti-ratón marcado con ficoeritrina (PE) y CD4 anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 min. Las células se lavaron dos veces y luego se fijaron en PBS con formaldehído al 1%. El análisis se realizó sobre un citómetro de flujo FACScan con el software CellQuest.

#### *Proliferación de células del bazo y MLN*

Se aislaron células T del bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) de ratones alimentados y no alimentados, usando MACS MicroBeads de ratones CD90 (Thy1,2). Se cultivaron células  $1 \times 10^5$  T 1:1 con células del bazo irradiadas de ratones no alimentados y estimulados con 0,5 µg/ml de anti-CD3 en DMEM complementado con FBS al 10% inactivado térmicamente, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, y 2-ME 50 µM. Los cultivos se sometieron a pulsos con [ $^3$ H] timidina (1 µCi/pocillo) 72 horas más tarde y se recogieron 16 h más tarde.

#### *Inducción y evaluación de la evolución clínica de EAE, un modelo animal de MS, en ratones inmunizados con PLP*

Dos días después del último suministro de alimentos con los anticuerpos anti-CD3, se indujo encefalomiелitis alérgica experimental (EAE, un modelo animal de esclerosis múltiple) en los ratones SJL mediante inmunización en la almohadilla de la pata con un fragmento de proteína proteolípida de mielina (PLP) (139-151) 50 µg/ratón emulsionado 1:1 en adyuvante de Freund completo (CFA). Se proporcionó toxina de Pertussis (PT) i.v. en el momento de la inmunización y 48 horas después. Se puntuó la EAE como sigue: 0, ausencia de enfermedad; 1, cola lacia; 2, debilidad de la extremidad posterior; 3, parálisis de la extremidad posterior; 4, parálisis de la extremidad posterior y anterior; 5, moribundo.

#### *Ensayo de citoquina*

Se recogieron células del bazo 41 días después de la inmunización descrita anteriormente. Se aislaron las células y se eliminaron los glóbulos rojos mediante lisis. Los esplenocitos se cultivaron a razón de  $1 \times 10^6$  células/pocillo en 250 µl de medio Ex-Vivo 20 exento de suero, con o sin antígeno PLP. Se recogieron los sobrenadantes tras 40 horas para IL-10 y 72 horas para TGF-β. Se determinaron las concentraciones en los sobrenadantes mediante captura ELISA estándar. En resumen, se recubrieron placas de microvaloración con mAb IL-10 anti-ratón de rata a razón de 1 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M, pH 8,2 a 4°C, durante la noche. Las placas se lavaron y bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) con solución BSA al 10%. Se añadieron estándares y muestras de sobrenadante y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron y se añadió mAb IL-10 anti-ratón de rata biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina marcada con peroxidasa.

Para la cuantificación de TGF-β, las placas se recubrieron con 5 µg/ml de anti-TGF-β de pollo policlonal para incubación durante la noche a 4°C. Se usó anti-TGF-β monoclonal de ratón como anticuerpo secundario. Para detección, se usó IgG anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa. La citoquina unida se detectó mediante la adición de 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y lectura a DO a 450 nm tras el revelado del color.

#### *Ensayo de proliferación: esplenocitos de ratones inmunizados con PLP*

Se cultivaron esplenocitos a razón de  $5 \times 10^5$  células/pocillo, con o sin PLP (130-151), durante 72 horas. Se añadió [ $^3$ H] timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 12 horas de cultivo. Luego se recogieron las células y se midió la incorporación de timidina, usando un contador de centelleo de líquido LKB Betaplate.

#### *Evolución clínica de EAE, un modelo animal de MS, en ratones NOD inmunizados con PLP*

Se alimentaron ratones NOD hembra (un modelo de ratón de diabetes tipo I) a la edad de 8 semanas, con anticuerpo anti-CD3 (0,5, 5 y 50 µg/ratón) en PBS, durante 5 días consecutivos. Dos días después del último suministro de alimentos, los ratones se inmunizaron en la almohadilla de la pata con PLP (48-70) 100 µg/ratón emulsionado 1:1 en (CFA). Se proporcionaron 150 ng toxina de Pertussis (PT) i.v. en el momento de la inmunización y 48 horas después. Se puntuó la EAE como se describió anteriormente. Las células del bazo se recogieron 10 días después de la inmunización. Se aislaron las células del bazo y MLN, y se realizaron ensayos de citoquina y proliferación, según se describió anteriormente, con o sin estimulación con PLP 48-70 (1, 10 y 100 µg/ml).

Ratones Tg TCR OVA

Se usaron también los ratones Tg TCR OVA sobre el trasfondo BALB/c, clon DO11.10; los ratones D011.10 y células T CD4+ derivadas de los mismos, expresan un receptor de células T transgénicas (TCR) específico para un péptido de 17 aminoácidos (323-339) derivado de ovoalbúmina (OVA). Ratones Tg OVA de 8 semanas de edad se alimentaron durante 5 días consecutivos con isotipo control o anticuerpo anti-CD3 (0,5, 5 o 50 µg; o, en algunos experimentos, 50, 200 y 500 µg/ratón) en PBS. Veinticuatro horas después del último suministro de alimento, se extrajeron el bazo y los nódulos linfáticos de los ratones. Se realizaron ensayos de citoquinas y de proliferación, según se describió anteriormente, con o sin estimulación *in vitro* con OVA (10, 100 y 1000 µg/ml).

Ejemplo 1: evolución clínica de EAE en ratones SJL

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto del anticuerpo anti-CD3 administrado oralmente sobre la evolución clínica de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratones SJL, una raza de ratones susceptible a EAE.

En resumen, se alimentaron ratones SJL con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días. Cuarenta y ocho horas después del último suministro de anticuerpo anti-CD3, se indujo EAE inmunizando a los ratones con 50 µg de PLP (139-151) emulsionado con CFA. Se puntuó la EAE como sigue: 0, ausencia de enfermedad; 1, cola lacia; 2, debilidad de la extremidad posterior; 3, parálisis de la extremidad posterior; 4, parálisis de la extremidad posterior y anterior; 5, moribundo. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Curiosamente, se observaba una respuesta inversa a la dosis, resultando la mejor protección de la alimentación con 5 µg de anticuerpo anti-CD3.

La alimentación con 5 µg de anticuerpo anti-CD3 retrasó la aparición y redujo la gravedad de los síntomas de la EAE en seis días, comparando con el control (día 13 ±4 posinmunización, en el grupo de control comparado con día 19 ± 1,6 en el grupo alimentado con 5 µg; p = 0,04) y se redujo la puntuación máxima de la enfermedad de 2,95 ± 0,6 en el grupo de control hasta 1,1 ± 0,5 en el grupo alimentado (p = 0,001). En el día 24 posinmunización, todos los animales en el grupo alimentado con 5 µg se recuperaron totalmente, mientras que en el grupo de control, no alimentado, la puntuación de enfermedad media fue de 2,65 ± 0,22 (p<0,001). No se encontraron diferencias significativas en la aparición de la enfermedad o la puntuación máxima de la enfermedad en los grupos alimentados con 50 µg o 500 µg de anticuerpo anti-CD3, en comparación con el grupo de control. Sin embargo, los ratones que fueron alimentados con 50 µg de anti-CD3, alcanzaron el máximo de la enfermedad en el día 14, y luego empezaron a recuperarse. En el día 31, la puntuación de enfermedad media en este grupo fue de 0,3 ± 0,27, en comparación con 2,2 ± 0,7 en el grupo control (p<0,001).

Estos resultados demuestran que la alimentación con dosis pequeñas de anticuerpo anti-CD3 oral, pueden retrasar e invertir la inducción de EAE.

Ejemplo 2: proliferación de células del bazo de ratones SJL inmunizados con PLP

La proliferación de células T se puede usar como un buen indicador de la actividad de los mecanismos reguladores inmunitarios; la proliferación reducida como respuesta a la estimulación se ha ligado a la tolerancia a antígeno y a las concentraciones incrementadas de células reguladoras anérgicas, que pueden suprimir la proliferación de otras células T inflamatorias. El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto del anticuerpo anti-CD3 administrado oralmente sobre la proliferación de células del bazo, al inducir EAE en ratones SJL.

Se alimentaron ratones SJL con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días, según se describió anteriormente. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 50 µg de PLP (139-151) emulsionado con CFA. En el día 41 tras la inmunización, se prepararon células del bazo y se estimularon *in vitro* con 1, 10 o 100 µg/ml de PLP durante 72 horas. Se añadió [<sup>3</sup>H] timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 12 h de cultivo. Las células se recogieron entonces según se describió anteriormente y se midió la incorporación de timidina. Los resultados se muestran en la Figura 2; los esplenocitos aislados de ratones alimentados con 500 µg de anticuerpo anti-CD3 mostraban la menor proliferación como respuesta a la inmunización con PLP; aquellos esplenocitos de ratones alimentados con 5 µg proliferaron más, pero menos que los de ratones alimentados con 50 µg, que proliferaron de forma similar a los de ratones no alimentados, ilustrando una reactividad ligada a la dosis única para este fenómeno.

Los efectos observados con la dosis de 5 µg se confirmaron en experimentos adicionales. En resumen, los ratones SJL se alimentaron con 5 µg de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimentos, los ratones se inmunizaron con 50 µg de PLP (139-151), emulsionado con CFA. En el día 41 tras la inmunización, se prepararon células del bazo y se estimularon *in vitro* con 1, 10 y 100 µg/ml de PLP durante 72 horas. Se añadió [<sup>3</sup>H] timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 12 horas de cultivo. Las células se recogieron entonces y se midió la incorporación de timidina. Los resultados se muestran en la Figura 3. De nuevo, se demostró que una dosis de 5 µg de anticuerpo anti-CD3 era efectiva para reducir la proliferación de esplenocitos como respuesta al estímulo con PLP. Este resultado evidencia que la administración oral de anticuerpos anti-CD3 incrementa la regulación del sistema inmunitario, reduciendo por tanto la enfermedad e induciendo la respuesta inmunitaria en ratones SJL inmunizados con PLP.

Ejemplo 3: Respuesta de células T CD4+/CD25+ en MLN aislados de ratones SJL inmunizados con PLP

El estudio descrito en este ejemplo examinaba el efecto del anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, sobre las concentraciones de células T CD4+/CD25+, que se piensa que participan en la respuesta inmunitaria mucosa y pueden servir para suprimir activamente las respuestas específicas de antígeno, y células péptido asociado con la latencia (LAP)+, asociadas con el precursor de TGF- $\beta$ , en nódulos linfáticos mesentéricos (MLN), que están asociados con el sistema inmunitario mucoso, en ratones SJL inmunizados con PLP.

En resumen, se alimentaron ratones SJL con 5  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-CD3 o control de isotipo (IC) durante 5 días, según se describió anteriormente. En el día 6, se agruparon los linfocitos de MLN de 3 ratones de cada grupo, se prepararon y se tiñeron para CD4 y CD25 o LAP, y se analizaron mediante citometría de flujo, según se describió anteriormente.

Los resultados para las células CD4+/CD25+, mostrados en la Figura 4, son como sigue: No alimentados 11,9%; alimentados con IC: 9,83%; alimentados con aCD3-5: 23,76%. Por tanto, los MLNs aislados de ratones que no fueron alimentados con anti-CD3 (no alimentados), o alimentados con un control correspondiente al isotipo (alimentados IC), tenían concentraciones similares de células CD4+/CD25+ (aproximadamente 10-12%), mientras que los MLN de ratones alimentados con 5  $\mu$ g de anti-CD3 tenían concentraciones incrementadas de células CD4+/CD25+ (aproximadamente 24%).

En algunos casos se producía un incremento de células CD4+LAP+ en el bazo y MLN tras el suministro de anti-CD3; en el bazo, se producía un incremento de 5,5% a 7,9%; en el MLN de 2,0% a 3,2%; y en las placas de Peyer, las células CD4+LAP+ incrementaban de 4% a 5,2%. Estos resultados eran estadísticamente significativos.

Esos resultados proporcionan evidencia de que la respuesta inmunitaria reducida, asociada con la administración oral de anticuerpos anti-CD3, está asociada con números incrementados de células T CD4+LAP+ en el MLN, lo que demuestra la activación específica del MLN tras la administración oral de anti-CD3.

Ejemplo 4: Proliferación de células T en ratones SJL

El estudio descrito en este ejemplo examina el efecto del anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, sobre la proliferación de células T en ratones SJL no inmunizados.

Se aislaron células T de ratones SJL alimentados y no alimentados, del bazo (Figura 5A) y MLN (5B), usando MicroBeads MACS CD90 (Thy1,2) de ratón. Se cultivaron  $1 \times 10^5$  células T 1:1 con células del bazo irradiadas de ratones no alimentados y se estimularon con 0,5  $\mu$ g/ml de anti-CD3 en DMEM complementado con FBS al 10% termoinactivado, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y 50  $\mu$ M 2-ME. Los cultivos se sometieron a pulsos con [ $^3$ H] timidina (1  $\mu$ Ci/pocillo) 72 horas después, y se recogieron 16 horas más tarde. Los resultados, mostrados en Figuras 5A y B, indican que el bazo y MLN de ratones alimentados con 5  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-CD3 tenían una proliferación reducida de células T, en comparación con el control. La proliferación de células T en ratones no alimentados se fijó en el 100%. La proliferación de células T del bazo de ratones alimentados con anticuerpo anti-CD3 era  $25\% \pm 10$ , frente a controles no alimentados ( $p < 0,01$ ; Figura 5A); la proliferación de células T aisladas de MLN de ratones alimentados con anticuerpo anti-CD3 era de  $7,5\% \pm 4$ , frente a controles no alimentados ( $p < 0,01$ ; Figura 5B). (La significancia se determina usando el test de Student de dos colas).

Estos resultados indican que la actividad antiinflamatoria del anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, está asociada con respuestas proliferativas de células T reducidas en el MLN y el bazo de ratones SJL no inmunizados.

Ejemplo 5: Comparación de la evolución clínica de EAE en ratones NOD

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de la administración oral de dosis bajas de anticuerpos anti-CD3 en la inducción y síntomas de EAE en ratones NOD, un modelo de diabetes autoinmunitaria. Los ratones NOD son susceptibles de encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida por el epítipo 56-70 de la proteolipoproteína (PLP) y, por tanto, proporcionan otro modelo animal de MS.

En resumen, según se describió anteriormente, los ratones se alimentaron con 5, 50 o 500  $\mu$ g de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 100  $\mu$ g de PLP (48-70) emulsionado con CFA. Se puntuó la EAE como sigue: 0, ausencia de enfermedad; 1, cola lacia; 2, debilidad de la extremidad posterior; 3, parálisis de la extremidad posterior; 4, parálisis de la extremidad posterior y anterior; 5, moribundo. Los resultados se muestran en la Figura 6. El análisis estadístico se realizó utilizando la puntuación media acumulada  $\pm$  SEM (No alimentados:  $8,7 \pm 1,4$ ; alimentados con 0,5  $\mu$ g:  $10,9 \pm 4,2$ ; alimentados con 50  $\mu$ g:  $6,7 \pm 2,9$ ; alimentados con IC:  $13,2 \pm 5$ ). Los resultados muestran que en ratones NOD inmunizados con PLP, alimentados con 5  $\mu$ g de anti-CD3, existe una inhibición significativa de EAE, en comparación con el grupo no alimentado ( $p = 0,0006$ ) y con el grupo IC ( $p = 0,005$ ). Adicionalmente, el efecto de CD3 administrado por vía oral no es específico de un solo modelo animal (véase Ejemplo 1, indicando la eficacia terapéutica en ratones SJL), estirpe o péptido y, por tanto, es probable que funcione en seres humanos.

Ejemplo 6: Proliferación de células del bazo de ratones NOD inmunizados con PLP

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral sobre la proliferación de células T en ratones NOD inmunizados con PLP.

5 Se alimentaron ratones NOD con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3 o IC durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 100 µg de PLP (48-70) emulsionado con CFA. En el día 10 tras la inmunización, se prepararon células del bazo y se estimularon *in vitro* con 1, 10 o 100 µg/ml de PLP durante 72 horas. Se añadió [<sup>3</sup>H] timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 12 horas de cultivo. Las células se recogieron entonces. Los resultados, mostrados en las Figuras 7 y 8, demuestran que la administración oral de dosis bajas de anticuerpo anti-CD3 produce la proliferación reducida de células T. La proliferación de células del bazo de NOD alimentados con 5 µg de anti-CD3 fue de 26198 ± 696 cpm, que era significativamente más baja (p<0,01) en comparación con ratones alimentados con IC (81000 ± 2009 cpm).

Este resultado constituye una evidencia de que la administración oral de anticuerpos anti-CD3 reduce las respuestas inmunitarias inductoras de enfermedad en ratones NOD inmunizados con PLP.

Ejemplo 7: Producción de citoquina en células del bazo de ratones NOD inmunizados con PLP

15 El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, sobre la producción de la citoquina IL-10 en células del bazo de ratones NOD que presentaban EAE, tras inmunización con PLP.

20 Se alimentaron ratones NOD con 5, 50 o 500 µg de anticuerpo anti-CD3 o IC durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 100 µg de PLP (48-70) emulsionado con CFA. En el día 10 tras la inmunización, se prepararon células del bazo y se estimularon *in vitro* con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3. Los sobrenadantes se recogieron después de 40 horas, y se midió la IL-10 mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 9. La concentración de IL-10 secretada por los diferentes grupos: no alimentados: 1422 ± 620; alimentados con 0,5 µg: 4489 ± 566; alimentados con 5 µg: 2726 ± 661; alimentados con 50 µg: 1438 ± 620; alimentados con IC: 3005 ± 764. La concentración de IL-10 de ratones que se alimentaron con 0,5 µg de anti-CD3 fue significativamente mayor, en comparación con los ratones no alimentados (p = 0,01). Esto ilustra que la administración oral de dosis bajas de anticuerpo anti-CD3 origina una producción de IL-10 incrementada, en comparación con el control. Esto proporciona evidencia de que la actividad terapéutica de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral puede estar mediada, al menos en parte, por concentraciones incrementadas de IL-10, la cual es conocida como citoquina Th2 reguladora, implicada en la inversión de EAE.

Ejemplo 8: Producción de citoquina en células del bazo de ratones transgénicos TCR OVA

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral sobre la producción de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF-β, en las células del bazo de ratones transgénicos con receptores de células T específicos para ovoalbúmina (OVA) ("Tg TCR OVA" o "Tg OVA")

35 Se alimentaron ratones Tg TCR OVA con control de isotipo (IC) o anticuerpo anti-CD3 (50, 200 o 500 µg; las dosis más elevadas requeridas para la efectividad en estos ratones se pueden deber a su naturaleza transgénica), durante 5 días consecutivos. Veinticuatro horas después del último suministro de alimento, el bazo se extrajo del ratón. Las células del bazo se prepararon y estimularon *in vitro* con 1000 µg/ml de OVA. Los sobrenadantes se recogieron después de 40 horas para mediciones de IL-10 (Figura 10A) y, tras 72 h, para mediciones de TGF-β (Figura 10B). Las concentraciones de citoquina se midieron mediante ELISA. Los resultados de IL-10, según se muestran en la Figura 10A, fueron como sigue (IL-10, pg/ml): control: 283±56; alimentados con 50 µg: 923± 99; alimentados con 200 µg: 750±89; alimentados con 500 µg: 289±25. La concentración de IL-10 en los ratones que fueron alimentados con 50 y 200 era significativamente mayor (p<0,01; p = 0,01, respectivamente). Las concentraciones de TGF-β, según se muestran en la Figura 10B, fueron como sigue (TGF-β, pg/ml): control 225±40; alimentados con 50 µg: 373±25; alimentados con 200 µg: 460±85; alimentados con 500 µg: 640±100. Esto ilustra que la concentración de TGF-β en los ratones que fueron alimentados con 50, 200 y 500 µg de anticuerpo anti-CD3 era significativamente mayor (p = 0,5; p<0,01, p<0,01, respectivamente). Estos resultados demuestran que la administración oral de dosis reducidas (50 µg) de anticuerpo anti-CD3, originan una producción de IL-10 incrementada, en comparación con el control, y dosis mayores (500 µg) de anticuerpo anti-CD3 originan una producción de TGF-β significativamente incrementada. Por tanto, las mayores dosis de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral pueden estar afectando a una población de células diferente, posiblemente células Th3 asociadas con la producción de TGF-β, por oposición a células Th2, asociadas con la producción de IL-10.

Ejemplo 9: Proliferación de células del bazo de ratones Tg OVA

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, sobre la proliferación de células del bazo de ratones transgénicos con receptores de células T específicos para ovoalbúmina (OVA) ("OVA TCR Tg" o "OVA Tg").

Se alimentaron ratones OVA Tg con control de isotipo o anticuerpo anti-CD3 (50, 200 y 500 µg), durante 5 días consecutivos. Veinticuatro horas después del último suministro de alimentos, el bazo se extrajo del ratón. Las células del bazo se prepararon y estimularon *in vitro* con 1000 µg/ml de OVA durante 72 horas (las células control no se estimularon). Se añadió [<sup>3</sup>H] timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 12 horas de cultivo. Las células se recogieron entonces. Los resultados se muestran en la Figura 11. La proliferación media de los diferentes grupos, expresada como (CPM)+STDEV, fue como sigue: no alimentados 180100±1000; alimentados con 50 µg: 133176±5200; alimentados con 200 µg: 158951±20000; alimentados con 500 µg: 157200±30000. La proliferación de células de ratón que había sido alimentado con 50 µg de anticuerpo anti-CD3 se redujo significativamente, en comparación con la del grupo no alimentado (p<0,05). Por tanto, en ratones Tg no inmunizados (p.ej., normales), la administración oral de dosis mayores de anticuerpo anti-CD3 parece tener poco efecto sobre la proliferación de células del bazo.

#### Ejemplo 10: Trasplante cardíaco alogénico

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto del tratamiento oral con anticuerpo anti-CD3 sobre la supervivencia, después de un trasplante cardíaco alogénico.

En resumen, se administró una dosis de 5 µg de anticuerpo anti-CD3 (clon 145-2C11) en un volumen de 200 µl, a ratones C57BL/6, mediante alimentación forzada oral cada día, empezando en el día -5 y continuando hasta el día +10 postrasplante (para un total de 16 administraciones), siendo el día 0 el día del trasplante. Los ratones recibieron trasplantes de corazón de ratones donadores BALB/c, y se controlaron para la cesación del latido cardíaco para determinar el día del rechazo.

Los trasplantes cardíacos en ratones control que no recibían tratamiento anti-CD3 sobrevivían una media de 8,4±1,0 días (n = 11); los trasplantes en ratones que recibían el tratamiento anti-CD3 sobrevivían una media de 16,2±5,8 días (n=5; p=0,0004 mediante ensayo de Logrank). Por tanto, la administración oral de anticuerpo anti-CD3 puede retrasar o prevenir con éxito el rechazo del aloinjerto.

#### Ejemplo 11: Modelo crónico de EAE

El estudio descrito en este ejemplo examinaba el efecto de la administración oral de dosis bajas de anticuerpos anti-CD3 en la inducción y síntomas de EAE en ratones NOD, un modelo de diabetes autoinmunitaria. Ratones NOD de quince semanas, cuando se inmunizaban con el péptido MOG (35-55), son un modelo de EAE/MS crónica.

Se alimentaron ratones hembra de 14 semanas de edad con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 o IC durante 5 días. Veinticuatro horas después del último suministro de alimentos, los ratones se inmunizaron con el péptido de glicoproteína de oligodendrocito de mielina encefalitogénico (MOG) (35-55), 150 µg emulsionado con CFA, y se puntuó la EAE según se describió anteriormente. El análisis estadístico se realizó usando la puntuación media acumulada ± SEM. Según se ilustra en la Figura 12, las puntuaciones de EAE fueron como sigue en el día 83: No alimentados 39±14,58; alimentados con 0,5 µg: 33,78±6,79; alimentados con 5 µg: 8,75±14; alimentados con 50 µg: 38,5±16,8; alimentados con IC: 32,9±20,54. Por tanto, los ratones que fueron alimentados con 5 µg de anticuerpo anti-CD3, mostraban una inhibición significativa de EAE, en comparación con el grupo no alimentado (p = 0,001). Este resultado indica que el efecto de la administración oral no está limitado a un modelo animal específico (considerar con Ejemplos 1 y 5). Adicionalmente, los resultados de este estudio indican que el anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, tiene valor terapéutico en un modelo crónico de MS, así como en los modelos de recaída/remisión, según se ilustra en los Ejemplos 1 y 5, que usan un péptido antigénico diferente para inducir EAE.

#### Ejemplo 12: Proliferación de células del bazo y los nódulos linfáticos popliteales (PLN)

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de la administración oral de dosis bajas de anticuerpos anti-CD3 sobre la proliferación de células del bazo y los nódulos linfáticos popliteales (PLN). Los PLNs están localizados cerca de las piernas y el estómago, y se consideran nódulos linfáticos inespecíficos

Se alimentaron ratones SJL con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 o IC durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 50 µg de PLP (139-151) emulsionado con CFA. En el día 10 tras la inmunización, se prepararon células del bazo y PLN, y se estimularon *in vitro* con 2 µg/ml (Fig. 13A) de anticuerpo anti-CD3 y 100 µg/ml de PLP (Fig. 13B), respectivamente, durante 72 horas. Se añadió [<sup>3</sup>H] timidina (1µCi/pocillo) durante las últimas 12 horas de cultivo. Las células se recogieron y se midió la absorción de timidina, según se describió.

La proliferación de células PLN de ratones que fueron alimentadas con 0,5 2 µg de anticuerpo anti-CD3 (38501±6160) y células PLN de ratones que fueron alimentados con 5 µg de anticuerpo anti-CD3 (28900±4578) se redujo significativamente en comparación con las células PLN de ratones no alimentados (p = 0,03 y p = 0,007, respectivamente). Estos resultados indican que la administración oral de anticuerpo anti-CD3 es capaz de efectuar una reducción en la respuesta inflamatoria fuera, así como dentro del sistema inmunitario de la mucosa, como se esperaría para la tolerancia inducida en el intestino, que produce tolerancia sistémica.

Ejemplo 13: Producción de citoquina en células PLN de ratones SJL inmunizados con PLP

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, sobre la producción de la citoquina IL-10 en células PLN de ratones SJL que presentan EAE tras la inmunización con PLP.

5 Se alimentaron ratones SJL con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 50 µg de PLP (139-151) emulsionado con CFA. En el día 10 tras la inmunización, se prepararon células PLN y se estimularon *in vitro* con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3. Se recogió el sobrenadante después de 40 horas y se midió la IL-10 mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 14. Las células PLN de ratones que se habían alimentado con 5 µg de anti-CD3 secretan más IL-10 tras la estimulación *in vitro* con anticuerpo anti-CD3, en comparación con los no alimentados y con los grupos IC ( $p = 0,2$ ).  
10 Esto proporciona evidencia adicional de que la actividad terapéutica del anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, puede estar mediada, al menos en parte, por concentraciones incrementadas de IL-10.

Ejemplo 14: Producción de citoquina en células del bazo de ratones SJL inmunizados con PLP

15 El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto del anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral sobre la producción de la citoquina IL-10 en células del bazo de ratones SJL que presentan EAE tras la inmunización con PLP.

20 Se alimentaron ratones SJL con 0,5, 5 o 50 µg de anticuerpo anti-CD3 o IC durante 5 días. 48 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 50 µg de PLP (139-151) emulsionado con CFA. En el día 10 tras la inmunización, se prepararon células PLN y se estimularon *in vitro* con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3. Se recogió el sobrenadante después de 24 y 40 horas (para IL-2 y IL-10, respectivamente), y se midieron las concentraciones de citoquina mediante ELISA.

25 Estos resultados demuestran que las células de ratones alimentados secretan menos IL-2 (Fig. 15A) y más IL-10 (Fig. 15B), en comparación con ratones IC y no alimentados. Esto proporciona una evidencia adicional de que la actividad terapéutica del anticuerpo anti-CD3 administrado por vía oral, está mediada, al menos en parte, por concentraciones incrementadas de IL-10; las concentraciones reducidas de IL-2 se correlacionan con proliferación reducida y soportan nuevamente la teoría de que el mecanismo implica regulación inmunitaria incrementada y respuesta antiinflamatoria incrementada.

Ejemplo 15: Transferencia adoptiva de tolerancia

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de inyectar ratones receptores con células T aisladas del bazo o de nódulos mesentéricos (MLN) de ratones alimentados con anti-CD3 administrado por vía oral.

30 Se alimentaron ratones SJL con 5 µg de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días. 48 Horas o siete días después del último suministro de alimento, se aislaron células T del bazo o de los nódulos mesentéricos linfáticos (MLN). Las células T se purificaron a partir de la preparación de bazo, usando MicroBeads MACS CD90, 20 x 10<sup>6</sup> células T del bazo, se transfirieron mediante infusión intravenosa a ratones SJL receptores, al mismo tiempo los ratones fueron inmunizados con péptido PLP (139-151), según se describió aquí. La EAE se puntuó según se describió aquí.

35 Los resultados son como sigue, expresados como puntuación acumulada media ± STD. MLN de ratones alimentados se transfirieron 24 horas después del último suministro de alimento: 4 ± 3,88 ( $p = 0,012$ ); MLN de ratones no alimentados: 20,1 ± 1,2; células T del bazo de ratones alimentados transferidas 1 semana después del último suministro de alimento: 4,93 ± 3,07 ( $p = 0,027$ ); células T de ratones no alimentados: 10,42 ± 2,2. Estos resultados demuestran que el anticuerpo anti-CD3 oral induce las células T reguladoras, que pueden transferir adoptivamente protección frente a EAE *in vivo*; esta protección se puede transferir desde un ratón alimentado con anticuerpo anti-CD3 hasta un ratón receptor naïve.  
40

Ejemplo 16: Efecto de la administración de anticuerpo anti-CD3 antes o después de la inducción de EAE

45 El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto sobre la evolución clínica de EAE de la sincronización de la administración oral del anticuerpo anti-CD3, es decir, antes y después de la inducción de EAE mediante inmunización de ratones SJL con un péptido derivado de PLP.

50 Se alimentaron ratones SJL con 5 µg de anticuerpo anti-CD3 durante 5 días, antes de la inmunización (días -7 a -2) y en el máximo de la enfermedad (días 13-17 posinmunización). 24 Horas después del último suministro de alimento, los ratones fueron inmunizados con 50 µg de PLP (139-151) emulsionado con CFA. Se puntuó la EAE como sigue: 0, ausencia de enfermedad; 1, cola lacia; 2, debilidad de la extremidad posterior; 3, parálisis de la extremidad posterior; 4, parálisis de la extremidad posterior y anterior; 5, moribundo. Los resultados se muestran en la Figura 6. El análisis estadístico se realizó utilizando la puntuación media acumulada ± SEM.

Los resultados se ilustran en las Figuras 17A-C. Todos los ratones que fueron alimentados antes de la inducción de EAE mostraron una inhibición significativa de la enfermedad, en comparación con el grupo IC (alimentado con 0,5 µg de anti-CD3  $p = 0,055$ ; alimentados con 5 µg de anti-CD3  $p = 0,016$ ; alimentados con 50 µg de anti-CD3  $p = 0,03$ ).

Los ratones que fueron alimentados con 5 µg de anti-CD3 en el máximo de la enfermedad (días 13-17), mostraban una inhibición significativa de la enfermedad, en comparación con el grupo alimentado con IC antes de la inmunización con el péptido (días -7 a -2) y en el máximo (días 13-17; Fig. 17B, p = 0,03; p = 0,016, respectivamente). Estos resultados indican que la administración de anticuerpo anti-CD3 por vía oral tras la aparición de la EAE también es efectiva a ciertas dosis.

5

Ejemplo 17: Efecto de la administración oral de anticuerpo anti-CD3 sobre el desarrollo de la diabetes

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de alimentar ratones NOD recién nacidos con 0,5 o 5 µg de anticuerpo anti-CD3 (aCD3), o control de isotipo apareado (IC), sobre el desarrollo posterior de diabetes espontánea.

10 Se alimentaron ratones NOD empezando 24 horas después del nacimiento, como sigue:

Tabla 1: ratones NOD alimentados como recién nacidos

<u>Grupo (n)</u>	<u>Primer suministro de alimentos</u> (5 veces, empezando 24 h después del nacimiento y una vez por semana)	<u>A las tres semanas de edad</u> (una vez por semana)
<u>1 (11)</u>	0,05 microgramos/ratón de aCD3	0,5 microgramos/ratón de aCD3
<u>2 (17)</u>	0,5 microgramos/ratón de aCD3	5 microgramos/ratón de aCD3
<u>3 (11)</u>	0,05 microgramos/ratón de IC	0,5 microgramos/ratón de IC

La diabetes se valoró mediante tiras colorimétricas para controlar la glicosuria. Los resultados de este estudio, ilustrados en la Figura 18, demuestran que no sólo la administración oral de anticuerpo anti-CD3 producía aparentemente una aparición retrasada, sino que la aparición de diabetes se reducía sustancialmente.

15 Se evaluó el efecto de alimentar ratones NOD con 0,5 µg de alimentación con anti-CD3 o 5 µg de alimentación con anti-CD3 en las semanas 12 a 33, sobre la diabetes espontánea. Se comprobó que ambos tratamientos eran significativamente mejores que el control IC, en la prevención del desarrollo de la diabetes; se realizó un análisis estadístico usando el test de Student, con valor p desapareado y dos colas. La administración oral de 0,5 µg de anti-CD3 tiene un valor p de 0,0002, y la alimentación con 5 µg de anti-CD3 tiene un valor p de 0,0001, todo comparado con el grupo de control de IC (0,5).

20

Ejemplo 18: Efecto de la administración oral y nasal de fragmentos que se unen a antígeno del anticuerpo anti-CD3 sobre la evolución clínica de la EAE

El estudio descrito en este ejemplo examinó el efecto de administrar por vía oral o nasal fragmentos que se unen a antígeno de anticuerpos anti-CD3 sobre el desarrollo posterior de encefalomiélitis autoinmunitaria experimental.

25 En resumen, ratones SJL hembra de 6-8 semanas de edad se alimentaron, bien con 200 µg/ratón a diario o se les administraron 10 µg/ratón de F(ab)'2 derivado del anticuerpo anti-CD3, en días alternos, o del control de isotipo apareado (IC; IgG de hamster), durante 5 días, empezando una semana antes de la inducción de EAE. El régimen de alimentación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Régimen de alimentación	d-6	d-5	d-4	d-3	d-2
Control de PBS	+	+	+	+	+
IC oral; 5 µg	+	+	+	+	+
IC oral; 50 µg	+	+	+	+	+
F(ab)'2 αCD3 oral; 5 µg	+	+	+	+	+
F(ab)'2 αCD3 oral; 50 µg	+	+	+	+	+
F(ab)'2 αCD3 nasal; 0,1 µg	+		+		+
F(ab)'2 αCD3 nasal; 0,5 µg	+		+		+

30 Se indujo EAE inmunizando a los ratones en el día 0 con PLP139-151, 75 µg/ratón; MTb, 400 µg/ratón; emulsión 200 µg/ratón; (PBS + péptido), mezclados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund; y toxina de Pertussis (PT), 150 ng/ratón. PT se administró de nuevo en el día +2, i.p.

Los resultados se muestran en la Figura 19, y demuestran que  $F(ab')_2$  administrado por vía oral (5 µg) y por vía nasal (0,5 µg), ambos reducían sustancialmente la gravedad total y retrasaban el tiempo de aparición de la EAE. Los efectos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ), IC oral frente a Fab oral  $p = 0,002$ ; Fab nasal (0,5) frente a IC oral = 0,005; Fab nasal (0,5) frente a PBS = 0,03; Fab nasal (0,5) frente a PBS frente a IC oral  $p = 0,03$ . Estos resultados indican que los fragmentos de anticuerpos anti-CD3 que se unen a anticuerpos, administrados por vía oral y nasal, son efectivos para tratar EAE, un modelo experimental de esclerosis múltiple.

Ejemplo 19: Efecto de  $F(ab')_2$  de anti-CD3 administrado por vía oral en un modelo de diabetes inducido por estreptozotocina

Para determinar el efecto de  $F(ab')_2$  de anti-CD3 administrado por vía oral sobre la diabetes, se trataron ratones silvestres normales AKR (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) con estreptozotocina (STZ), que se ha demostrado que induce la diabetes en estos ratones. Se ha demostrado que el anticuerpo anti-CD3 administrado parenteralmente es efectivo en estos ratones, véase Herold et al., Diabetes. 1992 Mar;41(3):385-91.

En resumen, se colocaron ratones AKR de 6-8 semanas de edad en uno de cuatro grupos como sigue:

Grupo 1. No tratados (n=4);

Grupo 2. PBS oral + STZ i.p. (40 mg/kg) (n = 12), administrado una vez al día durante 5 días para 5 dosis en total;

Grupo 3. IC oral (50 µg/0,2 ml/ratón) + STZ i.p. (40 mg/kg) (n = 12), administrado una vez al día durante 5 días para 5 dosis en total;

Grupo 4.  $F(ab')_2$  de anti-CD3 (50 µg/0,2 ml/ratón) + STZ i.p. (40 mg/kg) (n = 12), administrado una vez al día durante 5 días para 5 dosis en total;

Se administraron ensayos de tolerancia a glucosa mediante medición de glucosa sanguínea, 30 minutos después de la inyección i.p. de glucosa al 20%/ratón en los días 7, 14, 21 y 28. Los ratones con lecturas de glucosa sanguínea > 250 mg/dl se diagnosticaron como diabéticos.

Los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21.  $F(ab')_2$  de anti-CD3 administrado por vía oral fue efectivo para reducir la incidencia de la diabetes inducida por STZ en estos ratones, y también en retrasar la aparición de la diabetes.

Ejemplo 20: Efecto de la administración vía mucosa de anticuerpo anti-CD3 sobre artritis inducida por colágeno (CIA)

Para evaluar el efecto de anticuerpos anti-CD3 administrados por vía oral sobre la artritis autoinmunitaria/reumatoide (RA), se usó un modelo animal inducido por colágeno. Este modelo animal de artritis es un modelo autoinmunitario que se parece, en muchos aspectos, a RA, según se describe en Myers et al., Life Sci. 61(19):1861-78 (1997). En este estudio se usaron ratones macho DBA/1 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), a las 6-8 semanas de edad.

Los ratones se trataron con  $F(ab')_2$  de anti-CD3 (Bio-express), o  $F(ab')_2$  de control de isotipo (IC) (JAX Inmunoresearch, Bar Harbor, ME). Los ratones fueron alimentados (5 µg/suministro de alimento, 5 veces en días consecutivos), o tratados por vía nasal (0,5 µg/tratamiento, 3 veces en días alternos) con anticuerpos anti-CD3 (CLON 2cii) o preparación de  $F(ab')_2$ , PBS, anticuerpo de control de isotipo o  $F(ab')_2$  de control de isotipo (IC). Cada grupo de control o tratamiento contenía 10 ratones.

Dos días después del último tratamiento, los ratones se inmunizaron intradérmicamente en 5 sitios en la base de la cola con 100 µg de colágeno soluble de tipo II, emulsionado con adyuvante de Freund completo (Difco Labs) que contenía 50 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA).

Tres semanas más tardes, se les proporcionó a los ratones una dosis de refuerzo de 100 µg de colágeno soluble de tipo II, mediante inyección intraperitoneal (I.P.).

Empezando una semana después del refuerzo, los ratones se observaron dos veces a la semana para la presencia de inflamación de las articulaciones distales y eritema. Típicamente, los ratones empiezan a mostrar los primeros síntomas una semana después del recuerdo y la gravedad de la enfermedad continúa exacerbándose durante más de 80 días. Cada extremidad se puntuó sobre una escala de 0 a 4, como sigue:

- 0- ausencia de artritis
- 1- eritema e hinchazón leve del tarso
- 2- eritema moderato e hinchazón del tarso y los tobillos
- 3- hinchazón grave del tarso y los tobillos
- 4- anquilosis y deformidad ósea

El Índice Artrítico Máximo (MAI) para cada ratón, se obtiene sumando la puntuación más alta recogida para cada extremidad (0 = sin enfermedad, siendo 16 la mayor puntuación posible). El MAI para cada grupo se calculó según el MAI medio.

5 Los resultados se muestran en las Figuras 22A-C. Los ratones alimentados o tratados por vía nasal con F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 antes de la inducción de CIA, tenían una puntuación de enfermedad significativamente más baja, en comparación, bien con el control (ratones tratados con PBS) o con ratones tratados con control de isotipo (Figs. 22A y 22C). Estos resultados indican que el F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 administrado por vía nasal generaba una respuesta mejor que la preparación de F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 administrada por vía oral (Figs. 22A y 22C). Los ratones tratados por vía nasal con F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 puntuaban significativamente más bajo (menos artritis), que los ratones tratados con colágeno (tratamiento oral con colágeno), aunque ambos mostraban puntuaciones más bajas que los ratones control tratados (Fig. 22B).

Estos resultados demuestran que F(ab')<sub>2</sub> de anti-CD3 administrados por vía nasal y oral son efectivos en un modelo *in vivo* de artritis autoinmunitaria.

15 Ejemplo 21: Las células LAP+ en MLN y en las placas de Peyer, se incrementan tras alimentación con IgG completa de anti-CD3 oral

20 El péptido asociado a latencia (LAP) está asociado con la secreción de TGFβ funcional. Las células LAP+ son reguladoras y secretan TGFβ (Oida et al., J. Immunol. 170(5):2516-22 (2003)). Se ha demostrado que estas células tienen un efecto regulador inmunitario en seres humanos ( Nakamura et al., J. Immunol. 172(2):834-42 (2004)), y son importantes para la supresión de la enfermedad inflamatoria ( La Cava et al., J. Immunol. 173(5):3542-8 (2004) ); Ostroukhova, J. Clin. Invest. 114:28 (2004)). Los experimentos descritos en este ejemplo demuestran el efecto de anti-CD3 oral sobre las células LAP+.

Se alimentaron ratones con 5 µg de Ab anti-CD3 o control de isotipo durante 5 días consecutivos. 24 Horas después del último suministro de alimento, se tiñeron células preparadas recientemente y se analizaron mediante citometría de flujo.

Tabla 3	PBS	Control de isotipo	Anti-CD3
<b>Bazo</b>			
%CD3 frente a linfocitos	42,6 ± 5,7	44,7 ± 6,0	43,0 ± 6,5
% de células CD25+CD4+ entre células CD4+	13,1 ± 1,6	12,6 ± 1,9	14,1 ± 2,3
% de células LAP+ entre células CD3+	8,7 ± 1,1	8,3 ± 0,9	9,9 ± 1,5
% de células LAP+ entre células CD4+	4,7 ± 0,6	5,1 ± 0,8	6,3 ± 1,6**, #
<b>LN mesentéricos</b>			
%CD3 entre linfocitos	76,2 ± 3,4	79,0 ± 2,6	78,5 ± 3,3
% de células CD25+CD4+ entre células CD4+	11,5 ± 1,7	10,6 ± 1,3	11,0 ± 2,0
% de células LAP+ entre células CD3+	3,0 ± 0,5	3,4 ± 0,5	5,2 ± 2,0**, ##
% de células LAP+ entre células CD4+	2,0 ± 0,5	2,1 ± 0,4	3,4 ± 0,9**, ##
<b>Placa de Peyer</b>			
%CD3 entre linfocitos	39,3 ± 3,4	43,0 ± 6,4	39,6 ± 5,0
% de células CD25+CD4+ entre células CD4+	14,0 ± 1,8	13,1 ± 2,1	15,4 ± 3,2
% de células LAP+ entre células CD4+	8,6 ± 1,0	8,8 ± 1,5	11,1 ± 2,4*, #
% de células LAP+ entre células CD3+	3,7 ± 0,7	3,4 ± 0,8	4,6 ± 1,4*, ##
% de células LAP+ entre células CD4+			

---

\*\* p<0,01 en comparación con el grupo alimentado con PBS.

\* p<0,05 en comparación con el grupo alimentado con PBS.

## p<0,01 en comparación con el grupo alimentado con isotipo control.

# p<0,05 en comparación con el grupo alimentado con isotipo control.

---

Estos resultados demuestran que la alimentación con anticuerpo anti-CD3 incrementa las células reguladoras, que suprimen la enfermedad. El incremento de estas células LAP+ se puede usar para medir el efecto inmunológico de la administración de anti-CD3, por tanto, un incremento en células LAP+ en el torrente sanguíneo se puede usar para detectar el efecto terapéutico de la administración por vía oral o mucosa del anticuerpo anti-CD3.

5 Ejemplo 22: Producción de citoquina a partir de células T LAP+ y LAP- antes y después de la administración de anti-CD3 oral

Para evaluar el efecto del anti-CD3 oral sobre la producción de citoquina, se alimentaron ratones con 5 µg de anti-CD3 o Ab de control de isotipo durante 5 días consecutivos. 24 Horas después del último suministro de alimento, se prepararon células T LAP+ y LAP- y se estimularon con anti-CD3 unido a placa (recubieron a razón de 10 µg/ml).

10 Los resultados, mostrados en las Figuras 23-A-D, en combinación con los resultados analizados en el Ejemplo 21, demuestran que la administración de anticuerpos anti-CD3 produce un incremento de células LAP+, que origina un incremento de TGF-β y secreción de IL-10. Por tanto, el suministro de anticuerpo anti-CD3 incrementa las poblaciones de células reguladoras supresoras de enfermedad. El incremento en estas células LAP+, y el  
 15 incremento en la producción de TGF-β e IL-10, se puede usar para medir el efecto inmunológico de la administración de anti-CD3 y, por tanto, para detectar y evaluar el efecto terapéutico de la administración de anticuerpo anti-CD3 por vía oral o mucosa.

Ejemplo 23: Actividad supresora *in vitro* de células LAP+ y administración oral de anticuerpo anti-CD3

20 Para evaluar el efecto sobre la actividad supresora *in vitro* de las células LAP+ tras la administración oral de anticuerpo anti-CD3, se alimentaron los ratones con 5 mg de Ab anti-CD3 o control de isotipo durante 5 días consecutivos. 24 Horas después del último suministro de alimento, se prepararon las células T LAP+ y se examinó su actividad supresora en cultivos de células respondedoras CD4+CD25-, estimulados con anti-CD3 soluble (1mg/ml) más APC empobrecido en T de ratones naive.

Los resultados, mostrados en la Figura 24, ilustran que la actividad supresora *in vitro* de las células LAP+ se mejoró tras la administración.

25 Ejemplo 24: Efecto de LAP recombinante en la actividad supresora *in vitro* de células LAP+

Para evaluar el efecto sobre la actividad supresora *in vitro* de células LAP+, se cultivaron conjuntamente células T LAP+ de ratones alimentados con células LAP CD4+C25- de ratones naive, con o sin 10 mg/ml de LAP recombinante. Los resultados, mostrados en la Figura 25, demuestran que la actividad supresora *in vitro* de células T LAP+ de ratones alimentados se revertía parcialmente mediante LAP recombinante.

30 Ejemplo 25: Transferencia adoptiva de células T de nódulos linfáticos mesentéricos

Para determinar si los efectos protectores de la administración de anti-CD3 oral se podían transferir adoptivamente, se alimentaron ratones SJL/J donadores con 5 mg de Ab anti-CD3 o de control de isotipo durante 5 días consecutivos. Sus nódulos linfáticos mesentéricos se eliminaron 48 horas después del último suministro de alimento, y se inyectaron intravenosamente células T purificadas o células T empobrecidas en LAP, a ratones SJ/J naive. Los  
 35 ratones receptores se inmunizaron con 50 mg de PLP139-151 en CFA, para inducir EAE. Los resultados, mostrados en la Figura 26, demuestran que los efectos de la administración oral, se pueden transferir adoptivamente mediante trasplante de células LAP+ de ratones alimentados.

Ejemplo 26: La neutralización de TGF-β invirtió la inhibición de la enfermedad tras la administración oral de anti-CD3

40 Para evaluar un posible mecanismo mediante el cual se podría producir el efecto inhibitorio de enfermedad del anticuerpo anti-CD3, se alimentaron ratones con 5 mg de Ab anti-CD3 o de control de isotipo durante 5 días consecutivos, y se inmunizaron con 50 mg de PLF139-151 en CFA. 48 Horas después del último suministro de alimento, para inducir EAE. En combinación con el alimento, se les inyectó a los ratones 50 mg de Ab anti-TGF-β o de control de isotipo intraperitonealmente, en los días -1, 1, 3, 5 y 7. Los resultados, mostrados en la figura 27,  
 45 demuestran que la neutralización de TGF-β, invertía la inhibición de la enfermedad que se produce por la administración oral de anti-CD3.

**OTRAS REALIZACIONES**

5 Tiene que entenderse que, aunque la invención se ha descrito conjuntamente con su descripción detallada, la descripción anterior está destinada a ilustrar y no a limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, se pueden administrar los anticuerpos anti-CD3 aquí descritos por vía oral o por otras vías mucosas para dirigirse a células T mucosas específicas o a poblaciones celulares inmunitarias del sistema inmunitario mucoso, y generar células reguladoras o inducir tolerancia para tratar trastornos autoinmunitarios y otros trastornos inflamatorios. Ejemplos incluyen: a) anticuerpos frente a moléculas coestimuladoras que se sabe que están implicadas en la regulación inmunitaria, como CD2, ICOS, CD28, CTLA-4 y PD-1 o sus ligandos; b) anticuerpos frente a moléculas asociadas con células NK-T, como CD94, NKG2; c) anticuerpos frente a moléculas MHC o sus estructuras de reconocimiento como CD4 y CD8; d) moléculas de diferenciación de células T, como moléculas TIM; y e) cualquier anticuerpo o sus combinaciones que pueden, bien 10 inactivar o promover la tolerancia.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Uso de un anticuerpo anti-CD3 capaz de incrementar las concentraciones de células que secretan IL-10 y/o TGF-beta, medidas en sangre periférica, en aproximadamente un 20% o más, o capaces de incrementar la producción de IL-10 y/o TGF-beta por las células T en la sangre periférica, en la fabricación de un medicamento oral para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis reumatoide y rechazo de aloinjerto, o para la fabricación de un tratamiento nasal para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la esclerosis múltiple.
- 10 2.- El uso de la reivindicación 1, en el que la administración de dicho anticuerpo anti-CD3 conduce a un incremento en las concentraciones de células secretoras de IL-10 y/o TGF-beta de un 20%, medido en sangre periférica, o en el que dicha administración de dicho anticuerpo anti-CD3 conduce a un incremento en la producción de IL-10 y/o TGF-beta en la sangre periférica, de aproximadamente 100% o más.
- 15 3.- El uso de la reivindicación 2, en el que la administración de dicho anticuerpo anti-CD3 conduce a un incremento en la producción de IL-10 y/o TGF-beta de aproximadamente 20%, medido en sangre periférica.
- 15 4.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicha administración de dicho anticuerpo anti-CD3 conduce a un incremento en las concentraciones de células secretoras de IL-10 y/o TGF-beta, medido en sangre periférica, de aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.
- 20 5.- El uso de la reivindicación 2, en el que dicha administración de dicho anticuerpo anti-CD3 conduce a un incremento en las concentraciones de células secretoras de IL-10 y/o TGF-beta de aproximadamente 100% o más, en sangre periférica.
- 20 6.- El uso de una reivindicación precedente, en el que el anticuerpo se administra a una dosis diaria de aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 1000 µg/kg.
- 25 7.- El uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo se administra a una dosis diaria de aproximadamente 5, 10, 50, 100 o 500 µg/kg.
- 25 8.- El uso de una reivindicación precedente, en el que el anticuerpo anti-CD3 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico y uno de sus fragmentos inmunológicamente activos.
- 30 9.- El uso de la reivindicación 1, en el que el medicamento oral o nasal está en una forma seleccionada de una forma de dosificación oral líquida y una forma de dosificación oral sólida.
- 30 10.- El uso de la reivindicación 9, en el que la forma de dosificación oral sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, polvos, glóbulos, gránulos, polvo en un saquito, comprimidos con recubrimiento entérico, glóbulos con recubrimiento entérico, polvos encapsulados, glóbulos encapsulados, gránulos encapsulados, y cápsulas de gelatina blanda con recubrimiento entérico.
- 35 11.- El uso de la reivindicación 9, en el que la forma de dosificación oral líquida comprende además un vehículo.
- 35 12.- El uso de la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la diabetes tipo I.
- 35 13.- El uso de la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la esclerosis múltiple.
- 35 14.- El uso de la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico del rechazo de aloinjerto.
- 35 15.- El uso de la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la artritis reumatoide.
- 40 16.- Anticuerpo anti-CD3 capaz de incrementar las concentraciones de células secretoras de IL-10 y/o TGF-beta, medidas en la sangre periférica, en aproximadamente 20% o más, o capaz de incrementar la producción de IL-10 y/o TGF-beta por células T en la sangre periférica, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, diabetes tipo I, rechazo de aloinjerto, y artritis reumatoide, en el que dicho anticuerpo se administra por vía oral, o para el tratamiento de la esclerosis múltiple, en el que dicho anticuerpo se administra por vía nasal.

Figura 1

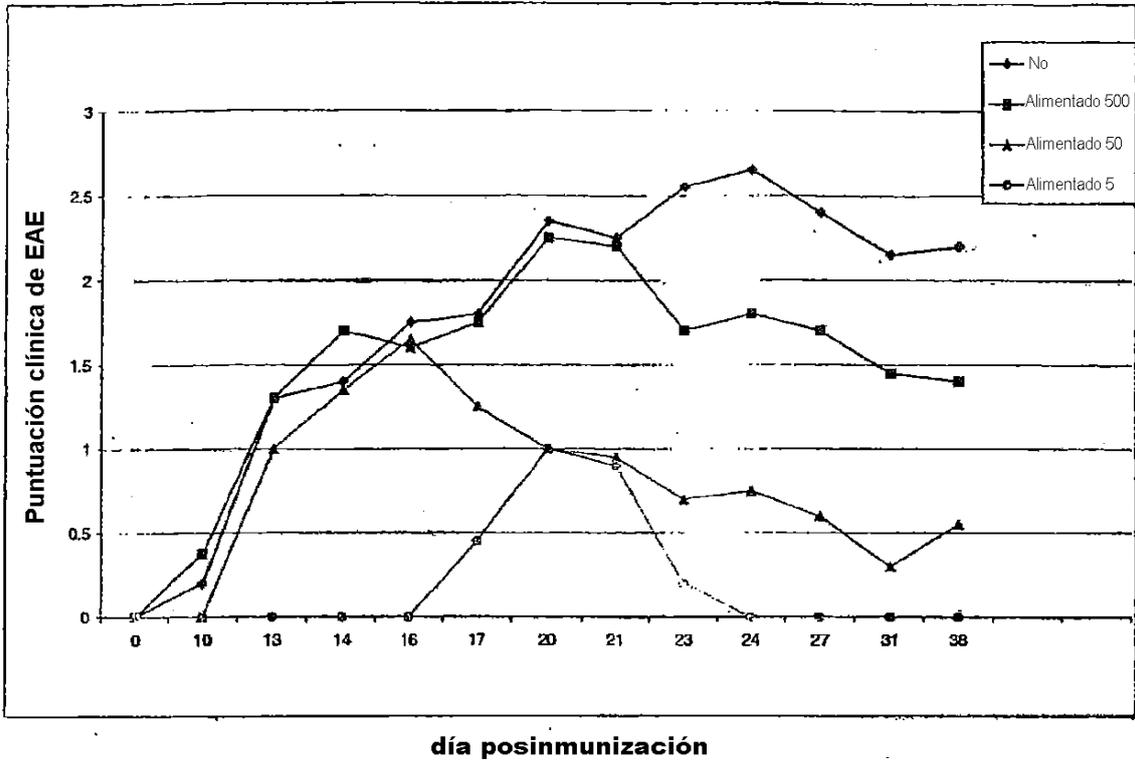
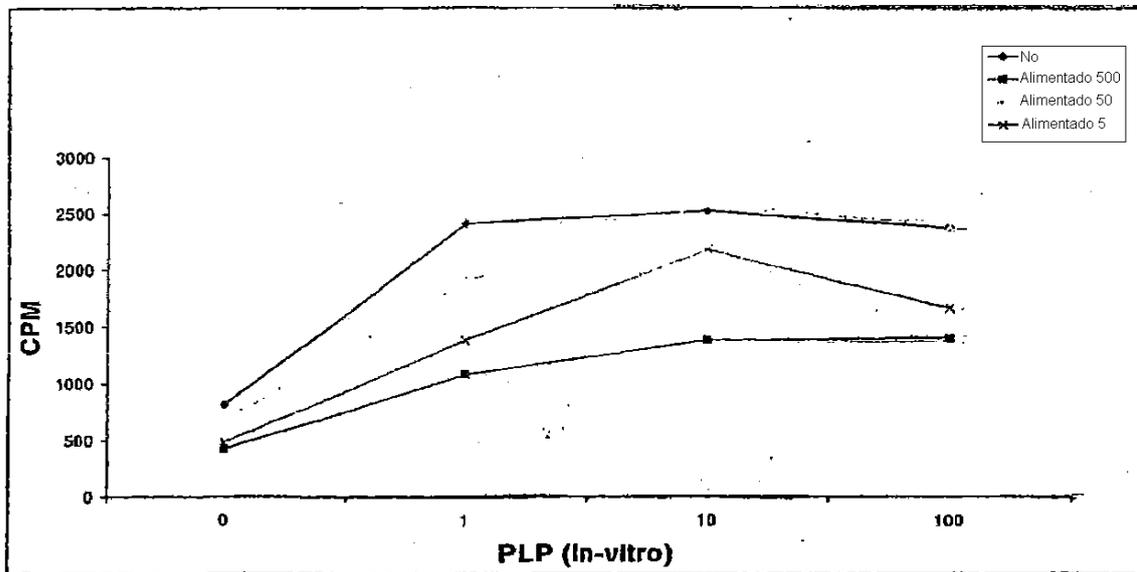


Figura 2



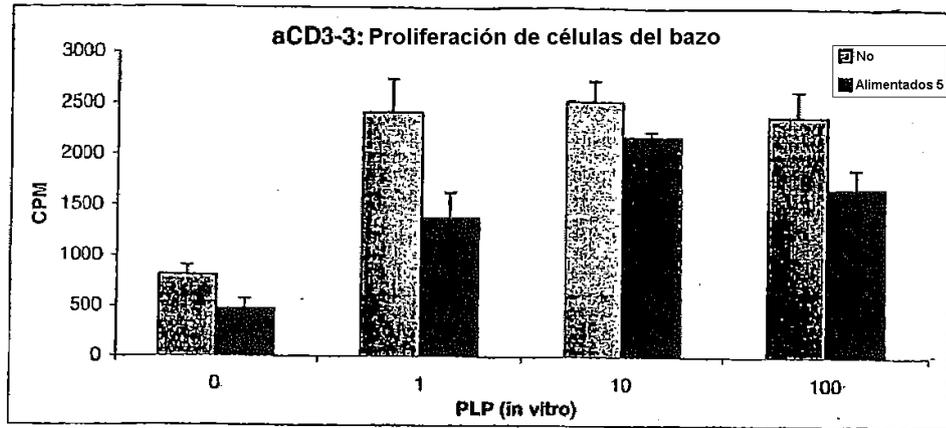


Figura 3

Figura 4

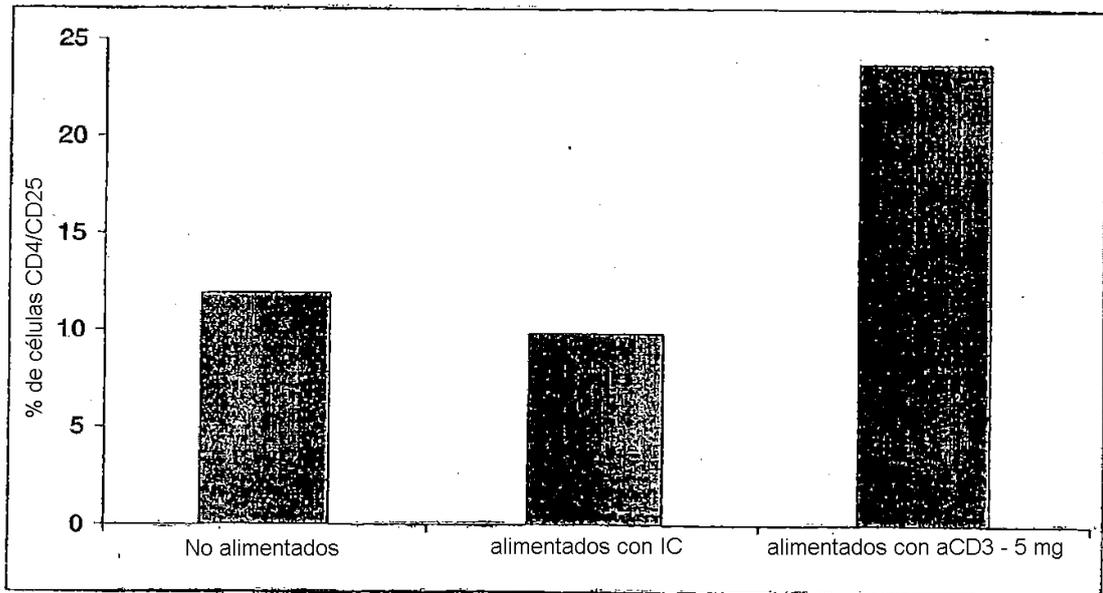


Figura 5A

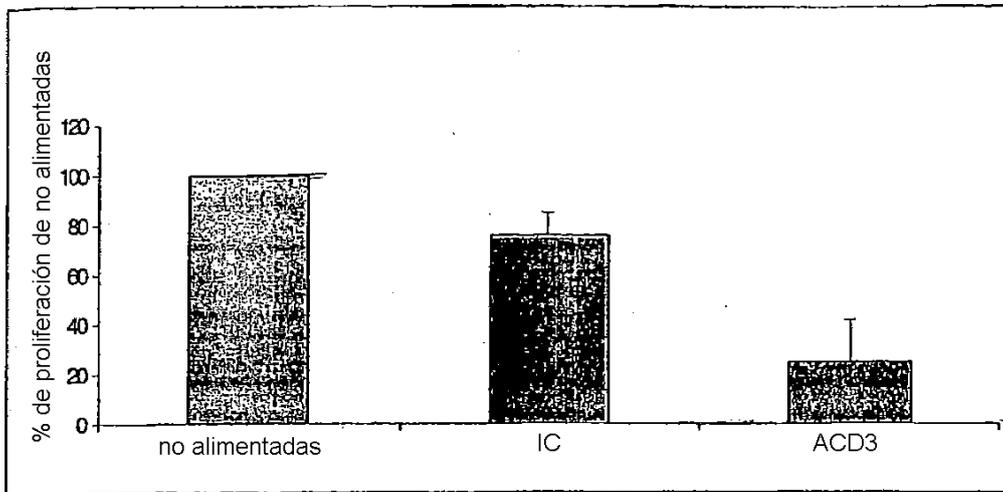


Figura 5B

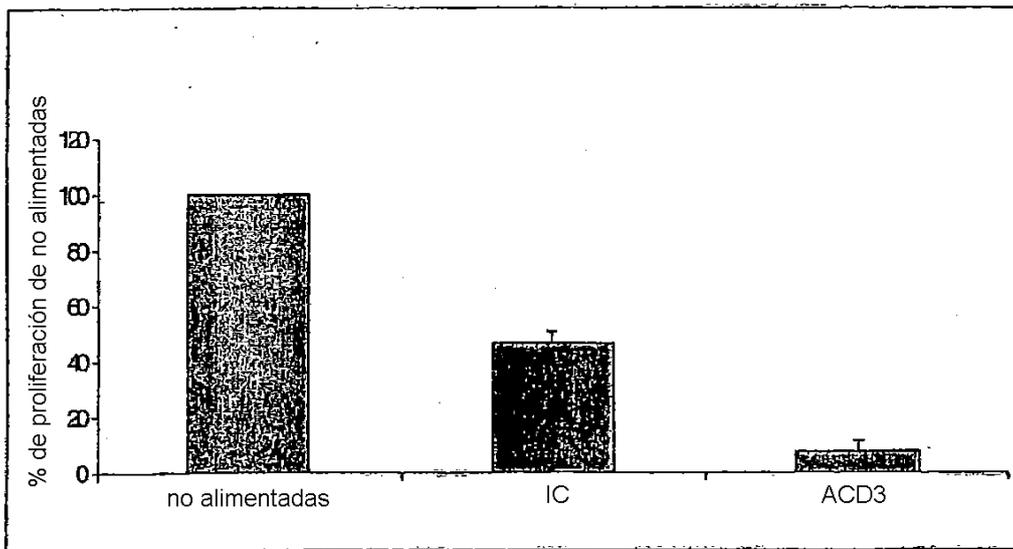


Figura 6

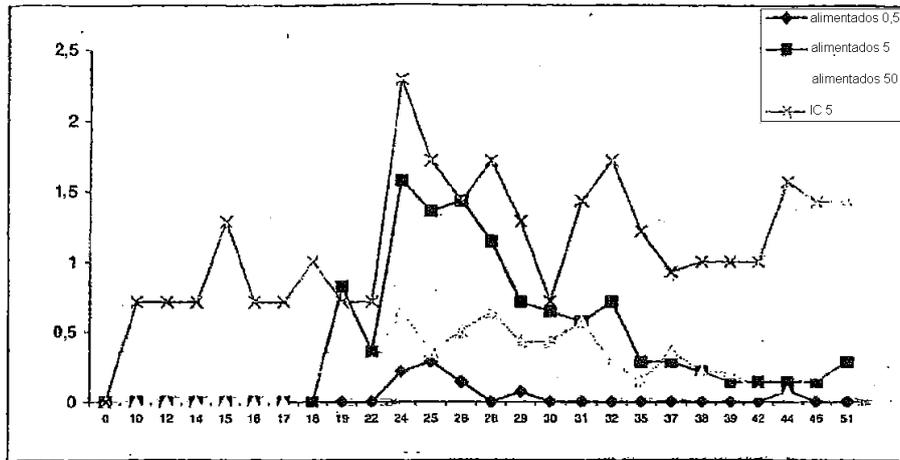


Figura 7

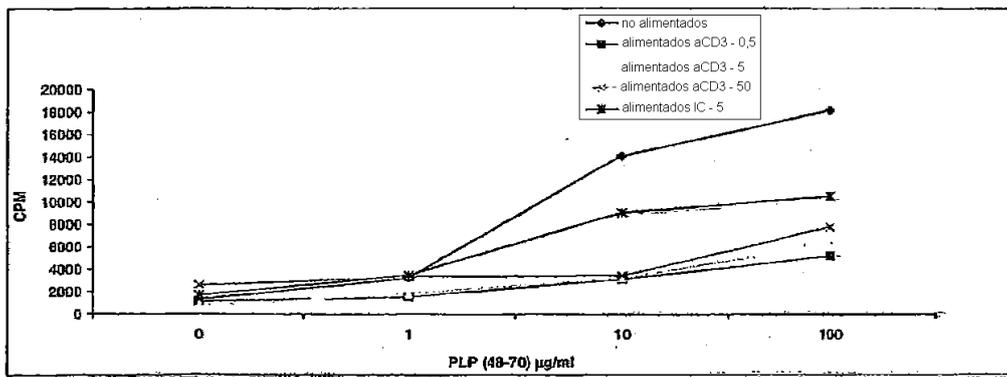


Figura 8

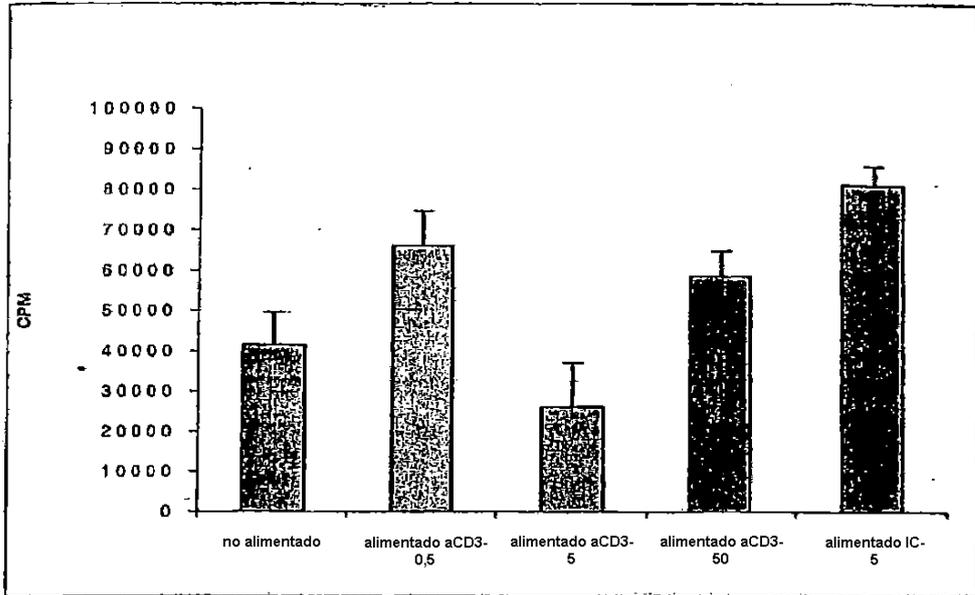


Figura 9

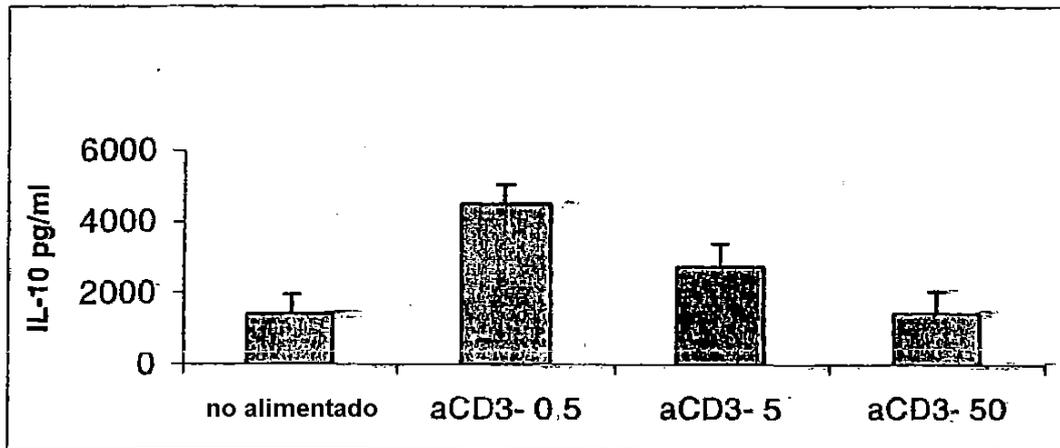


Figura 10A

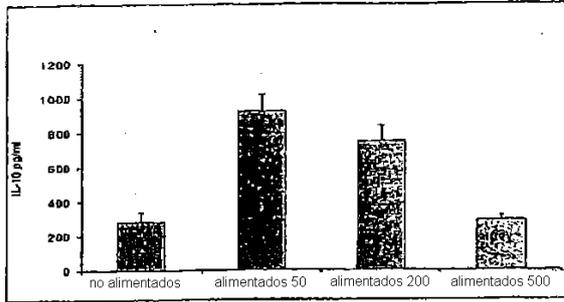


Figura 10B

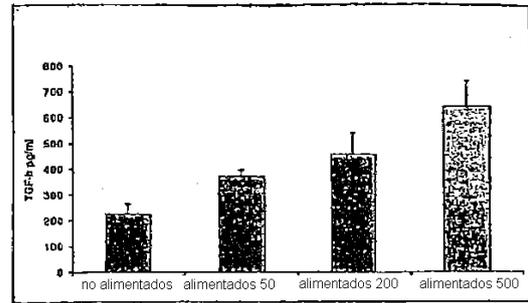


Figura 11

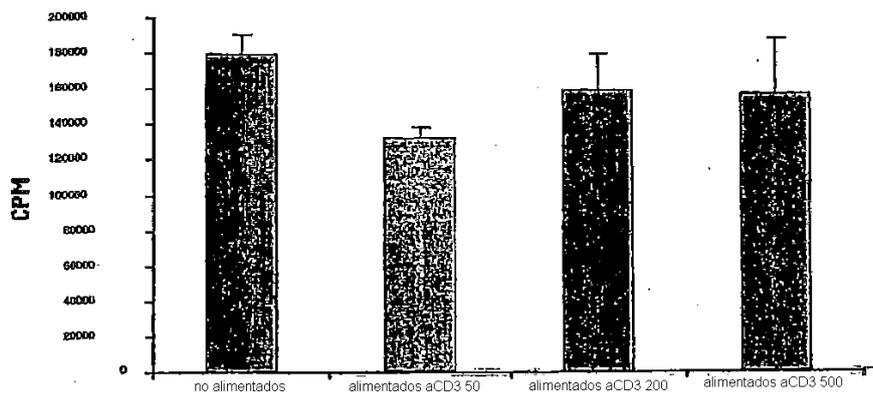


Figura 12

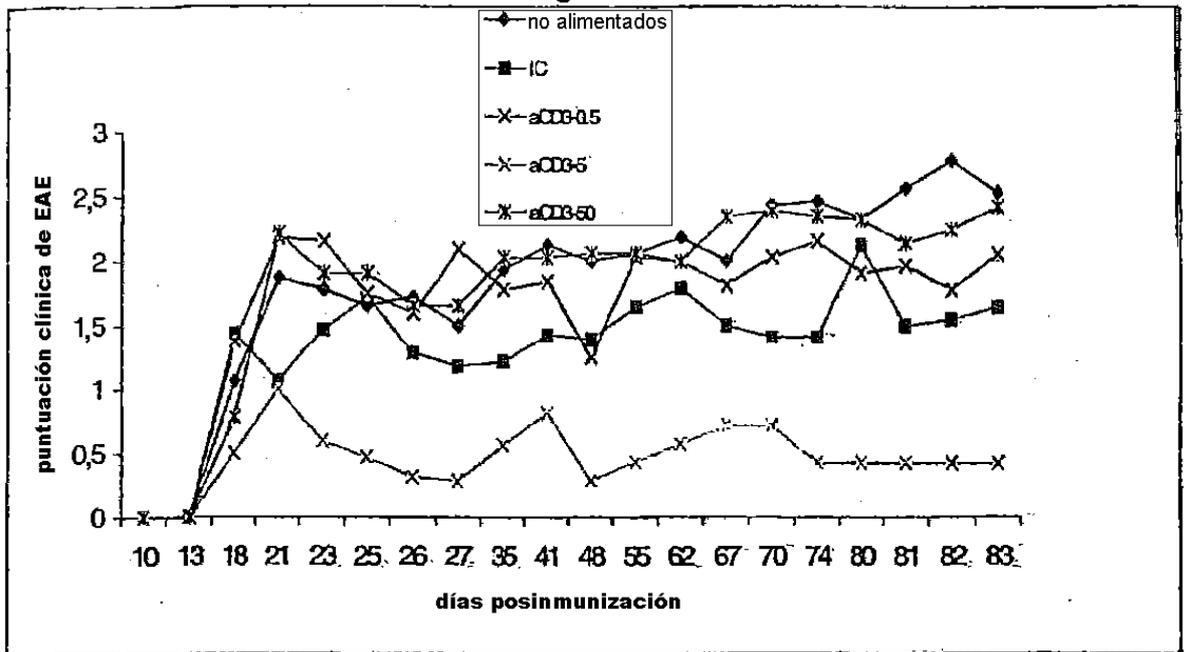


Figura 13A

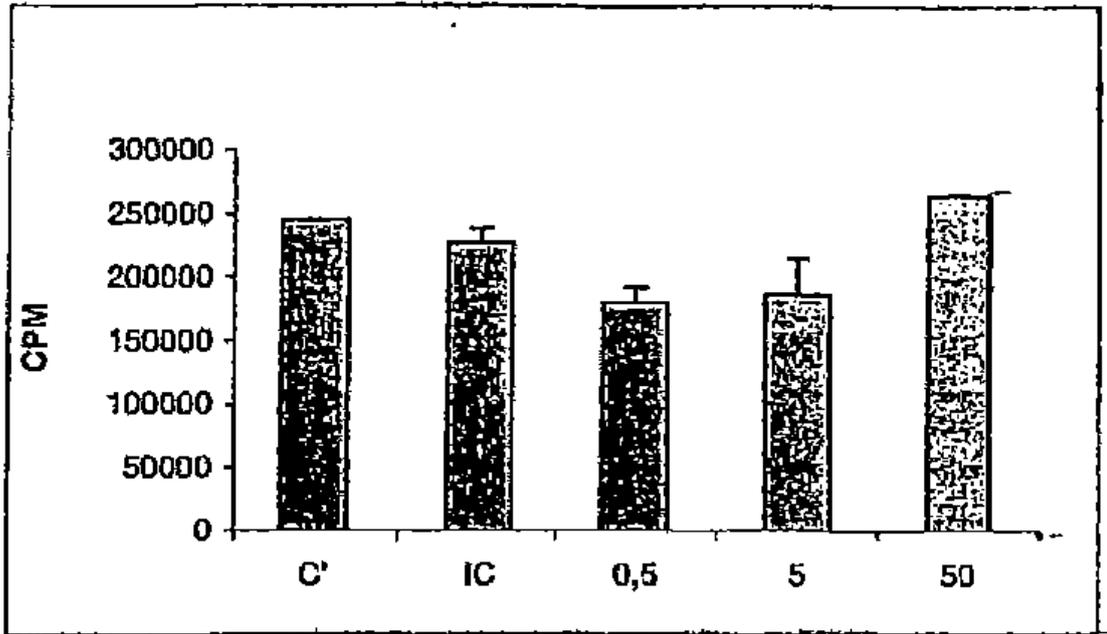


Figura 13B

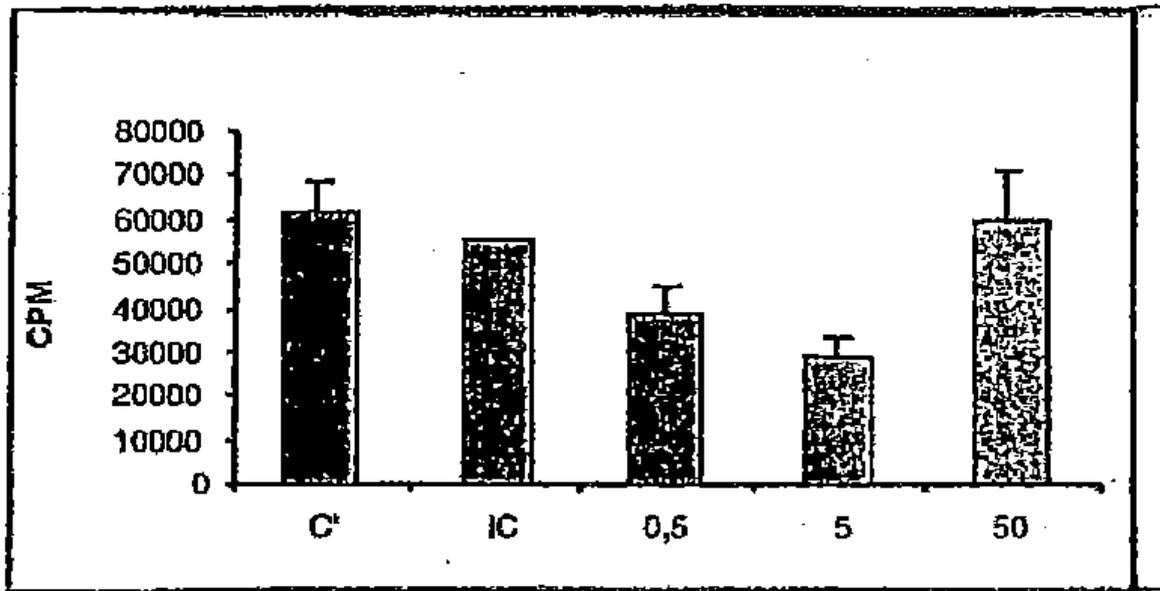


Figura 14

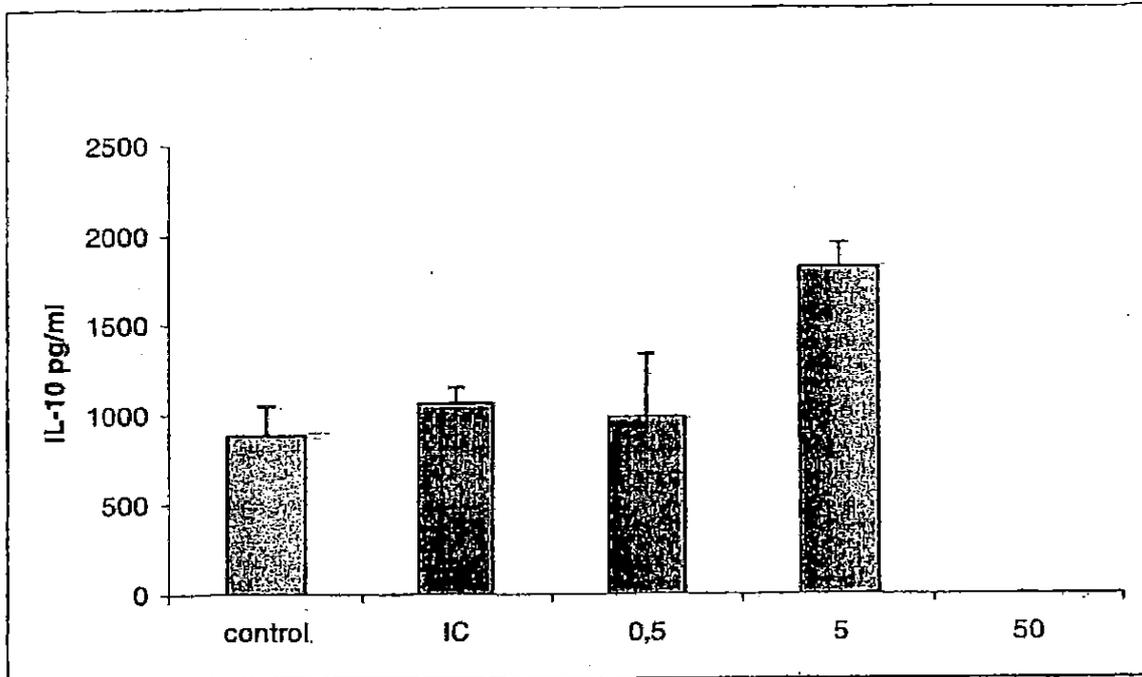


Figura 15A

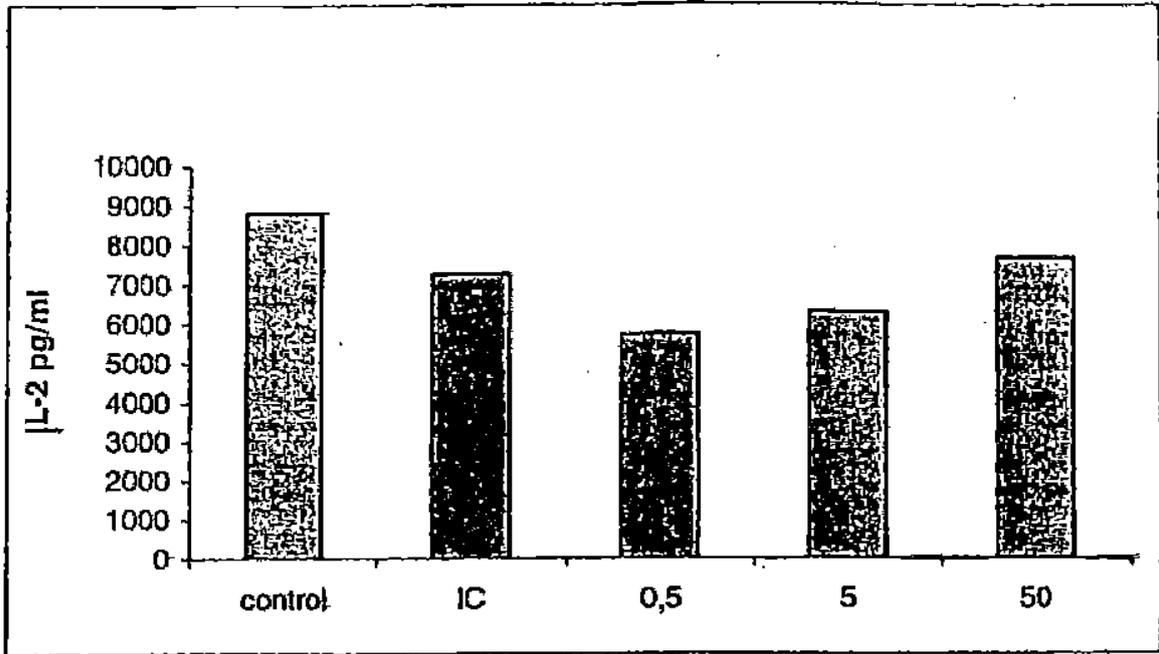


Figura 15B

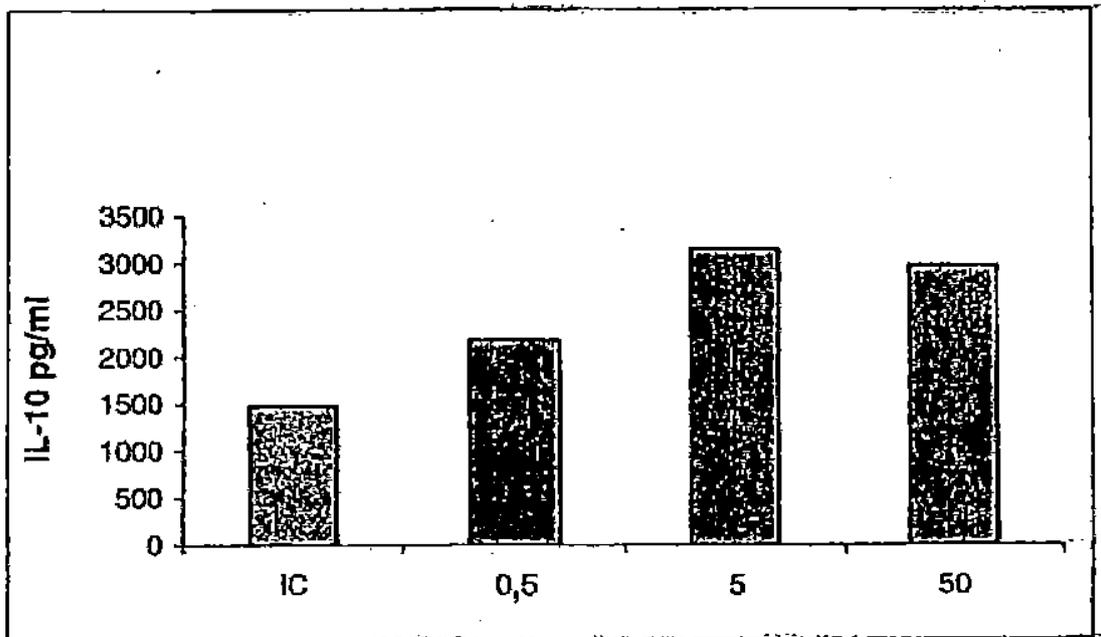


Figura 16A

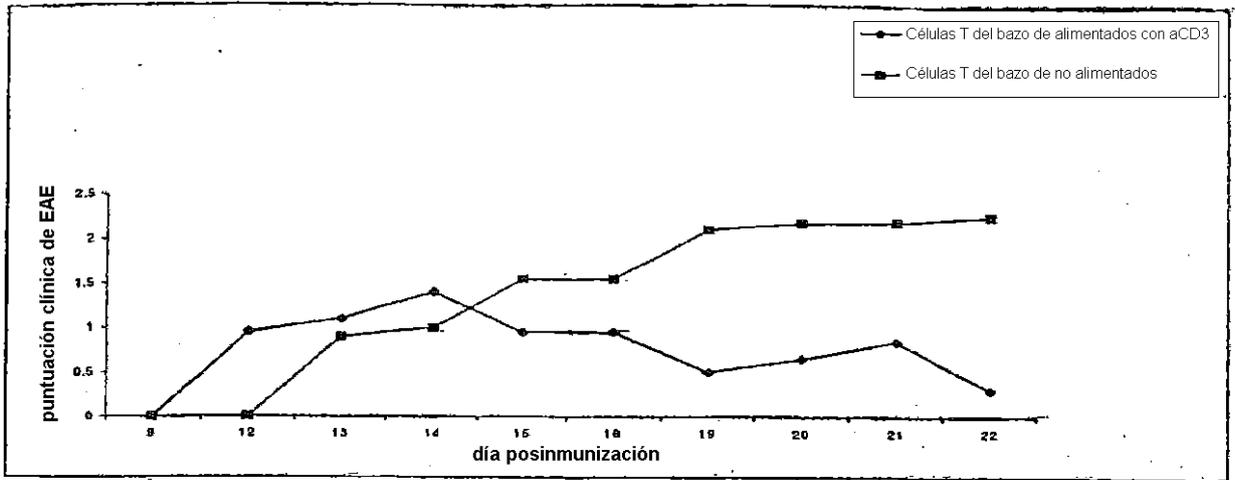


Figura 16B

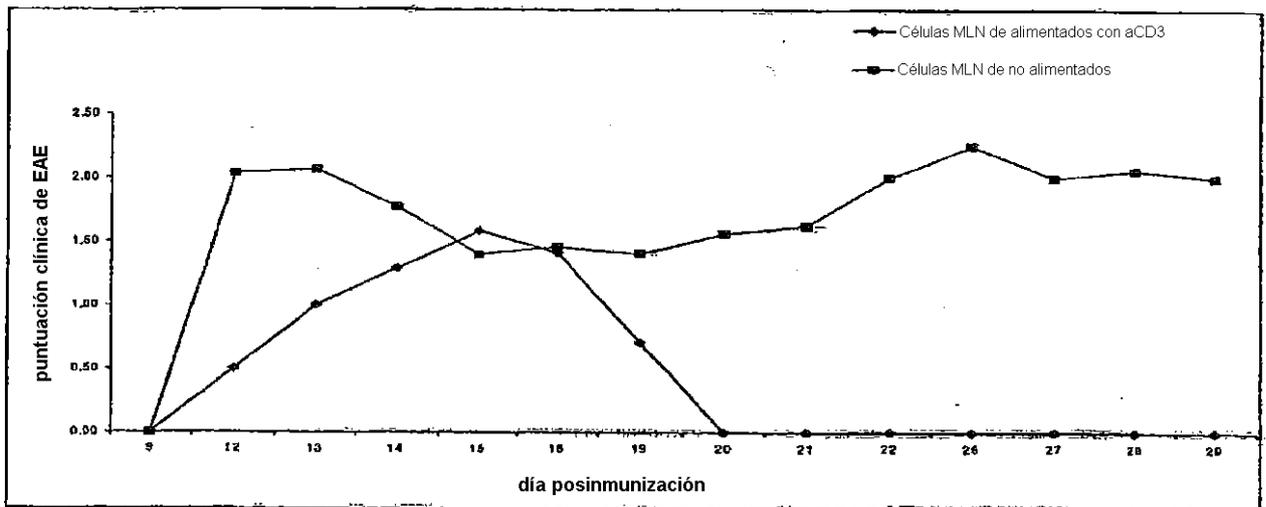


Figura 17A

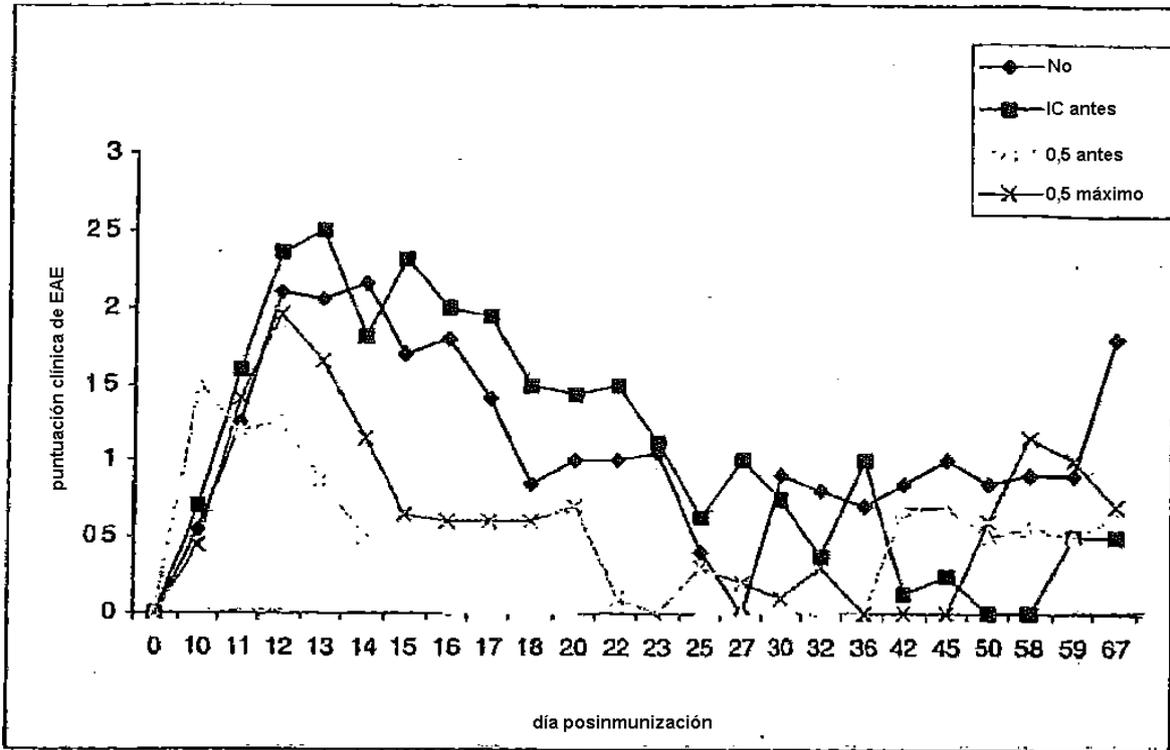


Figura 17B

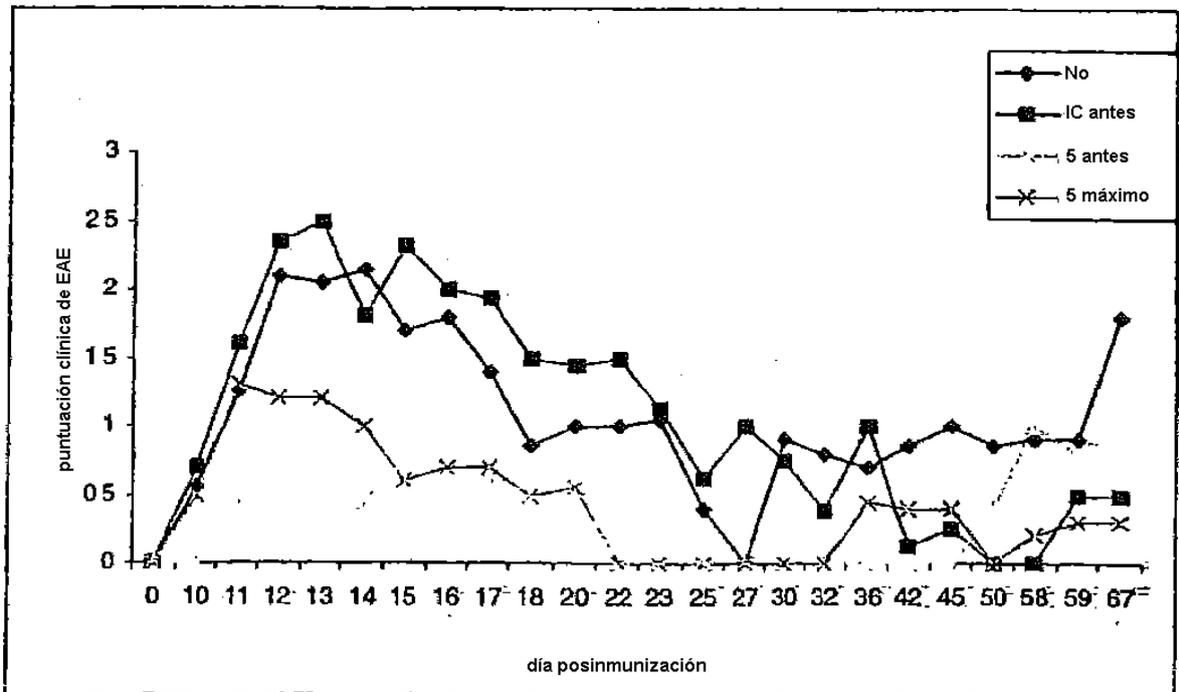


Figura 17C

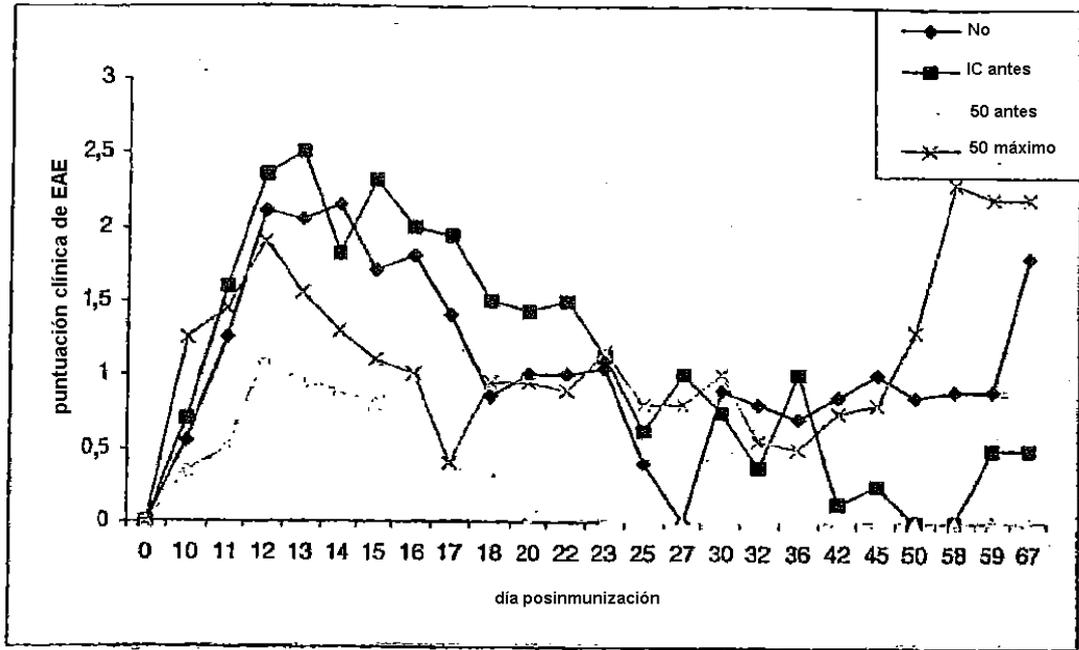


Figura 18

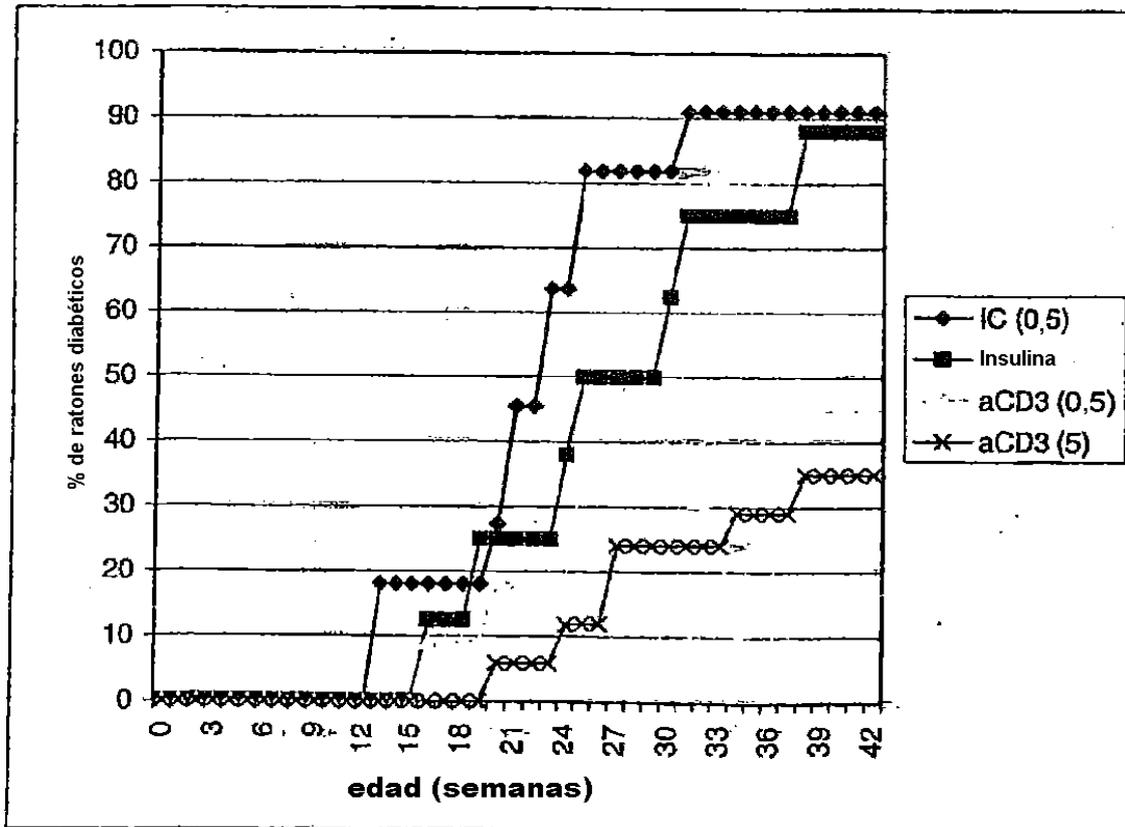


Figura 19

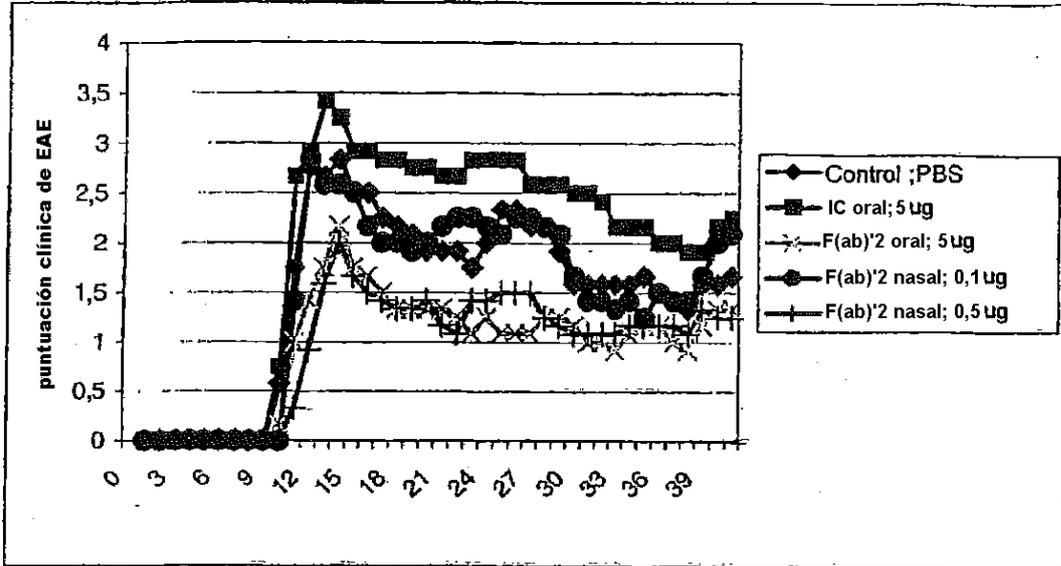


Figura 20

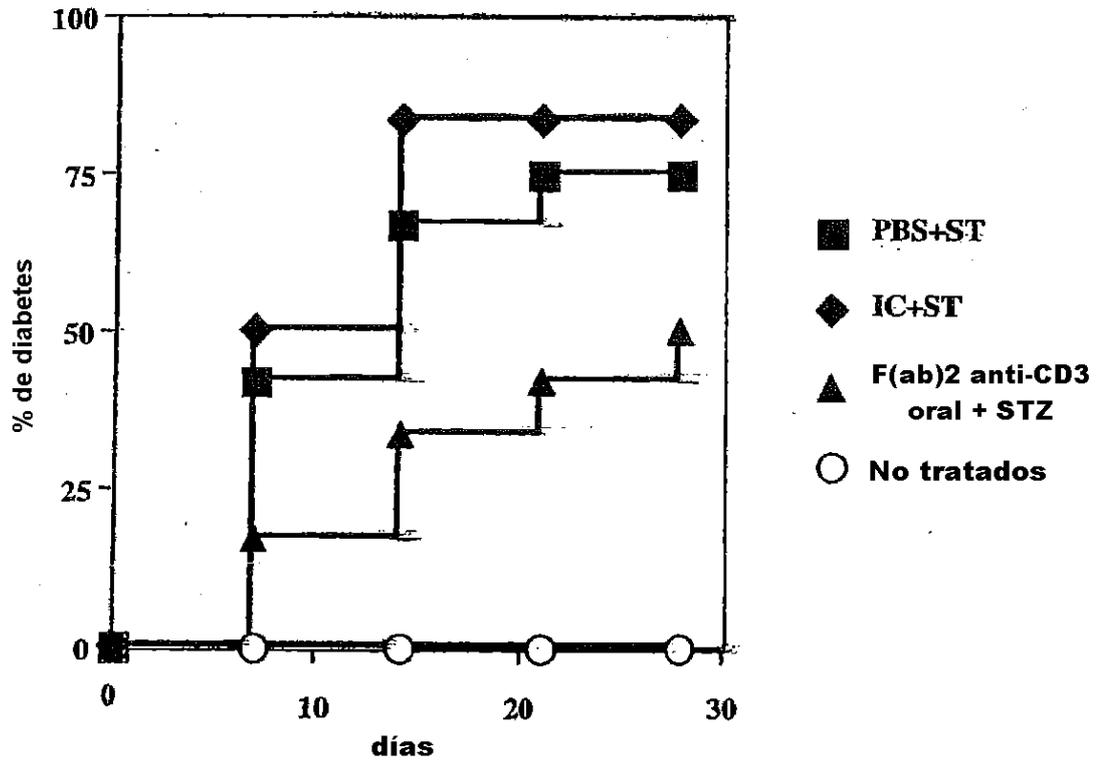


Figura 21

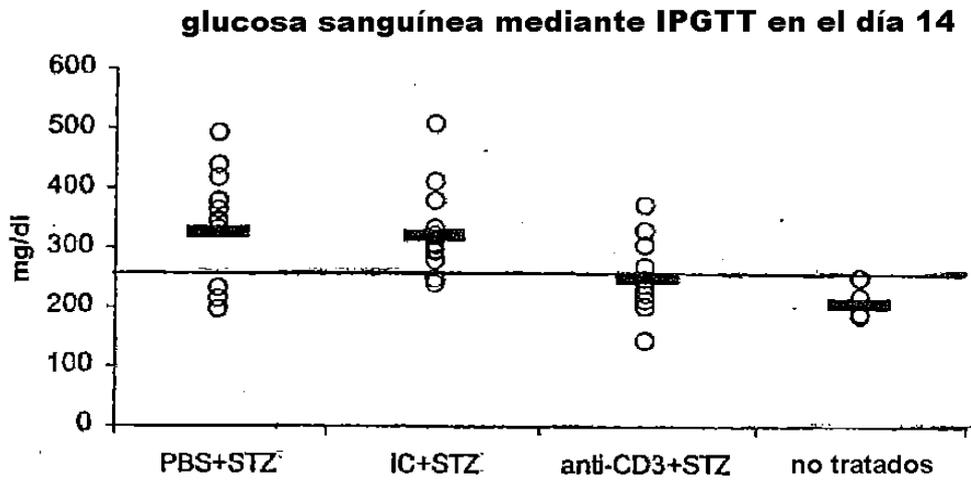


Figura 22A

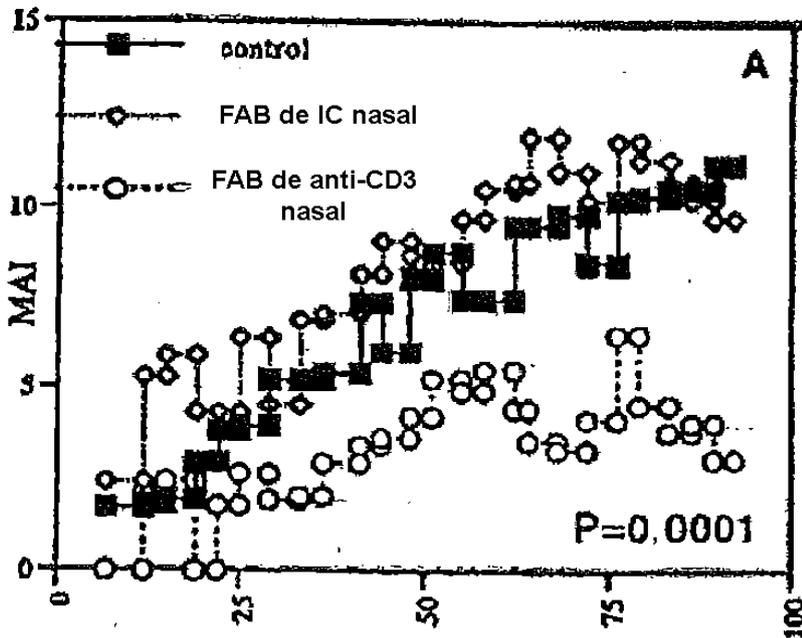


Figura 22B

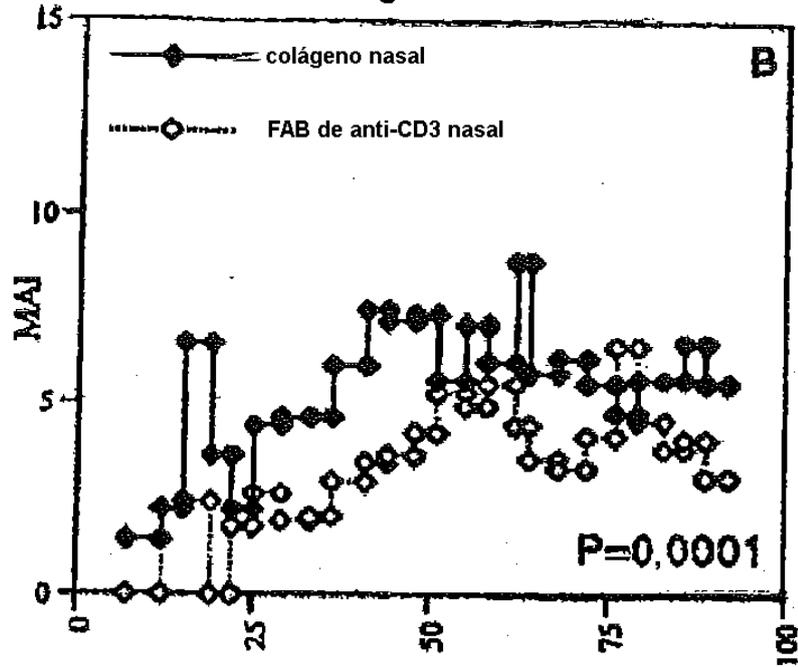


Figura 22C

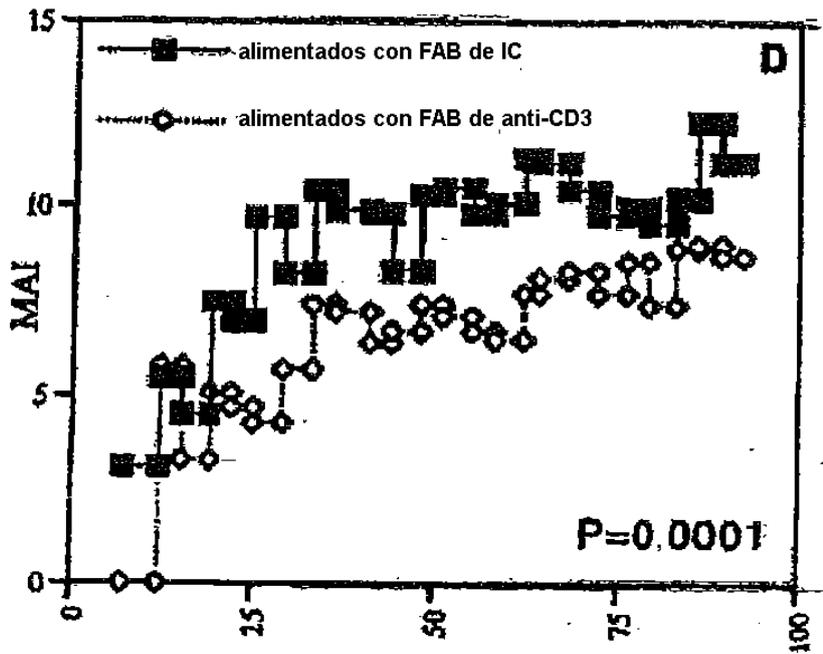


Figura 23A

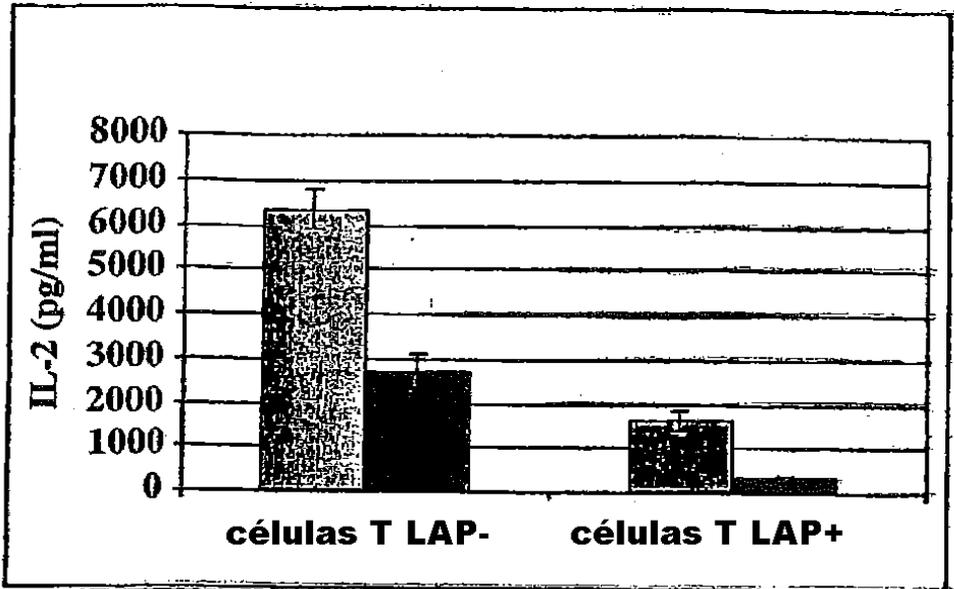


Figura 23B

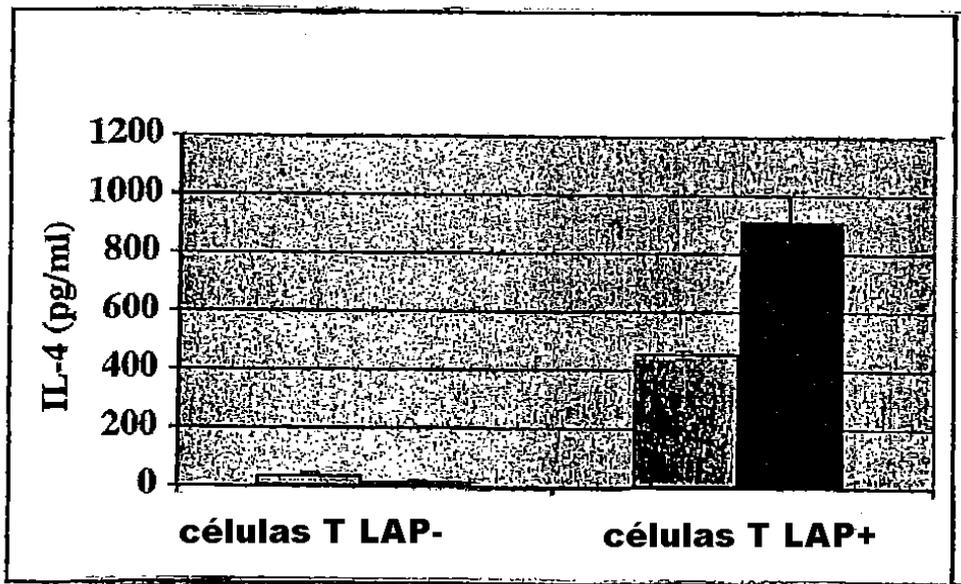


Figura 23C

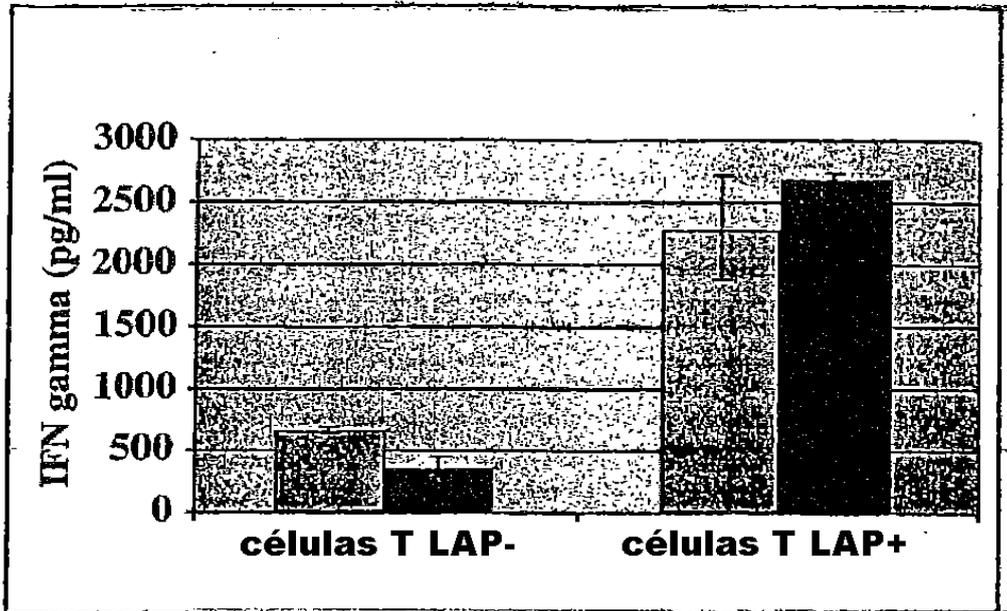


Figura 23D

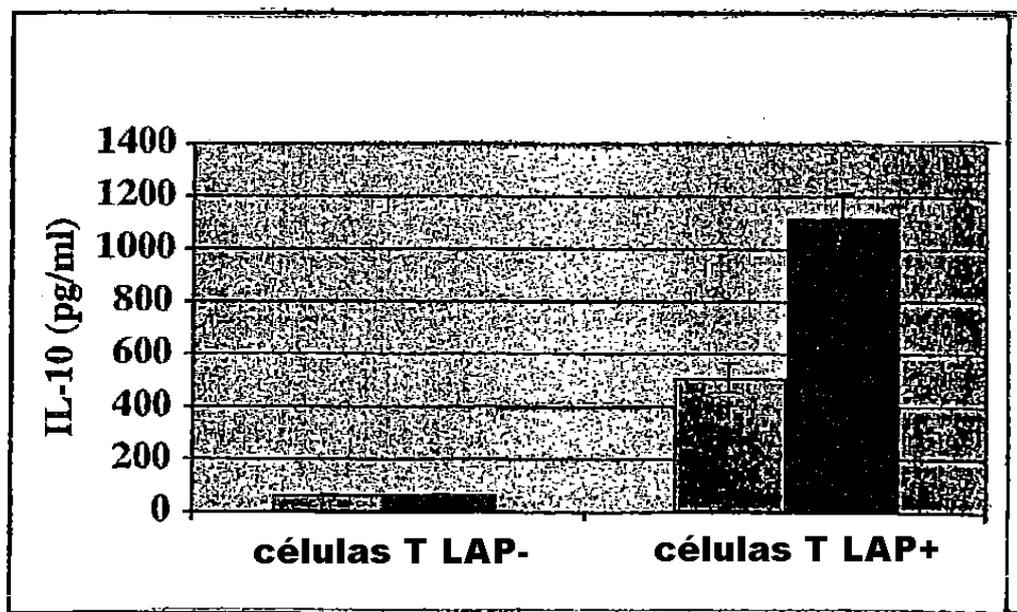


Figura 24

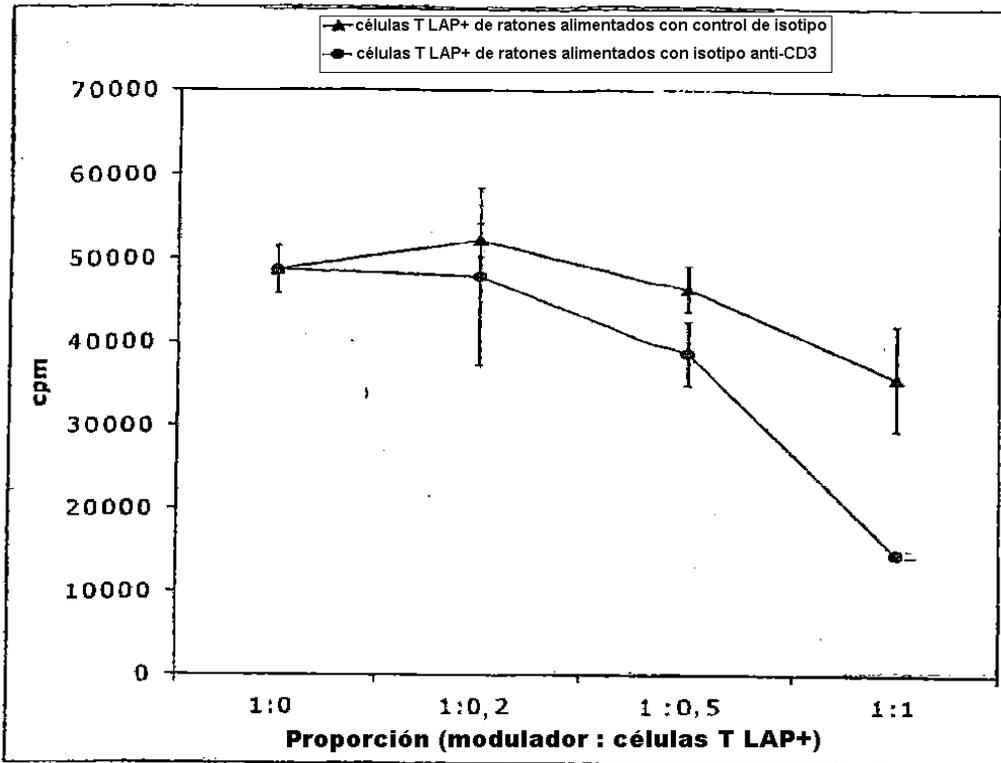


Figura 25

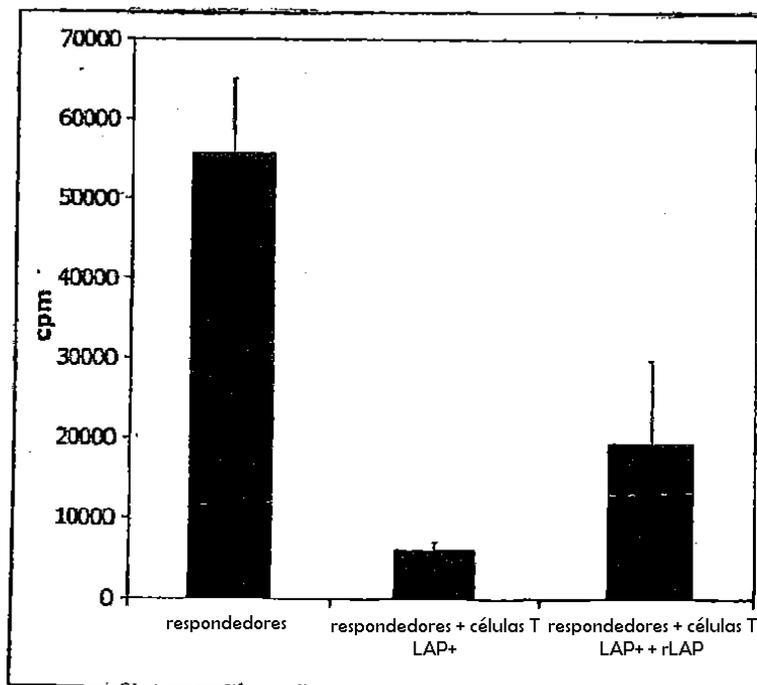


Figura 26

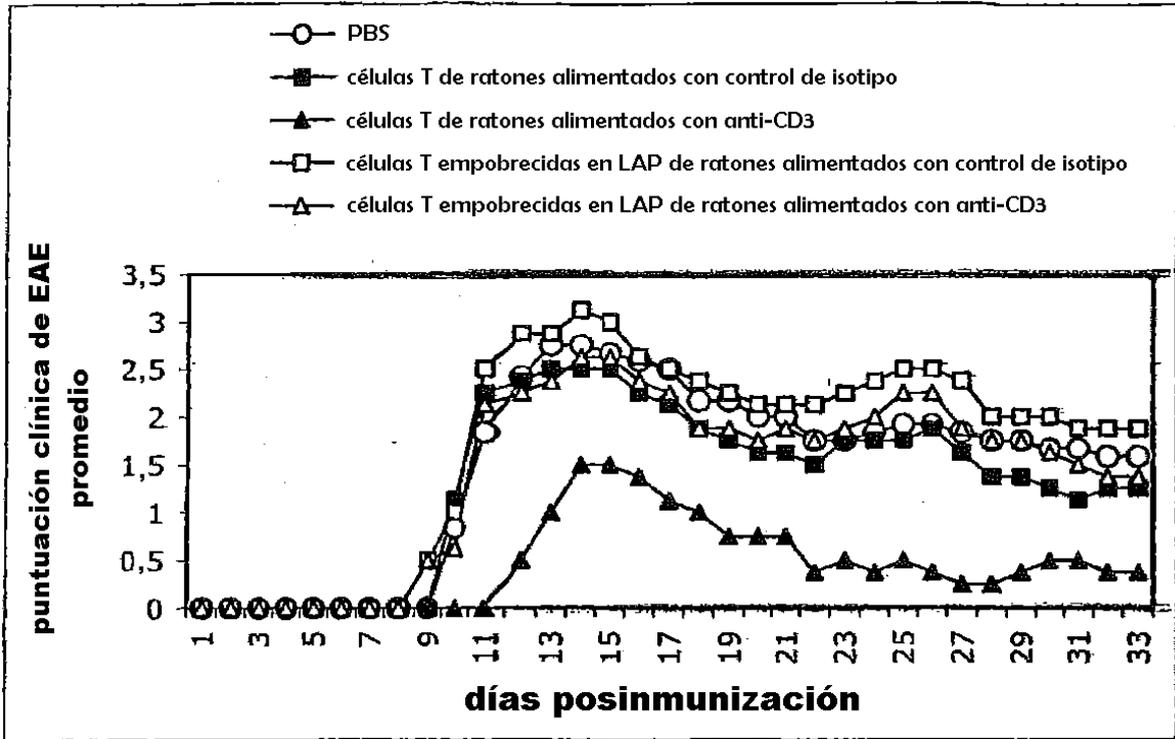


Figura 27

