

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 213**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2012 PCT/US2012/038219**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12162067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12790075 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2714733**

54 Título: **Moléculas que se unen a CD3 capaces de unirse a CD3 humano y no humano**

30 Prioridad:

21.05.2011 US 201161488716 P
01.09.2011 US 201161530353 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2019

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

HUANG, LING y
JOHNSON, LESLIE S.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 732 213 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

Moléculas que se unen a CD3 capaces de unirse a CD3 humano y no humano

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas:**Antecedentes de la invención:****5 Campo de la invención:**

La presente divulgación se refiere a moléculas que se unen a CD3 capaces de unirse a un CD3 humano y no humano, y en particular a dichas moléculas que muestran reacción cruzada con CD3 de un mamífero no humano (por ej., un mono macaco). La divulgación se refiere además a usos de dichos anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno en el tratamiento del cáncer, enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes y otras afecciones.

10 Descripción de la técnica relacionada:

El sistema inmunológico corporal sirve como una defensa contra una variedad de afecciones, que incluyen, por ej., lesión, infección y neoplasia, y está mediado por dos sistemas separados pero relacionados entre sí: los sistemas inmunológicos celular y humoral. Hablando en un sentido general, el sistema humoral está mediado por productos solubles (anticuerpos o inmunoglobulinas) que tienen la capacidad de combinarse con y neutralizar productos reconocidos por el sistema como extraños al cuerpo. En contraste, el sistema inmunológico celular incluye la movilización de ciertas células, denominadas células T, que cumplen una variedad de funciones terapéuticas. Las células T son linfocitos que derivan del timo y circulan entre los tejidos, sistema linfático y el sistema circulatorio. Actúan contra, o como respuesta a, una variedad de estructuras extrañas (antígenos). En muchos casos estos antígenos extraños se expresan en células huésped como resultado de neoplasia o infección. Aunque las células T no secretan anticuerpos en sí mismas, usualmente se las requiere para secreción del anticuerpo por la segunda clase de linfocitos, células B (que derivan de la médula ósea). De manera crítica, las células T exhiben especificidad inmunológica extraordinaria con el fin de ser capaces de discernir un antígeno de otro).

Una célula T inmadura, por ej., una célula T que aún no ha encontrado su antígeno específico, se activa cuando encuentra primero un complejo MHC : péptido específico sobre una célula que presenta el antígeno. La célula que presenta el antígeno puede ser una célula B, un macrófago o una célula dendrítica. Cuando una célula T inmadura encuentra un complejo MHC : péptido específico sobre una célula que presenta el antígeno, se entrega una señal a través del receptor de células T que induce un cambio en la conformación de la función de las moléculas del antígeno asociado con los linfocitos de la célula T (LFA), y aumenta su afinidad por moléculas de adhesión intracelular (ICAM) presentes sobre la superficie de la célula que presenta el antígeno. La señal generada por la interacción de la célula T con una célula que presenta el antígeno es necesaria, pero no suficiente, para activar una célula T inmadura. Se requiere una segunda señal coestimulante. La célula T inmadura sólo puede ser activada por una célula que presenta un antígeno que transporta ambos un complejo MHC de péptido específico y una molécula coestimulante sobre su superficie. El reconocimiento de los antígenos por una célula T inmadura en ausencia de coestimulación produce la célula T que se convierte en anérgica. La necesidad de que dos señales activen células T y células B de manera tal que logren una respuesta inmunológica adaptativa puede proporcionar un mecanismo para evitar respuestas a los autoantígenos que pueden estar presentes sobre una célula que presenta el antígeno en las ubicaciones en el sistema donde puede ser reconocido por una célula T. Donde el contacto de una célula T con una célula que presenta el antígeno produce la generación de solamente una de dos señales requeridas, la célula T no se activa y no ocurre una respuesta inmunológica adaptativa.

La eficiencia con la cual los humanos y otros mamíferos desarrollan una respuesta inmunológica a patógenos y sustancias extrañas se basa en dos características: la especificidad exquisita de la respuesta inmunológica para reconocimiento de los antígenos, y la memoria inmunológica que permite respuestas más rápidas y más vigorosas luego de la reactivación con el mismo antígeno (Portolés, P. *et al.* (2009) "The TCR/CD3 Complex: Opening The Gate to Successful Vaccination," *Current Pharmaceutical Design* 15:3290-3300; Guy, C.S. *et al.* (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," *Immunol Rev.* 232(1):7-21). La especificidad de la respuesta de células T está mediada por el reconocimiento del antígeno (se mostró en las células que presentan antígeno (APC) por un complejo molecular que incluye el receptor de células T ("TCR") y el ligando al receptor de la superficie celular, CD3. El TCR es un heterodímero ligado en forma covalente de las cadenas α y β ("TCR $\alpha\beta$ "). Estas cadenas son polipéptidos de membrana clase I de 259 (α) y 296 (β) aminoácidos de longitud. La molécula de CD3 es un complejo que contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , y dos cadenas CD3 ϵ asociadas como tres dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$) (Guy, C.S. *et al.* (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," *Immunol Rev.* 232(1):7-21; Call, M.E. *et al.* (2007) "Common Themes In The Assembly And Architecture Of Activating Immune Receptors," *Nat. Rev. Immunol.* 7:841-850; Weiss, A. (1993) "T Cell Antigen Receptor Signal Transduction: A Tale Of Tails And Cytoplasmic Protein-Tyrosine Kinases," *Cell* 73:209-212). El complejo TCR y CD3, junto con la cadena zeta de la cadena CD3 ζ (se conoce también como cadena zeta T3 del receptor de célula T o CD247) comprenden el complejo TCR (van der Merwe, P.A. *et al.* (epub Dec. 3, 2010) "Mechanisms For T Cell Receptor Triggering," *Nat. Rev. Immunol.* 11:47-55; Wucherpfennig, K.W. *et al.* (2010) "Structural Biology of the T Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a005140). El

complejo es particularmente significativo ya que contiene un número extenso (diez) de motivos de activación basado en la tirosina inmunoreceptora (ITAM).

En las células T maduras, la activación de TCR/CD3 por péptidos antigénicos extraños asociados a moléculas auto-MHC es el primer paso necesario para la expansión de células T específicas para el antígeno, y su diferenciación en linfocitos T de memoria o efectoros. Estos procesos incluyen la fosforilación de los motivos de activación basada en tirosina del inmunoreceptor (ITAM) del complejo TCR. Debido a que el complejo TCR tiene dicho gran número de ITAMS (10 en total), y estos ITAMS se disponen en tándem (debido a la dimerización de las cadenas constituyentes), fosforilación de los residuos de tirosina relevantes luego de la ligación de TCR crea sitios de encaje emparejados para proteínas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2) tales como la proteína asociada con la cadena ζ de 70 kDa (ZAP-70), y por lo tanto inician una cascada de señalización de amplificación que conduce a la activación de una célula T y diferenciación (Guy, C.S. *et al.* (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," Immunol Rev. 232(1):7-21).

El resultado de estos procesos se modula por la intensidad y la calidad del estímulo del antígeno, así como también por la naturaleza de las señales que acompañan entregadas por el coreceptor y moléculas coestimulantes de superficie, o por receptores de citoquina (Portolés, P. *et al.* (2009) "The TCR/CD3 Complex: Opening The Gate to Successful Vaccination," Current Pharmaceutical Design 15:3290-3300; Riha, P. *et al.* (2010) "CD28 Co-Signaling In The Adaptive Immune Response," Self/Nonsel 1(3):231-240). Aunque la estimulación de TCR es un requisito previo para la activación de la célula T, se reconoce muy bien que el compromiso de las moléculas coestimulantes, tales como CD28, es necesario para la completa activación y diferenciación de células T (Guy, C.S. *et al.* (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," Immunol Rev. 232(1):7-21).

Debido a la naturaleza fundamental de CD3 en el inicio de la respuesta anti-antigénica, los anticuerpos monoclonales contra este receptor se han propuesto porque son capaces de bloquear o por lo menos modular el proceso inmune y de este modo como agentes para el tratamiento de enfermedad autoinmune y/o inflamatoria. En efecto, los anticuerpos anti-CD3 fueron el primer anticuerpo aprobado para el tratamiento en humanos (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity," Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657). El anticuerpo anti-CD3 (comercializado como ORTHOCLONE™ OKT3™ por Janssen-Cilag) se ha administrado para reducir el rechazo agudo en pacientes con trasplantes de órganos y como tratamiento para la leucemia linfoblástica (Cosimi, A.B. *et al.* (1981) "Use Of Monoclonal Antibodies To T Cell Subsets For Immunologic Monitoring And Treatment In Recipients Of Renal Allografts," N. Engl. J. Med. 305:308-314; Kung, P. *et al.* (1979) Anticuerpos monoclonales que definen antígenos T humanos distintivos de la superficie celular," Science 206:347-349; Vigerál, P. *et al.* (1986) "Prophylactic Use Of OKT3 Monoclonal Antibody In Cadaver Kidney Recipients. Utilization Of OKT3 As The Sole Immunosuppressive Agent," Transplantation 41:730-733; Midtvedt, K. *et al.* (2003) "Individualized T Cell Monitored Administration Of ATG Versus OKT3 In Steroid-Resistant Kidney Graft Rejection," Clin. Transplant. 17(1):69-74; Gramatzki, M. *et al.* (1995) "Therapy With OKT3 Monoclonal Antibody In Refractory T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Induces Interleukin-2 Responsiveness," Leukemia 9(3):382-390; Herold, K.C. *et al.* (2002) "Anti-CD3 Monoclonal Antibody In New-Onset Tipo 1 Diabetes Mellitus," N. Engl. J. Med. 346:1692-1698; Cole, M.S. *et al.* (1997) "Human IgG2 Variants Of Chimeric Anti-CD3 Are Nonmitogenic to T Cells," J. Immunol. 159(7):3613-3621; Cole, M.S. *et al.* (1999) "Hum291, A Humanized Anti-CD3 Anticuerpo, Is Immunosuppressive To T Cells While Exhibiting Reduced Mitogenicity in vitro," Transplantation 68:563-571; Patentes de EE. UU. Nros. 6,491,916; 5,585,097 y 6,706,265).

Sin embargo, dicho tratamiento anti-CD3 ha demostrado que no es lo suficientemente específico para evitar efectos colaterales (Ludvigsson, J. (2009) "The Role of Immunomodulation Therapy in Autoimmune Diabetes," J. Diabetes Sci. Technol. 3(2):320-330). La administración diaria reiterada de OKT3 produce inmunosupresión profunda y proporciona tratamiento efectivo del rechazo consecuente del trasplante renal. La administración *in vivo* de OKT3 produce tanto la activación de células T y supresión de respuestas inmunológicas. Sin embargo, el uso de OKT3 se ha perjudicado por un primer síndrome de reacción a la dosis tóxica que se relaciona con eventos de activación inicial de células T y asegurar la liberación de citoquinas que ocurre antes de la inmunosupresión de las respuestas de células T. Los efectos colaterales informados que siguen la primera y en ocasiones la segunda inyección de este anticuerpo monoclonal de ratón incluyen un síndrome "similar a la gripe" que consiste en fiebre alta, escalofríos, cefalea y síntomas gastrointestinales (vómitos y diarrea) y en casos severos edema pulmonar dentro de las horas posteriores al tratamiento (Thistlethwaite, J.R. Jr. *et al.* (1988) "Complications and Monitoring of OKT3 Therapy," Am. J. Kidney Dis. 11:112-119). Se considera que este síndrome refleja el entrecruzamiento mediado por OKT3 del complejo TCR/CD3 sobre la superficie de las células T y la liberación resultante de citoquinas (*por ej.*, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón- γ , interleucinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 y factor estimulante de la colonia de macrófagos-granulocitos (Masharani, U.B. *et al.* (2010) "Teplizumab Therapy For Type 1 Diabetes," Expert Opin. Biol. Ther. 10(3):459-465; Abramowicz, D. *et al.* (1989) "Release Of Tumor Necrosis Factor, Interleukin-2, and Gamma-interferon In Serum After Injection Of OKT3 Monoclonal Antibody In Kidney Transplant Recipients," Transplantation 47:606-608; Ferran, C. *et al.* (1990) "Cytokine-Related Syndrome Following Injection Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody: Further Evidence For Transient In Vivo T Cell Activation," Eur. J. Immunol. 20:509-515; Hirsch, R. *et al.* (1989) "Effects Of In Vivo Administration Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody On T Cell Function In Mice. II. In Vivo Activation Of T Cell," J. Immunol, 142:737-743). El uso de anti-CD3 anticuerpos se divulga en las Patentes de EE. UU. Nros. 7,883,703; 7,728,114; 7,635,472; 7,575,923; y 7,381,903, y en las Publicaciones de Patentes de EE.

UU. Nros. 2010/0150918; 2010/0209437; 2010/0183554; 2010/0015142, 2008/0095766, 2007/0077246 y en la Publicación por PCT WO2008/119567.

Una limitación particular de los anticuerpos anteriores es su especificidad sólo por el CD3 humano. Esta limitación es un impedimento significativo para el desarrollo de dichos anticuerpos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades del ser humano. Con el fin de obtener aprobación del mercado cualquier nueva medicación candidata debe pasar a través de evaluación rigurosa. Esta evaluación puede subdividirse en fases clínicas y preclínicas. Mientras que la última – subdividida en forma adicional en las fases clínicas conocidas generalmente I, II and III – se realiza en pacientes humanos, la primera se realiza en animales. El objetivo de la evaluación clínica es demostrar que el medicamento candidato tiene la actividad deseada y lo más importante, es seguro. Sólo cuando la seguridad en los animales y la posible efectividad del fármaco candidato se ha establecido en experimentación preclínica este fármaco candidato se aprobará para evaluación clínica en humanos a cargo de la autoridad regulatoria respectiva. Los fármacos candidatos pueden evaluarse para determinar la seguridad en animales de los siguientes tres modos, (i) en una especie relevante, es decir, en una especie en donde los fármacos candidatos pueden reconocer los antígenos ortólogos, (ii) en un animal transgénico que contiene los antígenos humanos y (iii) por el uso de un sustituto del fármaco candidato que puede unirse a antígenos ortólogos presentes en el animal. Las limitaciones de los animales transgénicos son que esta tecnología normalmente se limita a los roedores. Sin embargo, los roedores y los humanos tienen diferencias significativas en la fisiología que pueden complicar la extrapolación de los datos de seguridad obtenidos en roedores para anticipar la seguridad en humanos. Las limitaciones de un sustituto para el fármaco candidato son la composición diferente de importancia cuando se compara con el fármaco candidato real y con frecuencia los animales usados son roedores con la limitación como se discutió con anterioridad. Por lo tanto, los datos preclínicos generados en roedores son de fuerza predictiva limitada con respecto al fármaco candidato. El método de elección para análisis de la seguridad es el uso de una especie relevante, con preferencia un primate inferior. La limitación ahora de las moléculas que se unen a CD3 apropiadas para intervención terapéutica en el hombre descrita en la materia es que las especies relevantes son primates superiores, en particular monos macacos. De acuerdo con lo anterior, un anticuerpo anti-CD3 capaz de unirse tanto a CD3 de primate como humano es altamente deseable. Dichos anticuerpos se han descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 20100150918 y en la Publicación por PCT WO2008/119567.

A pesar de dichas ventajas continúa presente la necesidad de lograr anticuerpos CD3 anti-humanos y sus fragmentos de unión al antígeno que son capaces de reaccionar en forma cruzada con CD3 de un mamífero no humano (*por ej.*, un mono macaco). La presente invención aborda esta necesidad y la necesidad de lograr productos terapéuticos para tratar el cáncer, autoinmunidad y enfermedades inflamatorias mejorados.

Resumen de la divulgación

La presente divulgación se refiere a moléculas que se unen a CD3 capaces de unirse un CD3 humano y no humano, y en particular a dichas moléculas que muestran reacción cruzada con CD3 de un mamífero no humano (*por ej.*, un mono macaco). La invención se refiere además a usos de dichos anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno en el tratamiento del cáncer, enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes y otras afecciones.

En detalle, la invención proporciona una molécula que se une a CD3 que comprende un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 en la presente.

La divulgación se refiere en particular a la realización de la molécula de unión a CD3 descrita con anterioridad en donde el dominio VL específico de CD3 es h-mab2 VL-6 (**SEC ID NRO.:26**).

La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 en donde el dominio VH específico de CD3 es h-mab2 VH-8 (**SEC ID NRO.:50**), h-mab2 VH-6 (**SEC ID NRO.:46**).

La divulgación se refiere en particular a la realización de la molécula de unión a CD3 descrita con anterioridad en donde la molécula es un anticuerpo, y en particular, en donde el anticuerpo carece de una región de Fc o comprende una región de Fc que:

- (A) carece de función efectora o tiene función efectora reducida; o
- (B) daña la capacidad de la región Fc del anticuerpo de unirse a un receptor de Fc;

en donde la reducción en la función efectora y el impedimento de la capacidad de unión con relación a la de un receptor de Fc tipo salvaje.

La invención se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 en donde la molécula es un diacuerpo que se une a CD3 que comprende una primera cadena de polipéptido y una segunda cadena de polipéptido, las cadenas están unidas en forma covalente entre sí, en donde:

I. la primera cadena de polipéptido comprende un término amino y un término carboxi y de término N a término C:

- (i) un dominio (A) que comprende el dominio VL específico de CD3;
- (ii) un dominio (B) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2); y
- (iii) un dominio (C);

5 en donde los dominios (A) y (B) no se asocian entre sí para formar un sitio que se une al epítotope;
y

(II) la segunda cadena de polipéptido comprende un término amino y un término carboxi y de término N a término C:

- 10 (i) un dominio (D) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2);
- (ii) un dominio (E) que comprende el dominio VH específico de CD3; y
- (iii) un dominio (F);

en donde los dominios (D) y (E) no se asocian entre sí para formar un sitio que se une al epítotope; y
en donde:

- 15 (1) los dominios (A) y (E) se asocian para formar el dominio de unión al antígeno que es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a ambos CD3 humano y al CD3 de un mamífero no humano;
- (2) los dominios (B) y (D) se asocian para formar un sitio de unión que se une en forma inmuno-específica a un segundo epítotope, el segundo epítotope es diferente del epítotope CD3 unido por el dominio de unión al antígeno formado a partir de la asociación de los dominios (A) y (E); y
- 20 (3) los dominios (C) y (F) se asocian entre sí en forma covalente.

La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 en donde el segundo epítotope no es un epítotope de CD3.

25 La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 en donde el segundo epítotope es un epítotope de CD3 que es diferente del epítotope de CD3 unido por el dominio de unión al antígeno formado a partir de la asociación de los dominios (A) y (E).

La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 o anticuerpos o diacuerpos en la cual dicha molécula es humanizada.

30 La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 o anticuerpos o diacuerpos en la cual dicha molécula es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y a fluoresceína.

La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 o diacuerpos en la cual dicha molécula es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a ambos: (i) CD3 y (ii) (a) un antígeno del tumor, o (ii) (b) un antígeno de la superficie de la célula, receptor o ligando del receptor.

35 La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 o diacuerpos en la cual la molécula o diacuerpo es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y a un antígeno del tumor expresado en una célula tumoral, en donde la célula tumoral es una célula tumoral de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de la cavidad oral, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de laringe, cáncer de hueso, cáncer de piel, melanoma, cáncer de útero, cáncer de testículo, cáncer de vesícula, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, glioblastoma, cáncer de tiroides, linfoma, mieloma y leucemia.

45 La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 o diacuerpos en los cuales la molécula o diacuerpo es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y a un antígeno de la superficie de la célula, receptor o ligando del receptor, en donde el antígeno de la superficie celular, receptor o ligando del receptor es HER2/neu, B7-H3, CD20, PSMA, IGF-1R., Ep-CAM, o es una molécula involucrada en la asociación de célula T - célula B que conduce a una activación de células T o células B en una respuesta inmunológica adaptativa.

5 La divulgación se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 o diacuerpos en los cuales la molécula o diacuerpo es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y a una molécula involucrada en la asociación de célula T - célula B y la molécula involucrada en la asociación de célula T - célula B se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD32B, CD38, CD40, CD79a, CD79b, CD80, CD86, LFA-I, LFA-3 y CFA-I.

La invención se refiere en forma adicional a una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 en la presente.

La invención se refiere en forma adicional a la molécula de unión a CD-3 o a la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 en la presente.

10 La divulgación se refiere en forma adicional a la composición farmacéutica descrita con anterioridad para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en: diabetes dependiente de la insulina tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, miastenia grave, enfermedad celíaca, Síndrome de Sjogren, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, hepatitis autoinmune, psoriasis, artritis sorbiática, asma, rinitis alérgica, efectos del trasplante de órganos, o enfermedad de huésped vs. injerto (GVHD). La divulgación en particular se refiere a la composición farmacéutica descrita con anterioridad para usar en el tratamiento de diabetes dependiente de la insulina tipo I.

Breve descripción de las figuras:

20 Las **Figuras 1A-1B** muestran los resultados de un ELISA de captura en el cual la capacidad del anticuerpo mAB1 anti-CD3 (**Figura 1A**) o un derivado quimérico del anticuerpo mAB1 (ch-mAb1) (**Figura 1B**) se evaluó con el uso de CD3 soluble humano ("shCD3").

Las **Figuras 2A-2B** muestran los resultados de un ELISA de captura en el cual la capacidad de anti-CD3 anticuerpo mAB2 (**Figura 2A**) o un derivado quimérico del anticuerpo mAB2 (ch-mAb2) (**Figura 2B**) se evaluó con el uso de CD3 soluble humano ("shCD3") o CD3 soluble de mono macaco ("scCD3").

25 La **Figura 3** muestra los resultados de análisis para determinar el efecto de variaciones en los residuos de marcos numerados según Kabat 41-46 de la cadena liviana de mAb2.

La **Figura 4** muestra los resultados de análisis para determinar el efecto de variaciones en los residuos de marcos numerados según Kabat 36, 38, 44 y 46 de la cadena liviana de mAb2.

Figura 5 muestra los resultados de análisis para determinar el efecto de variaciones en los residuos de marcos numerados según Kabat 36, 38 y 46 de la cadena liviana de mAb2.

30 La **Figura 6** muestra los resultados de análisis para determinar el efecto de variaciones en los residuos de marcos numerados según Kabat 30, 49 y 93 de la cadena pesada de mAb2.

La **Figura 7** muestra los resultados de análisis adicionales conducidos para determinar el efecto de variaciones en los residuos de marcos numerados según Kabat 30, 49 y 93 de la cadena pesada de mAb2.

35 Las **Figuras 8A-8B** muestran los resultados de análisis conducidos para evaluar la capacidad de mAb2 quimérico y humanizado de unirse a CD3 no humano.

Las **Figuras 9A-9D** muestran trazas de sensograma de análisis BIACORE™ realizados para determinar la cinética de la unión de ch-mAB2 o h-mAb2 y scCD3 o scCD3.

40 Las **Figuras 10A-10D** muestran los resultados de ELISA de captura realizados sobre diacuerpos DART™ que tienen un primer sitio de unión al epítipo y segundo sitio de unión al epítipo anti-CD3 que se unen en forma indistinta a Her2/neu, CD19, EGFR, o B7-H3.

Las **Figuras 11A-11B** muestran la capacidad de B7H3 x Diacuerpos CD3 DART™ para mediar la destrucción redirigida de células de tumor que expresan B7H3.

Las **Figuras 12A-12E** muestran la capacidad de A33 x Diacuerpos CD3 DART™ para mediar la destrucción redirigida de células de tumor que expresan A33.

45 Las **Figuras 13A y 13B** muestran los resultados de una comparación de la capacidad de un CD19-h-mAb2 DART™ y un diacuerpo CD19 x CD3 DART para producir la destrucción mediada por las células T redirigidas. El diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ exhibe especificidad por CD3 humano así como también no humano; el diacuerpo CD19 x CD3 DART o exhibe especificidad sólo por CD3 humano. **Figura 13A:** destrucción redirigida de Células de células de linfoma de células B humanas Raji; **Figura 13B:** destrucción redirigida de células de linfoma de células de manto humano JeKo-1

Las **Figuras 14A y 14B** muestran que el diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ de la presente divulgación fue capaz de mediar la citólisis en la presencia de células efectoras de células T tanto humanas como no humanas.

Las **Figuras 15A y 15B** muestran la capacidad del diacuerpo ERBITUX™-h-mAb2 DART™ de la presente divulgación o un diacuerpo ERBITUX™-receptor de células T DART™ para mediar un aumento en CD69 MFI luego de la incubación con CD4+ o CD8+ células T; un diacuerpo de control ERBITUX™-FN18 CD3 DART™ (capaz de unirse a EGFR y a CD3 de mono macaco) no pudo inducir un aumento en el CD69 MFI.

Las **Figuras 16A-16D** muestran los resultados de investigaciones en la unión de cualquiera de diacuerpo ERBITUX™-h-mAb2 DART™, diacuerpo ERBITUX™-m-mAb2 DART™ o diacuerpo 4420-h-mAb2 DART™ (control negativo) o un control secundario para células A498 o A431 s (**Figura 16A y 16C**, respectivamente), y para mediar la destrucción redirigida de dichas células (**Figura 16B y 16D**, respectivamente).

Descripción detallada de la invención:

La presente invención se refiere a anticuerpos CD3 anti-humanos y sus fragmentos que se unen al antígeno, y en particular a dichos anticuerpos que muestran reacción cruzada con CD3 de un mamífero no humano (*por ej.*, un mono macaco). La invención se refiere además a usos de dichos anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno en el tratamiento del cáncer, enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes y otras afecciones.

I. Definiciones

Como se usa en este documento, el término "Molécula que se une a CD3" denota una molécula capaz de unión inmuno-específica a ambos CD3 humano y al CD3 de un mamífero no humano a través de por lo menos un sitio de reconocimiento de los antígenos (*por ej.*, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo) ubicado en la región variable de la molécula. Como se usa en este documento dicha capacidad para unirse inmunológicamente en forma específica a ambos CD3 humano y al CD3 de un mamífero no humano no tiene la finalidad de denotar una capacidad de un dominio de unión al antígeno individual de unirse en forma simultánea a ambas de dichas moléculas CD3, sino más bien que dicho dominio de unión al antígeno exhibe reactividad cruzada de manera tal que se unirá inmunológicamente en forma específica a CD3 humano cuando se incubaba en la presencia de CD3 humano y se unirá inmunológicamente en forma específica al CD3 de un mamífero no humano cuando se incubaba en la presencia de dicho CD3 de mamífero no humano.

Como se usa en este documento, el término "Molécula que se une a CD3" abarca no sólo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también fragmentos de los anteriores (tales como Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), cadena simple (ScFv), mutantes de los anteriores, variantes naturales, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, "BiTEs®," moléculas de diacuerpo "DART™" y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida. El término "BiTEs" (encastradores de células T biespecíficos) se refiere a una cadena simple de molécula de polipéptido que tiene dos dominios que se unen al antígeno, uno de los cuales antígeno se une a un antígeno de células T y el segundo de los cuales se une a un antígeno presente sobre la superficie de un blanco (WO 05/061547; Baeuerle, P *et al.* (2008) "BiTE®: A New Class of Antibodies That Recruit T Cells," *Drugs of the Future* 33: 137-147; Bargou, *et al.* (2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody," *Science* 321: 974-977).

El término diacuerpo "DART™" (reactivo **D**ual **A**ffinity **R**eTargeting) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que comprende por lo menos dos cadenas de polipéptidos que se asocian (en especial a través de una interacción covalente) para formar por lo menos dos sitios de unión a epítopes, que pueden reconocer los mismos epítopes u otros diferentes. Cada una de las cadenas de polipéptidos de un diacuerpo DART™ comprenden una región variable de la cadena liviana de inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, pero estas regiones no interactúan para formar un sitio que se une al epítope. Más bien, la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de una (*por ej.*, la primera) de las cadenas de polipéptidos del diacuerpo DART™ interactúa con la región variable de cadena liviana de inmunoglobulina de una diferente (*por ej.*, la segunda) cadena de polipéptido DART™ para formar un sitio que se une al epítope. En forma similar, la región variable de cadena liviana de inmunoglobulina de una (*por ej.*, la primera) de las cadenas de polipéptidos del diacuerpo DART™ interactúa con la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de una diferente (*por ej.*, la segunda) cadena del polipéptido del diacuerpo DART™ para formar un sitio que se une al epítope. Los diacuerpos DART™ pueden ser mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos, etc., y de este modo son capaces de unirse simultáneamente a uno, dos, tres o más epítopes diferentes (que pueden ser de los mismos o de diferentes antígenos). Los diacuerpos DART™ pueden en forma adicional ser monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes, etc., de este modo son capaces de unirse simultáneamente a una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más moléculas. Estos dos atributos de los diacuerpos DART™ (es decir, grado de especificidad y valencia) pueden combinarse, por ejemplo para producir anticuerpos biespecíficos (es decir, capaces de unir dos epítopes) que son tetravalentes (es decir, capaces de unir cuatro grupos de epítopes), etc. Las moléculas de diacuerpo DART™ se divulgan en las Publicaciones por PCT WO 2006/113665, WO 2008/157379, y WO 2010/080538.

Las moléculas biespecíficas (o triespecíficas o multiespecíficas) de la presente invención serán capaces de unirse a ambos CD3 humano y el CD3 de un mamífero no humano (por ej., mono macaco), y también a un segundo (o adicional) y diferente(s) antígeno(s) o epítipo(s). El segundo antígeno o epítipo es con preferencia un antígeno del tumor expresado en una célula tumoral. Dichas células tumorales pueden ser de cánceres, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de la cavidad oral, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de laringe, cáncer de hueso, cáncer de piel, melanoma, cáncer de útero, cáncer de testículo, cáncer de vesícula, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, glioblastoma, cáncer de tiroides, linfoma, mieloma, o leucemia. Los antígenos o epítopes adicionales son con preferencia antígenos tumorales o epítopes de la superficie celular (tales como: 17-1A, A33, antígeno de endoderma I primario de eritrocitos adultos, alfa fetoproteína, un antígeno de envoltura de un virus del tumor de ARN, antígeno oncofetal de tumor de vesícula, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, antígeno de linfoma de Burkitt-38,13, CA125, CD18, CD19, antígeno de linfoma B humano-CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CO17-1A, CTA-1, CTLA-4, receptor del factor de crecimiento epidérmico, Ep-CAM, EphA2, antígeno de eritrocito I fetal, antígeno de fibrosarcoma, gangliosida GD2, gangliosida GM2, gangliosida GM3, GlcA 19-9, gp IIIb/IIIa, gp72, HER1, HER-2/neu, HER3, HER4, antígeno de melanoma de alto peso molecular, Antígeno HLA-DR, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37, antígeno de carcinoma de pulmón humano L20, antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, antígeno de glóbulo de grasa de leche humana, IgE, antígeno del carcinoma pan KS 1/4, LEA, antígeno adenocarcinoma de pulmón F3, antígeno de linfocitos humanos malignos-APO-1, antígeno de melanoma gp75, antígeno asociado al melanoma p97, neoglicoproteína, nuC242, antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno específico de la próstata, antígeno de membrana específica de la próstata, fosfato de ácido prostático, antígeno SK-1, TAG-72, antígeno T, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno de superficie de trasplante de tipo de célula específico del tumor, factor de crecimiento endotelial vascular, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, y $\alpha\beta 3$). En forma alternativa, dichos antígenos o epítopes adicionales pueden estar asociados con un patógeno (tales como: hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus de papiloma, virus de papiloma, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, coxsackie virus, virus de paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (HIV-II), meningitis viral, encefalitis viral, dengue, viruela; *mycobacteria rickettsia*, *mycoplasma*, *neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus*, *Stafilococcus*, *Mycobacterium*, tétano, pertusis, cólera, plaga, difteria, *chlamydia*, y *legionella*; leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria; clamidia and rickettsia).

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpo homogéneo en donde el anticuerpo monoclonal se forma de aminoácidos (naturales y no naturales) que están involucrados en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico único. El término "anticuerpo monoclonal" abarca no solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los anteriores (tales como Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), cadena simple (ScFv), mutantes de los anteriores, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados monoclonales, anticuerpos quiméricos monoclonales, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un antígeno. No pretende limitarse respecto de la fuente del anticuerpo o el modo en el cual se hace (*por ej.*, por hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, *etc.*). El término incluye inmunoglobulinas completas así como también los fragmentos *etc.* descritos con anterioridad bajo la definición de "anticuerpo".

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula quimérica, en general preparada con el uso de técnicas recombinantes, que tiene un sitio que se une al antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio que se une al antígeno puede comprender cualquiera de los dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes o sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas sobre regiones de marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios que se unen a los antígenos pueden ser de tipo salvaje o modificarse por una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como un inmunógeno en individuos humanos, pero la posibilidad de una respuesta inmunológica a la región variable extraña permanece (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Otro método se enfoca no sólo en el suministro de las regiones constantes derivadas de humanos, sino en la modificación de las regiones variables también con el fin de reformarlas lo más posible con la forma humana. Se sabe que las regiones variables de ambas cadenas liviana y pesada contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían como respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, rodeada por cuatro regiones de marco (FR) que se conservan relativamente en una especie dada y que proveen putativamente escalones para los CDR. Cuando los anticuerpos no humanos se preparan con respecto a un antígeno particular, las regiones variables pueden "reformarse" o "humanizarse" por injerto de CDR derivados de un anticuerpo no humano en los FR presentes en el anticuerpo humano que se modificará. La aplicación de este método a varios anticuerpos ha sido informado por Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting

5 *An Antilysozyme Activity,* Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibodies," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory syncytial Virus Infection *in vivo*," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. *et al.* (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de ratón que contiene los seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen uno o más CDR (uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que se denominan además uno o más CDR "derivados de" uno o más CDR del anticuerpo original. Como se divulga a continuación, los anticuerpos preferidos de la presente divulgación tienen CDR identificadas específicas. La presente divulgación, sin embargo, contempla anticuerpos equivalentes que tienen CDR alterados.

20 Como se usa en este documento, un anticuerpo o un polipéptido se dice que se une "inmunoespecíficamente" o en forma equivalente, "específicamente" a una región de otra molécula (es decir, un epítipo) si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con ese epítipo con relación a epítopos alternativos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une en forma específica a un epítipo de CD3 es un anticuerpo que se une a este epítipo de CD3 con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y /o con mayor duración de lo que se une a otros epítopos de CD3 o epítopos que no son de CD3. También se entiende por lectura de esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une en forma inmunoespecífica a un primer blanco puede o no unirse en forma específica o preferencial a un segundo blanco. Como tal, "unión en forma inmunoespecífica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión "exclusiva". En general, aunque no necesariamente, la referencia a la unión significa unión "inmunoespecífica".

30 Como se usa en este documento, el término "inmunológicamente activo" con referencia a un epítipo que es o "permanece inmunológicamente activo" se refiere a la capacidad de un anticuerpo (*por ej.*, un anticuerpo anti-CD3) de unirse al epítipo en diferentes condiciones, por ejemplo, luego de que el epítipo se haya sometido a condiciones reductoras y desnaturalizantes. Por ejemplo, si el anticuerpo ya no es capaz de unirse a un epítipo desnaturalizado, ese epítipo se dice que se ha vuelto inmunológicamente inactivo.

35 Diferentes funciones biológicas están asociadas con los anticuerpos anti-CD3 de la presente divulgación, y dichos anticuerpos pueden exhibir cualquiera o la totalidad de los siguientes atributos, o pueden carecer de, uno, dos, tres o más de dichos atributos: una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 humano como se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T humana normal; una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 humano según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T de leucemia humana; una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 de un mamífero no humano (por ej., mono macaco) según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T de mamífero no humano normal; una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 no humano según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T no humana normal; una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 no humano según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T de leucemia no humana; una capacidad de neutralizar (es decir, bloquear o interferir con la unión) la formación del complejo CD3; una capacidad de neutralizar la formación del complejo TCR; una capacidad de modular (ya sea en forma antagonista o agonista) la señalización del complejo TCR; una capacidad de unirse al receptor de Fc; una capacidad de inhibir competitivamente la unión preferencial de un anticuerpo anti-CD3 conocido a CD3, que incluyen la capacidad de unirse preferencialmente al mismo epítipo de CD3 al cual se une preferencialmente el anticuerpo original; una capacidad de unirse a una porción de CD3 que se expone sobre la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*; una capacidad de unirse a una porción de CD3 que se expone sobre la superficie de una célula viva con cáncer; una capacidad de administrar un agente quimioterapéutico en una célula T cancerosa; y/o una capacidad de administrar un agente terapéutico, toxina o marcador detectable en una célula T. Como se discute en este documento, los polipéptidos (que incluyen anticuerpos) de la divulgación pueden tener una o más de estas características.

55 Como se usa en este documento, el término "agente" se refiere a un compuesto químico, farmacéutico o biológico. Ejemplos no limitativos incluyen molécula orgánica o inorgánica simple o compleja, un péptido, una proteína, un oligonucleótido, un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, un derivado de vitamina, un carbohidrato, una toxina, o un compuesto quimioterapéutico. Se pueden sintetizar varios compuestos, por ejemplo, moléculas pequeñas y oligómeros (por ej., oligopéptidos y oligonucleótidos), y compuestos orgánicos sintéticos basados en varias estructuras centrales. Además, varias fuentes naturales pueden proveer compuestos para selección, tales como extractos de animales o plantas, y similares. Los agentes que se emplean en los métodos de esta invención pueden seleccionarse aleatoriamente o seleccionarse o diseñarse racionalmente. Como se usa en este documento, se dice que un agente se selecciona aleatoriamente cuando el agente se elige sin consideración previa o conocimiento del aminoácido específico u otros restos químicos involucrados en la asociación de la

molécula con su par de unión nativo o anticuerpos conocidos. Un ejemplo de un agente seleccionado aleatoriamente es un agente que se identifica a través del uso y selección de una biblioteca química o una biblioteca de péptido combinatorio. Como se usa en este documento, se dice que un agente se elige o se diseña en forma racional cuando el agente se elige en una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del sitio de destino y/o su conformación en conexión con la acción del agente. Los agentes pueden seleccionarse racionalmente o diseñarse racionalmente mediante el uso de secuencias de péptidos que conforman los puntos de contacto del receptor /ligando y/o complejo anticuerpo CD3/anti-CD3. Por ejemplo, un agente peptídico seleccionado en forma racional puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a un epítipo que aparece en CD3 mientras se expone sobre la superficie de una célula viva en su entorno nativo. Dicho agente reducirá o bloqueará la asociación del anti-CD3 anticuerpo con CD3, o la asociación de CD3 con su ligando nativo, según se desee, por unión del anticuerpo anti-CD3 o al ligando nativo.

Como se usa en este documento, el término “marcado,” con respecto a un anticuerpo, pretende abarcar la marca directa del anticuerpo por acoplamiento de (es decir, unión física) una sustancia detectable, tales como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ej. ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (se conoce también como fluoroisotiocianato o FITC)) al anticuerpo, así como también marca indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable.

Como se usa en este documento, el término “asociación,” con respecto a un anticuerpo, incluye la unión covalente o no covalente o unión de un agente (por ej., agente quimioterapéutico) al anticuerpo. El anticuerpo puede estar asociado con un agente (por ej., agente quimioterapéutico) por unión directa o unión indirecta por medio de unión a una plataforma común, de manera tal que el anticuerpo dirige la localización del agente a la célula cancerosa a la cual el anticuerpo se une y en donde el anticuerpo y el agente no se disocian en forma sustancial en condiciones fisiológicas de manera tal que el agente no se orienta a la misma célula cancerosa a la cual el anticuerpo se une o de manera tal que la potencia del agente no se reduce.

El término “muestra biológica” abarca una variedad de tipos de muestra obtenidos de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de monitoreo. La definición abarca saliva, sangre y otras muestras de líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como una muestra para biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los anteriores, y la progenie de las mismas, por ejemplo, células obtenidas de una muestra de tejido recolectada de un individuo que se sospecha que tiene cáncer, en realizaciones preferidas de tejido de ovario, pulmón, próstata, páncreas, colon, y mamario. La definición incluye, además, muestras que se han manipulado de algún modo después de la obtención, tales como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o sumergiendo en una matriz semi-sólida o sólida para fines de seccionamiento. El término “muestra biológica” abarca una muestra clínica, e incluye, además, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisatos celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejidos.

El término “célula huésped” incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para vector(es) para incorporación de las inserciones de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una célula huésped individual, y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula progenitora original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con uno o más polinucleótidos de esta divulgación.

Como se usa en este documento, una “cantidad efectiva” de una composición farmacéutica, en una realización, es una cantidad suficiente para efectuar los resultados beneficiosos o deseados que incluyen, sin limitación, resultados clínicos tales como encogimiento del tamaño o la velocidad de crecimiento de un tumor, demora o atenuación de una reacción inflamatoria, aumento de la calidad de vida de aquellos que sufren una enfermedad, reducción de la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar dicha enfermedad, intensificación del efecto de otra medicación tales como por medio de direccionamiento y/o internalización, demora en la progresión de la enfermedad, y/o prolongación de la sobrevida de los individuos. Dicha cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad efectiva de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para aliviar una afección clínica observable.

En algunas realizaciones, una cantidad efectiva de un medicamento, compuesto, o composición farmacéutica puede o no lograrse en conjunción con otro medicamento, compuesto, o composición farmacéutica. De este modo, una “cantidad efectiva” puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes adicionales, y un agente único puede considerarse que se administra en una cantidad efectiva si, en conjunción con uno o más agentes distintos, puede lograrse o se logra un resultado deseable. Mientras que el individuo necesita variar, la determinación de los rangos óptimos de las cantidades efectivas de cada componente está dentro de la habilidad en la materia. La dosificación típica administrada a un paciente es normalmente 0,0001 mg/kg hasta 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Con preferencia, la dosificación administrada a un paciente es entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg hasta 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación y frecuencia de administración de las moléculas de la divulgación puede reducirse o alterarse potenciando la captación y penetración al tejido de las moléculas de la divulgación por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

Como se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico o agente, anticuerpo, composición o célula, etc., se dice que se "aisla" cuando esa molécula de ácido nucleico, agente, anticuerpo, composición o célula, etc. se separa en forma sustancial de moléculas de ácido nucleico contaminantes, anticuerpos, agentes, composiciones, o células, etc. presentes naturalmente en su fuente original.

- 5 El término "individuo" se refiere a un animal vertebrado, con preferencia un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque no se limitan a, humanos, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, ratones y ratas. En la realización más preferida, el término individual denota un humano.

Los términos "polipéptido," "oligopéptido," "péptido" y "proteína" se usan en forma indistinta en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de unión de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tales como conjugación con un componente de rotulado. Se incluyen además dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como también otras modificaciones conocidas en la materia. Se entenderá que, debido a que los polipéptidos de esta invención se basan en un anticuerpo, los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas individuales o cadenas asociadas.

Como se usa en este documento, el término "en forma sustancial puro" se refiere a un material que es por lo menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), con mayor preferencia por lo menos 90 % puro, con mayor preferencia por lo menos 95% puro, con mayor preferencia por lo menos 98% puro, con mayor preferencia por lo menos 99% puro, y con mayor preferencia más de 99% puro.

Como se usa en este documento, el término "toxina" se refiere a cualquier sustancia que efectúa una respuesta adversa dentro de una célula. Por ejemplo, una toxina orientada a una célula cancerosa tendría un efecto adverso, en ocasiones perjudicial, sobre la célula cancerosa. Algunos ejemplos de toxinas incluyen, aunque no se limitan a, un taxano, un maytansinoide, una auristatina (por ej., monometil auristatina (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), auristatina E (AE), etc.) (tales como aquellos se divulga en las Patentes de EE. UU. Nros. 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,441,163; 6,596,757; 7,276,497; 7,585,857; o 7,851,432), una calicheamicina, una antraciclina (por ej., doxorubicina), un análogo de CC-1065, docetaxel; catepsina B o E; ricina, gelonina, exotoxina Pseudomonas, toxina de difteria, y RNasa; anticuerpos radiomarcados (por ej., conjugado con tiuxetano o marcado con un radioisótopo tóxico (por ejemplo, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²⁵Ac, etc.).

Como se usa en este documento, los términos "tratamiento" o "tratar" denotan un método para obtener un resultado deseado o beneficioso que incluyen y con preferencia un resultado clínico deseado o beneficioso. Dichos resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, aunque no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducir la inflamación o una respuesta autoinmune, reducir la proliferación de (o destruir) las células cancerosas u otras células enfermas, reducir la metástasis de las células cancerosas encontradas en cánceres, contracción del tamaño del tumor, reducir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que sufren de la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, demorar la progresión de la enfermedad, y /o prolongar la sobrevivida de los individuos.

40 II. Métodos de elaboración de los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención

Los métodos para producir los anticuerpos monoclonales se conocen en la materia. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. *et al.* (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256:495-497 o una de sus modificaciones. Normalmente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en especies no humanas, tales como ratón. En general, se usa un ratón o rata para inmunización, pero otros animales también pueden usarse. Los anticuerpos se producen por inmunización de ratones con una cantidad inmunogénica de células, extractos celulares o preparaciones de proteínas que contienen CD3 humano. El inmunógeno puede ser, pero no se limita a, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, ácidos nucleicos o tejido.

En una realización, los anticuerpos monoclonales que se unen a CD3 se obtienen por medio del uso de células huésped que sobreexpresan CD3 como un inmunógeno. Dichas células incluyen, por medio de ejemplo y no como limitación, células T humanas.

Para monitorear la respuesta del anticuerpo, una pequeña muestra biológica (por ej., sangre) puede obtenerse de un animal y analizarse para determinar el título de anticuerpo contra el inmunógeno. Los nodos linfáticos del bazo y/o varios otros grandes pueden removerse y disociarse en células individuales. Si se desea, las células del bazo pueden seleccionarse (luego de la eliminación de células adherentes no específicas) mediante la aplicación de una suspensión celular a una placa o a un pocillo recubierto con el antígeno. Las células B, que expresan inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa, y no se enjuagan con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, pueden fusionarse luego

- con células de mieloma (por ej., X63- Ag8,653 y aquellas del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA). Puede usarse polietilenglicol (PEG) para fusionar el bazo o los linfocitos con células de mieloma para formar un hibridoma. El hibridoma a continuación se cultiva en medio selectivo (por ej., hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, conocido de otro modo como "medio HAT"). Los hibridomas resultantes a continuación se colocan en placas limitando la dilución, y se evalúan para determinar la producción de los anticuerpos que se unen específicamente al inmunógeno, usando, por ejemplo, FACS (la clasificación celular activada por fluorescencia) o selección inmunohistoquímica (IHC). Los hibridomas que secretan anticuerpo monoclonal seleccionados a continuación se cultivan ya sea *in vitro* (por ej., en frascos de cultivo de tejidos o reactores de fibra huecos), o *in vivo* (por ej., como ascitis en ratones).
- 5
- 10 Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden usarse células B inmovilizadas con virus de Epstein-Barr (EBV) para producir anticuerpos monoclonales de la presente invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se evalúan en cuanto a la actividad antiinmunógena mediante procedimientos de ensayo convencionales (por ej., FACS, IHC, radioinmunoensayo, inmunoensayo por enzima, inmunoensayo por fluorescencia, etc.).
- 15 En otra alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y cualquier otro anticuerpo equivalente puede secuenciarse y producirse en forma recombinante y por cualquier medio conocido en la materia (por ej., humanización, uso de ratones transgénicos para producir anticuerpos totalmente humanos, tecnología de visualización de fago, etc.). En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD3 se secuencia y la secuencia de polinucleótidos a continuación se clona en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede expandirse entonces y congelarse para uso futuro.
- 20
- La secuencia de polinucleótidos de anticuerpo monoclonal anti-CD3 y cualquier otro anticuerpo equivalente puede usarse para manipulación genética para generar un anticuerpo "humanizado", para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. El principio general en la humanización de un anticuerpo incluye retener la secuencia básica de la porción que se une al antígeno del anticuerpo, mientras que se barre el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpo humanas. Hay cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar la secuencia de aminoácidos anticipada y de nucleótidos de los dominios variables de anticuerpo liviano y pesado de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región de marco del anticuerpo usar durante el proceso de humanización (3) las técnicas/metodologías de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nros. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; y 6,331,415.
- 25
- 30 Se han descrito una cantidad de moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprenden un sitio que se une al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, que incluyen anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedores modificadas o de roedores y sus regiones determinantes de complementariedad asociadas (CDR) fusionadas a dominios constantes humanos (véase, por ejemplo, Winter *et al.* (1991) "Man-made Antibodies," *Nature* 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," *J. Immunol.* 138:4534-4538, y Brown *et al.* (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody," *Cancer Res.* 47:3577-3583). Otras referencias describen CDR de roedores injertadas en una región de marco (FR) de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," *Science* 239:1534-1536; y Jones *et al.* (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," *Nature* 321:522-525). Otra referencia describe CDR de roedores soportadas por regiones de marco de roedores revestidas en forma recombinante. Véase, por ejemplo, Publicación de la Patente Europea Nro. 519,596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñaron para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo antihumano en roedores, que limitan la duración y la efectividad de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Otros métodos de humanizar anticuerpos que también puede usarse se divulgan en Daugherty *et al.* (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 y en las Patentes de EE. UU. Nros. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; y 5,866,692.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 La divulgación abarca, además, fragmentos de la región variable de cadena simple ("scFv") de los anticuerpos de esta invención, tales como mu-anti-CD3. Los fragmentos de la región variable de cadena simple se realizan ligando regiones variables de cadena liviana y/o pesada por medio del uso de un péptido de ligadura corta. Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426 describe el ejemplo de ligar péptidos que forman puente de aproximadamente 3,5 nm entre el término carboxi de una región variable y el término amino de la otra región variable. Las ligaduras de otras secuencias se han diseñado y usado (Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426). Las ligaduras pueden a su vez modificarse para lograr funciones adicionales tales como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena simple pueden producirse ya sea por forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, un plásmido apropiado que contiene el
- 60

polinucleótido que codifica el scFv puede introducirse en una célula huésped apropiada, ya sea eucariótica, tales como células de levadura, planta, insecto o mamíferos, o procarióticas, tales como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden hacerse por manipulaciones de rutina tales como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse con el uso de técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la materia.

5 La divulgación incluye modificaciones a los anticuerpos anti-CD3 y sus fragmentos de unión. La modificación de polipéptidos es práctica de rutina en la materia y no necesita describirse en detalle aquí. Algunos ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente en forma perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse en forma conservadora por otro incluyen aunque no se limitan a: glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como también polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glicosilación con azúcares diferentes, acetilación, y fosforilación. Con preferencia, las sustituciones de aminoácidos serían conservadoras, es decir, el aminoácido sustituido poseería propiedades químicas similares a la del aminoácido original. Dichas sustituciones conservadoras se conocen en la materia, y los ejemplos se han proporcionado con anterioridad. Las modificaciones de aminoácidos pueden oscilar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos para completar el rediseño de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. Otros métodos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, que incluyen, aunque sin limitarse a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones pueden usarse, por ejemplo, para unión de rótulos para inmunoensayo, tal como la unión de restos radiactivos para radioinmunoensayo. Los polipéptidos modificados se realizan con el uso de procedimientos establecidos en la materia y pueden seleccionarse con el uso de ensayos estándar conocidos en la materia.

El hecho de que una sola alteración en el aminoácido de un residuo de CDR pueda producir la pérdida de unión funcional (Rudikoff, S. *etc.* (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983) proporciona un medio para identificar sistemáticamente secuencias de CDR funcionales alternativas. En un método preferido para obtener dichas CDR variantes, un polinucleótido que codifica la CDR se mutageniza (por ejemplo por medio de mutagénesis aleatoria o por un método dirigido al sitio (por ej., amplificación mediada por cadena de polimerasa con cebadores que codifican el lugar mutado)) para producir una CDR que tiene un residuo de aminoácidos sustituido. Al comparar la identidad del residuo relevante en su secuencia de CDR original (funcional) con la identidad de la secuencia de CDR variante sustituida (no funcional), el puntaje de sustitución BLOSUM62.ijj para esa sustitución puede identificarse. El sistema BLOSUM proporciona una matriz de sustituciones de aminoácidos creadas por análisis de una base de datos de secuencias para alineaciones de confianza (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919; Karlin, S. *et al.* (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565. Actualmente, la base de datos BLOSUM más avanzada es la base de datos BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). La **Tabla 1** presenta los puntajes de sustitución BLOSUM62.ijj (cuanto mayor puntaje más conservativa es la sustitución y de este modo más probable que la sustitución no afecte la función). Si un fragmento que se une al antígeno que comprende la CDR resultante no logra unirse a CD3, entonces el puntaje de sustitución BLOSUM62.ijj se considera insuficientemente conservador, y se selecciona un nuevo candidato de sustitución y se produce tal que tenga un mayor puntaje de sustitución. De este modo, por ejemplo, si el residuo original fuera glutamato (E), y el residuo sustituido no funcional fuera histidina (H), entonces el puntaje de sustitución por BLOSUM62.ijj será 0, y se prefieren cambios más conservadores (tales como a aspartato, asparagina, glutamina, o lisina).

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2

G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

La mutagénesis aleatoria se puede usar para identificar CDR mejorados. La tecnología de visualización de fago puede usarse en forma alternativa para aumentar (o reducir) la afinidad de CDR. Esta tecnología, denominada maduración por afinidad, emplea mutagénesis o "recorrido de CDR" y la reselección usa el antígeno de destino o un fragmento antigénico de los anteriores para identificar los anticuerpos que tienen CDR que se unen con mayor (o menor) afinidad al antígeno cuando se compara con el anticuerpo inicial o de origen (Véase, por ej. Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149:3903). Mutagenizar codones enteros en lugar de nucleótidos individuales produce un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un grupo de clones variantes cada uno de los cuales difiere por una sola alteración de aminoácidos en un CDR individual y que contiene variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada residuo de CDR. Los mutantes con mayor (o menor) afinidad de unión por el antígeno puede seleccionarse por medio del contacto de los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Cualquier método de selección conocido en la materia puede usarse para identificar anticuerpos mutantes con mayor o menor afinidad por el antígeno (por ej., ELISA) (Véase Wu *et al.* 1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155:1994). El recorrido de CDR que aleatoriza la cadena liviana puede hacerse posible (Véase Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551).

Los métodos para lograr dicha maduración por afinidad se describen por ejemplo en: Krause, J.C. *et al.* (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function of a Human Antibody," *MBio*. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. *et al.* (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cáncer* 10,1002/ijc.25645; Hackel, B.J. *et al.* (2010) "Stability and CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. *et al.* (2009) "Affinity Maturation And Characterization of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. *et al.* (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived from A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. *et al.* (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. *et al.* (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," *Métodos Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. *et al.* (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; y Barderas, R. *et al.* (2008) "Affinity maturation of antibodies assisted by *in silico* modeling," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034. En una realización preferida, las placas de múltiples pocillos pueden recubrirse con un anticuerpo CD3 seleccionado (por ej., 100 ng/pocillo en tampón de carbonato a temperatura ambiente durante 2 h) y posteriormente incubarse con CD3 soluble agregado a una dilución de 1/10 e incubado a temperatura ambiente durante 16 h o diluido hasta una concentración de 50 ng/ml en PBS-T-BSA (0,05 ml agregados a cada pocillo e incubados durante por lo menos 2 h a temperatura ambiente). La placa luego se lava y las diluciones de anticuerpos recombinantes comenzando con 0,5 µg/ml en PBS-T-BSA se agregan a continuación y se incuban durante 1 h a temp. ambiente. La unión de anticuerpos recombinantes al antígeno capturado se mide luego con el uso de, por ejemplo, un conjugado IgG-HRP anti-humano y sustrato de TMB. Luego de detener el desarrollo de color con el uso de ácido sulfúrico diluido, la placa se lee a 450 nM y se identifican los anticuerpos con mayor afinidad (véase, por ej., Patente de los Estados Unidos Nro. 7,351,803).

La divulgación incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de esta divulgación. Los polipéptidos de esta divulgación pueden realizarse por procedimientos conocidos en la materia. Los polipéptidos pueden producirse por proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, por métodos recombinantes (es decir, polipéptidos de fusión o simples) como se describió con anterioridad o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, en especial polipéptidos más cortos hasta alrededor de 50 aminoácidos, se realizan en forma conveniente por síntesis química. Los métodos de síntesis química se conocen en la materia y se encuentran disponibles en el mercado. Por ejemplo, un polipéptido anti-CD3 podría producirse por un sintetizador de polipéptidos automatizado que emplea el método de la fase sólida.

La divulgación abarca, además, proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los polipéptidos y los anticuerpos de esta divulgación. En una realización, se provee un polipéptido de fusión que comprende por lo menos 10 aminoácidos contiguos de región variable de cadena liviana y por lo menos 10 aminoácidos de región variable de cadena pesada. En otra realización, el polipéptido de fusión contiene una región constante de inmunoglobulina heteróloga. En otra realización, el polipéptido de fusión contiene una región variable de cadena liviana y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado en forma pública. Para los fines de esta divulgación, una proteína de fusión del anticuerpo contiene uno o más dominios de polipéptidos que se unen en forma específica a CD3 y otra secuencia de aminoácidos a la cual no se une en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región.

Un polipéptido anti-CD3, y otros agonistas de CD3, antagonistas y moduladores pueden crearse por métodos conocidos en la materia, por ejemplo, en forma sintética o en forma recombinante. Un método para producir dichas moléculas incluye síntesis química del polipéptido, seguido de tratamiento en condiciones oxidativas apropiado para obtener la conformación nativa, es decir, las ligaduras correctas de enlace de disulfuro. Esto puede lograrse con el uso de metodologías muy conocidas por aquellas personas expertas en la materia (véase, por ej., Kelley, R. F. *et al.* (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M. *et al.* (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; véase también las Patentes de EE. UU. Nro. 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; y 3,862,925).

Los polipéptidos de la divulgación pueden prepararse en forma conveniente con el uso de síntesis de péptidos de fase sólida (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," *Science* 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," *Mini Rev. Med. Chem.* 6(1):3-10).

Incluso en otra alternativa, los anticuerpos totalmente humanos pueden obtenerse a través del uso de ratones disponible en el mercado que se han diseñado para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. Los animales transgénicos que están diseñados para producir una respuesta inmunológica más deseable (por ej., anticuerpos totalmente humanos) o más robusta también pueden usarse para la generación de anticuerpos humanos o humanizados. Algunos ejemplos de dicha tecnología son XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) y HuMAB-MOUSE® y TC MOUSE™ (ambos de Medarex, Inc., Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos pueden hacerse en forma recombinante y expresarse con el uso de cualquier método conocido en la materia. Los anticuerpos pueden hacerse en forma recombinante primero aislando los anticuerpos hechos de animales huésped, obteniendo la secuencia génica, y con el uso de la secuencia génica para expresar el anticuerpo en forma recombinante en células huésped (por ej., células CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (por ej., tabaco) o leche transgénica. Los métodos apropiados para expresar anticuerpos en forma recombinante en plantas o leche se han divulgado (véase, por ejemplo, Peeters *et al.* (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. *et al.* (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Int. Rev. Immunol* 13:65-93; y Pollock *et al.* (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," *J. Immunol Methods* 231:147-157). Los métodos apropiados para hacer derivados de los anticuerpos, por ej., humanizados, de cadena simple, etc. se conocen en la materia. En otra alternativa, los anticuerpos pueden realizarse en forma recombinante por la tecnología de visualización de fago (véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nros. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; y Winter, G. *et al.* (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," *Annu. Rev. Immunol.* 12,433-455).

Los anticuerpos o proteína de interés pueden someterse a secuenciación por degradación de Edman, la cual es muy conocida para aquellas personas con experiencia en la materia. La información de péptidos generada de la espectrometría de masa o la degradación de Edman puede usarse para diseñar sondas o cebadores que se usan para clonar la proteína de interés.

Un método alternativo de clonación de la proteína de interés es por "abanico" con el uso de CD3 purificado o porciones de los anteriores para células que expresan el anticuerpo o proteína de interés. El procedimiento de "abanico" puede conducirse obteniendo una biblioteca de ADNc de tejidos o células que expresan CD3, sobre-expresando los ADNc en un segundo tipo de célula, y seleccionando las células transfectadas del segundo Tipo de Célula para una unión específica a CD3. Las descripciones detalladas de los métodos usados en la clonación de genes de mamífero que codifican proteínas de la superficie celular por "abanico" pueden encontrarse en la materia

(véase, por ejemplo, Aruffo, A. *et al.* (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 y Stephan, J. *et al.* (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," Endocrinol. 140:5841-5854).

5 Los ADNc que codifican anticuerpos anti-CD3, y otros agonistas de péptidos CD3, antagonistas y modulares pueden obtenerse por transcripción inversa de los ARNm de un tipo de célula particular de acuerdo con métodos estándar en la materia. Específicamente, el ARNm puede aislarse con el uso de varias enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con procedimientos que se establecen en la, por ejemplo, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Third Edition (Sambrook *et al.* Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) o extraerse con el uso
10 de resinas que se unen a ácido nucleico disponibles en el mercado siguiendo las instrucciones adjuntas de los fabricantes (por ej., Qiagen, Invitrogen, Promega). Los ADNc sintetizados pueden introducirse entonces en un vector de expresión para producir el anticuerpo o proteína de interés en células de un segundo tipo. Se implica que un vector de expresión debe ser susceptible de replicarse en las células huésped ya sea en un episoma o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión apropiados incluyen aunque no se limitan a plásmidos,
15 vectores virales, que incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, y cósmidos.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de una cantidad de medios apropiados, que incluyen electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE- dextran u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ej., donde el vector es un agente infeccioso tal como virus de vaccinia). La elección de introducir
20 vectores o polinucleótidos con frecuencia dependerá de las características de la célula huésped.

Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos puede usarse para los fines de aislamiento de los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Algunos ejemplos no limitativos de células huésped de mamífero apropiadas incluyen aunque no se limitan a células COS, HeLa, y CHO. Con preferencia, las células huésped expresan los ADNc en un nivel de alrededor de 5 veces más alto, con mayor preferencia 10 veces
25 más alto, incluso con mayor preferencia 20 veces más alto que el del correspondiente anticuerpo endógeno o proteína de interés, si está presente, en las células huésped. La selección de las células huésped para determinar una unión específica a CD3 se efectúa por inmunoensayo o FACS. Una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés puede identificarse.

III. Métodos para Selección de Polipéptidos y Anticuerpos monoclonales

30 Varios métodos pueden usarse para seleccionar polipéptidos y anticuerpos monoclonales que se unen a CD3. Se entenderá que "unión" se refiere a unión biológicamente o inmunológicamente relevante, específica, y no se refiere a una unión no específica que puede ocurrir, por ejemplo, cuando una inmunoglobulina se usa en una concentración muy elevada contra un blanco no específico. En una realización, los anticuerpos monoclonales se seleccionan para determinar la unión a CD3 con el uso de técnicas de selección estándar. De este modo, se obtuvo el anticuerpo
35 monoclonal anti-CD3. Los hibridomas preferidos son aquellos que producen anticuerpos mAb1 y mAb2, o sus derivados quiméricos o humanizados. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales que se unen a CD3 adicionales pueden identificarse. Para este fin, los anticuerpos monoclonales se seleccionan para determinar su capacidad diferencial de unirse a un CD3 humano así como también a un CD3 de primate.

Puede utilizarse cualquiera de los varios sistemas de detección diferentes para detectar la unión de los anticuerpos a la sección de tejidos. Normalmente, la inmunohistoquímica incluye la unión de un anticuerpo primario al mismo tejido y luego un anticuerpo secundario reactivo contra la especie de anticuerpo primario se generó y se conjugó con un marcador detectable (por ej., peroxidasa de rábano (HRP), o diaminobenzedina (DAB)). Un método alternativo que
40 puede usarse es la imagen espejo policlona complementaria de anticuerpos o poliMICA™ (polyclonal Mirror Image Complementary Antibodies; The Binding Site Limited, Birmingham, UK; Mangham, D.C. *et al.* (1999) "A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies (MICA)," Histopathology 35(2):129-33). La técnica de PolyMICA™ puede usarse para evaluar la unión de anticuerpos primarios (por ej., anticuerpos anti-CD3) a tejido normal y canceroso. Varias clases de kits de detección poliMICA™ se encuentran disponibles en el mercado: Nro. de Producto HK004.D es un kit de detección poliMICA™ que usa el cromógeno DAB; Nro. de Producto HK004.A es un kit de detección poliMICA™ que usa el cromógeno AEC. En forma
45 alternativa, el anticuerpo primario puede marcarse directamente con el marcador detectable.

IV. Métodos de caracterización de anticuerpos anti-CD3

Cualquiera de varios métodos puede usarse para caracterizar anticuerpos anti-CD3. Un método es identificar el epítipo al cual se une. El mapeo de epítipo está disponible en el mercado de varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Lelystad, Países Bajos). El mapeo de epítipo puede usarse para determinar la secuencia a la cual se une
50 un anticuerpo anti-CD3. El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un tramo único de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por la interacción tridimensional de aminoácidos que no necesariamente tienen que incluirse en un tramo simple.

Los péptidos de longitudes variables (por ej., con preferencia por lo menos 4-6 aminoácidos de longitud) pueden aislarse o sintetizarse (por ej., en forma recombinante) y usarse para los ensayos de unión con anticuerpo anti-CD3. El epítoto al cual el anticuerpo anti-CD3 se une puede determinarse en una selección sistemática por medio del uso de péptidos de superposición derivados de la secuencia extracelular y determinando la unión producida por el anticuerpo anti-CD3.

Incluso otro método que puede usarse para caracterizar un anticuerpo anti-CD3 es el uso de ensayos de competición con otros anticuerpos conocidos por unirse al mismo antígeno, es decir, CD3 para determinar si los anticuerpos anti-CD3 se unen al mismo epítoto que otros anticuerpos. Algunos ejemplos de anticuerpos disponibles en el mercado para CD3 pueden estar disponibles y pueden identificarse con el uso de ensayos de unión enseñados en este documento. Los ensayos de competición se conocen muy bien para aquellas personas con experiencia en la materia, y dichos procedimientos y los datos ilustrativos se detallan en forma adicional en los Ejemplos. Los anticuerpos anti-CD3 pueden caracterizarse en forma adicional por los tejidos, tipo de cáncer o tipo de tumor al cual se unen.

V. Composiciones preferidas de la presente divulgación

La presente divulgación abarca composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos anti-CD3, polipéptidos derivados de anticuerpos anti-CD3, polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican los anticuerpos anti-CD3, y otros agentes como se describe en este documento. La divulgación se refiere en forma adicional a conjugados de cualquier agonista del péptido CD3, antagonista o modulador, y estructuras químicas adicionales que justifican la función pretendida o las funciones del agonista, antagonista o modulador del péptido CD3 particular. Estos conjugados incluyen agonista, antagonista o modulador del péptido CD3 unido en forma covalente a una macromolécula tal como cualquier matriz de soporte sólida, insoluble usada en los procedimientos de diagnóstico, selección o purificación discutidos en este documento. Los materiales de matriz apropiados incluyen cualquier sustancia que sea químicamente inerte, tenga alta porosidad y tenga grandes cantidades de grupos funcionales capaces de formar ligaduras covalentes con ligandos peptídicos. Algunos ejemplos de materiales de matriz y procedimientos para la preparación de conjugados matriz-ligando se describen en Dean *et al.* (Eds) AFFINITY CHROMATOGRAPHY: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1985); Lowe, "An Introduction to Affinity Chromatography", en Work *et al.* (eds) LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 7, Part II, North-Holland (1979); Porath *et al.*, "Biospecific Affinity Chromatography", en Neurath, H. *et al.* (eds), THE PROTEINS, 3^a ed., Vol. 1, pp. 95-178 (1975); y Schott, H. AFFINITY CHROMATOGRAPHY, Macel Dekker, Inc. NY (1984).

Se proveen además en este documento conjugados del agonista, antagonista o modulador del péptido CD3 y cualquier resto informante usado en los procedimientos de diagnóstico discutidos en este documento. Los agentes agonistas, antagonistas o moduladores del péptido CD3, polipéptidos y proteínas de esta invención, que incluyen anticuerpos anti-CD3, se identifican en forma adicional y se caracterizan por cualquiera (uno o más) de los siguientes criterios:

- (1) una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 humano según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T humana normal;
- (2) una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 humano según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T de leucemia humana;
- (3) una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 no humano (por ej., CD3 de mono macaco) según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T no humana normal;
- (4) una capacidad de unirse en forma específica a un CD3 no humano según se expresa en forma endógena sobre la superficie de una célula T de leucemia no humana;
- (5) una capacidad de neutralizar (es decir, bloquear o interferir con la unión) la formación del complejo CD3; una capacidad de neutralizar la formación del complejo TCR;
- (6) una capacidad de modular (ya sea en forma antagonista o agonista) la señalización del complejo TCR;
- (7) una capacidad de unirse al receptor de Fc;
- (8) una capacidad de inhibir competitivamente la unión preferencial de un anticuerpo anti-CD3 conocido a CD3, que incluye la capacidad de unirse preferencialmente al mismo epítoto de CD3 al cual se une preferencialmente el anticuerpo original;
- (9) una capacidad de unirse a una porción de CD3 que se expone sobre la superficie de una célula viva *in vitro* o *in vivo*; una capacidad de unirse a una porción de CD3 que se expone sobre la superficie de una célula viva con cáncer;
- (10) una capacidad de administrar un agente quimioterapéutico en una célula T cancerosa;

y/o

(11) una capacidad de administrar un agente terapéutico, toxina o marcador detectable en una célula T.

Un anticuerpo preferido de la divulgación exhibirá manchado diferencial con IHC de tejido de tumor con relación a tejido no canceroso normal, y más aún será capaz de analizar en modelos de primate (y en particular mono macaco) de eficacia del anticuerpo. Los anticuerpos preferidos de la presente divulgación exhibirán en forma adicional niveles deseables de afinidad y especificidad por el antígeno. Los anticuerpos preferidos de la presente divulgación exhibirán en forma adicional niveles deseables de actividad inmunomoduladora e internalización celular.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo que se produce por hibridoma mAb1 o hibridoma mAb2, los cuales respectivamente expresan anticuerpo mAb1 murino y anticuerpo mAb2 murino, o la progenie de los anteriores. La presente divulgación abarca, además, varias formulaciones de los anticuerpos producidos por estos hibridomas y anticuerpos equivalentes o fragmentos de polipéptidos (por ej., Fab, Fab', F(ab')₂ Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, cadena simple (ScFv), mutantes de los anteriores, proteínas de fusión que comprende una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de cualquiera de estos o anticuerpos equivalentes que comprenden un antígeno (CD3), sitio de reconocimiento de la especificidad requerida. La divulgación también proporciona anticuerpos humanos que muestran una o más características biológicas de un miembro de la familia anti-CD3. Los anticuerpos equivalentes de la familia anti-CD3 (que incluyen anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos), fragmentos de polipéptidos, y polipéptidos que comprenden cualquiera de estos fragmentos se identifican y se caracterizan por cualquiera (uno o más) de los criterios descritos con anterioridad.

De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona cualquiera de los siguientes (o composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera de los siguientes): (a) un anticuerpo producido por la célula huésped o su progenie; (b) una forma humanizada de dicho anticuerpo; (c) un anticuerpo que comprende una o más de las regiones variables de cadena liviana y/o cadena pesada de dicho anticuerpo; (d) un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables homólogas o derivadas de regiones variables de una cadena pesada y una cadena liviana de dicho anticuerpo, y las regiones constantes homólogas o derivadas de las regiones constantes de una cadena pesada y una cadena liviana de un anticuerpo humano; (e) un anticuerpo que comprende una o más de las CDR de la cadena liviana y/o cadena pesada (por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) de dicho anticuerpo; (f) un anticuerpo que comprende una cadena pesada y/o cadena liviana de dicho anticuerpo; (g) un anticuerpo humano que es equivalente a dicho anticuerpo. Una forma humanizada del anticuerpo puede o no tener CDR idénticas al anticuerpo original, o anticuerpo producido por la célula huésped identificada con anterioridad. La determinación de regiones CDR se encuentra dentro de la experiencia en el arte. Otras realizaciones incluyen anticuerpos que tienen por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR que son en forma sustancial homólogas a por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado como se identificó en este documento, o derivado de dicho anticuerpo. Se entenderá que, para los fines de esta divulgación, la especificidad de unión y/o actividad general en general se mantiene, aunque el grado de actividad puede variar cuando se compara con un anticuerpo producido por un hibridoma depositado (puede ser mayor o menor). Los métodos para producir anticuerpos se conocen en la materia y se describen en este documento.

La divulgación también proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la divulgación. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una o más de las regiones variables de cadena liviana y/o cadena pesada del anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una o más de la cadena liviana y/o cadena pesada CDR del anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende tres CDR de la cadena liviana y/o cadena pesada del anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos del anticuerpo que tiene cualquiera de los siguientes: por lo menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia del anticuerpo original, por lo menos 8 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 10 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 15 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 20 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 25 aminoácidos contiguos, por lo menos alrededor de 30 aminoácidos contiguos, en donde por lo menos 3 de los aminoácidos son de una región variable del anticuerpo. En una realización, la región variable es de una cadena liviana del anticuerpo original. En otra realización, la región variable es de una cadena pesada del anticuerpo. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo.

Las células que expresan CD3, una porción de CD3, anticuerpos anti-CD3 u otros polipéptidos que se unen a CD3 de esta divulgación se pueden administrar directamente a un individuo para modular la actividad biológica de CD3 *in vivo*.

Los anticuerpos preferidos anti-CD3 de la presente divulgación son mAb1 y mAb2, y derivados humanizados o quiméricos y fragmentos que se unen al antígeno de los anteriores que son reactivos hacia la molécula CD3 humana y de macaco. Las secuencias de aminoácidos y polinucleótidos codificantes de la cadena variable liviana y cadena variable pesada de anticuerpos mAb1 y mAb2 murinos se muestran a continuación. Las secuencias de los CDR de los anticuerpos (mAb1 y mAb2) ejemplificativos se muestran en **negrita** y subrayados.

A. Secuencias de regiones variables de anticuerpo monoclonal murino mAb1

Secuencia de aminoácidos de Anticuerpo monoclonal murino mAb1 Cadena variable liviana (SEC ID NRO.:1):

QVVL~~TQSPAI~~ MSAFPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQOKSG TSPKRWIYDS
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMETE DAATYYCQQW SRNPPTFGGG TKLQITR

5 Secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb1 Cadena variable liviana (SEC ID NRO.:2):

caggtggtgc tgaccagtc ccccgccatc atgtccgct tccccggcga
 gaaagtgaca atgacctgct cgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact
 ggtatcagca gaagtccggc acctcccca agcgggtggat ctacgactcc
 10 tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga ttctctggct ccggctccgg
 caccagctac tcctgacca tctcctccat ggaaaccgag gacgccgcca
 cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc cccctacctt cggcggaggc
 accaagctgc agatcaccag a

Secuencia de aminoácidos de Anticuerpo monoclonal murino mAb1 Cadena variable pesada (SEC ID NRO.:3):

15 QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RSTMHWVKQR PGQGLEWIGY
INPSSAYTNY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCASPQ
VHYDYNGFY WGQGLVTVS S

Secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb1 Cadena variable pesada (SEC ID NRO.:4):

20 caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgctc
 cgtgaagatg tcctgcaagg cctccggeta caccttcacc cggccacca
 tgcactgggt gaaacagcgg cctggacagg gcctggaatg gatcggctac
 atcaaccct ccagcgccta caccaactac aaccagaagt tcaaggacaa
 ggccaccctg accgccgaca agtcctccag caccgcctac atgcagctgt
 25 cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgagc ctccccccag
 gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc
 tcc

B. Secuencias de regiones variables de anticuerpo monoclonal murino mAb2

Secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal murino mAb2 Cadena variable liviana (SEC ID NRO.:5):

30 QAVVTQESAL TTSPGETVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPDHLFTGLI
GGTNKRAPGV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb2 Cadena variable liviana (SEC ID NRO.:6):

35 caggccgtgg tgacacagga gtcagctctg accacatccc caggcgaac
 agtgactctg acctgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact
 acgctaattg ggtgcaggag aagcccgacc acctgttcac tgggctgatc
 ggcggaacca acaaaagggc acccggtgtg cctgcccggc tttctggcag
 tctgatcgga gacaaggccg ctctgacaat tactggcgcc cagacagagg

atgaagctat ttacttctgt gcaactgtgg atagcaatct gtgggtgttt
 ggggggtggca ccaaactgac agtgctggga

Secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal murino mAb2 Cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:7**):

EVKLLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
 5 IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

Secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb2 Cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:8**):

gagggtgaagc tgctggaaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc
 10 actgaaactg tcctgcgcgc cctccggctt cacctttaac acatacgcta
 tgaattgggt gcgacaggca cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg
 atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa
 ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt ctgtatctgc
 agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg
 15 cacggtaact tcggcaattc ttactgtctc tggtttgctt attggggaca
 ggggacactg gtgactgtgt cttcc

La posición 40 de la cadena pesada es un residuo ancla del péptido de unión de clase II de MHC de alta afinidad. Las posiciones 44, 48, 54, 94, 99 y 108 de la cadena pesada son residuos ancla de péptido de unión clase II, MHC, de afinidad moderada. La posición 69 de la cadena liviana es un residuo ancla del péptido de unión clase II, MHC, de alta afinidad. La posición 59 de la cadena liviana es un residuo ancla del péptido de unión clase II, MHC, de afinidad moderada. Estos residuos pueden sustituirse, con el uso de técnicas estándar de biología molecular, a un residuo con el fin de reducir o eliminar el sitio de reconocimiento de MHC clase II.

C. Anticuerpos CD3 diseñados por Fc

En la función inmunológica tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunológico produce un amplio abanico de respuestas, que oscila desde funciones efectoras tales como citotoxicidad que depende de los anticuerpos, desgranulación de mastocitos, y fagocitosis a las señales inmunomoduladoras tales como regular la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. La totalidad de estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunológicos a los receptores de la superficie celular especializados sobre células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por los anticuerpos y los complejos inmunológicos resulta de la heterogeneidad estructural de los tres receptores de Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD16) son receptores de activación (es decir, potenciadores del sistema inmunológico); FcγRIIB (CD32B) es un receptor de inhibición (es decir, disminución del sistema inmunológico). La secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 se muestra a continuación (como **SEC ID NRO.:9**, numerada de acuerdo con Kabat *et al.*, SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), denominadas de aquí en adelante "Kabat EU"). Los residuos 230-341 son la región CH2 de Fc. Los residuos 342-447 son la región CH3 de Fc:

SEC ID NRO.:9

	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
40	230	240	250	260	270
	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP
	280	290	300	310	320
	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV
	330	340	350	360	370
45	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH

380 390 400 410 420
 EALHNHYTQK SLSLSPGK
 430 440

5 Dado que los anticuerpos específicos de CD3 que no se unen a receptor de Fc (FcR) causan una disminución mínima, se ha propuesto que pueden alterar las señales de TCR en un modo que podría inducir tolerancia inmunológica (St. Clair E.W. (2009) “*Novel Targeted Therapies for Autoimmunity*,” Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657). De este modo, dicha terapia tiene potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y rechazo del tejido huésped vs. injerto. Los anticuerpos específicos de CD3 que no se unen a FcR también se han postulado para inducir remisión en la tolerancia a la diabetes mellitus tipo 1 (St. Clair E.W. (2009) “*Novel Targeted Therapies for Autoimmunity*,” Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657; Masharani, U.B. *et al.* (2010) “*Teplizumab Therapy For Type 1 Diabetes*,” Expert Opin. Biol. Ther. 10(3):459-465).

10 La presente divulgación de este modo incluye los anticuerpos que se unen en forma específica a CD3 que comprenden una región Fc variante que tiene regiones Fc que se modifican (por ej., sustituciones, eliminaciones, inserciones en una o más porciones) con el fin de ser incapaz o menos capaz de unirse al receptor de Fc (con relación a un anticuerpo que tiene las mismas CDR pero una región Fc de tipo salvaje).

15 En una realización, dichos anticuerpos serán incapaces de unirse a cualquier receptor de Fc. En forma alternativa, la región Fc del anticuerpo se modificará con el fin de permitir que se una a los receptores de Fc tales como FcγRIIB que son inhibidores, pero no a receptores de Fc tales como FcγRIIA, FcγRIIA o FcγRIIB que promueven la activación del sistema inmunológico.

20 Con preferencia, las propiedades de unión de las moléculas de la divulgación se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de la célula efectora del mediador de FcγR. Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas, por ej., anticuerpos, de la divulgación para un FcγR pueden determinarse con el uso de ensayos *in vitro* (ensayos con base bioquímica o inmunológica) conocidos en la materia para la determinación de anticuerpo-antígeno o interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un antígeno a un anticuerpo o la unión específica de una región de Fc a un FcγR, respectivamente, que incluyen aunque sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayo por resonancia plasmónica de superficie, ensayos de inmunoprecipitación. En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la divulgación tienen propiedades similares de unión en modelos *in vivo* (tales como aquellas que se describen y se divulgan en este documento) como aquellos ensayos de base *in vitro*. Sin embargo, la presente divulgación no excluye moléculas de la divulgación que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos de base *in vitro* pero sí que exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

25 En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación que comprenden una región Fc variante comprenden por lo menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH3 de la región Fc, que se define como aquella que se extiende de los aminoácidos 342-447. En otras realizaciones, las moléculas de la divulgación que comprenden una región Fc variante comprenden por lo menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, poseen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos) en el dominio CH2 de la región Fc, que se define como aquella que se extiende de los aminoácidos 231-341. En algunas realizaciones, las moléculas de la divulgación comprenden por lo menos dos modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, poseen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más modificaciones de aminoácidos), en donde por lo menos una de dichas modificaciones está en la región CH3 y por lo menos una de dichas modificaciones está en la región CH2. La divulgación abarca, además, la modificación de aminoácidos en la región de bisagra. En una realización particular, la divulgación abarca la modificación de aminoácidos en el dominio CH1 de la región Fc, que se define como aquella que se extiende de los aminoácidos 216-230.

35 En realizaciones particularmente preferidas, la divulgación abarca moléculas que comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o tiene una reducción en la actividad de ADCC y/o una reducida unión a FcγRIIA (CD32A), según se mide con el uso de métodos conocidos por los expertos en el arte y se ejemplifica en este documento. Los ensayos de ADCC usados de acuerdo con los métodos de la presente pueden ser dependientes de NK o dependientes de macrófago.

40 En realizaciones particularmente preferidas, la divulgación abarca moléculas que comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o tiene una reducción en la actividad de ADCC y/o una reducida unión a FcγRIIA (CD16A), según se mide con el uso de métodos conocidos por los expertos en el arte y se ejemplifica en este documento. Los ensayos de ADCC usados de acuerdo con los métodos de la presente pueden ser dependientes de NK o dependientes de macrófago.

45 Las variantes de Fc de la presente divulgación pueden combinarse con otras modificaciones de Fc, tales como aquellas divulgadas en las Patentes de EE. UU. Nros. 7,632,497; 7,521,542; 7,425,619; 7,416,727; 7,371,826; 7,355,008; 7,335,742; 7,332,581; 7,183,387; 7,122,637; y 6,737,056; en las Publicaciones por PCT Nros. WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; y en WO 04/063351; y en Presta, L.G. *et al.* (2002) “*Engineering therapeutic antibodies for improved function*,” Biochem. Soc. Trans. 30(4):487-490; Shields, R.L. *et al.* (2002) “*Lack of fucose on human*”

IgG1 N-linked Oligosaccharide Improves the Binding to human Fcγ3 and Antibody-Dependent cellular toxicity, J. Biol. Chem. 26:277(30):26733-26740 y Shields, R.L. et al. (2001) "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ1, Fc γ2, Fc γ3, and FcγR and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ3," J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604). La divulgación abarca combinar una variante Fc de la divulgación con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas al anticuerpo modificado.

En otras realizaciones, la divulgación abarca el uso de cualquier variante de Fc conocida en la materia, tales como aquellas divulgadas en Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fcγ3: Current Models," Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc γ1, Fc γ2, Fc γ3, And FcγR And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc γ3," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody with A Human IgG Fc," J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcγ3 Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(γ3)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions" Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc γ3 Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A γ4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc γ3 Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc γ3 Receptors," FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc γ1," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc γ1 And Fc γ2 Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332:563-564; Patentes de EE. UU. Nros. 5,624,821; 5,885,573; 6,194,551; 7,276,586; y 7,317,091; y Publicaciones por PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación comprende una región Fc variante (que incluye un Fc derivado de cualquier inmunoglobulina humana tipo (por ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), o clase (por ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂) o subclase), en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido con relación a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante exhibe unión reducida o nula a uno o más ligandos efectores según se determina por ensayos estándar conocidos en la materia y divulgados en este documento, con relación a una molécula comparable que comprende la región Fc tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el dominio de Fc variante del anticuerpo de la divulgación comprende una modificación de aminoácidos (es decir, inserción, sustitución, eliminación) en uno o más de los residuos 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 270, 297, 298, 299. En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que reducen o anulan la unión a uno o más ligandos efectores es una sustitución con fenilalanina o prolina en la posición 233; una sustitución con alanina en la posición 234; una sustitución con alanina o ácido glutámico en la posición 235; una sustitución con alanina en la posición 236, una sustitución con alanina en la posición 237, una sustitución con arginina en la posición 238; una sustitución con alanina o ácido glutámico en la posición 265; una sustitución con alanina o asparagina en la posición 270; una sustitución con alanina o glutamina en la posición 297; una sustitución con fenilalanina, asparagina o prolina en la posición 298; una sustitución con cualquier aminoácido en la posición 299 distinta de serina o treonina; o una combinación de dos o más de las sustituciones mencionadas con anterioridad. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación comprende un dominio Fc que tiene una sustitución con alanina en la posición 265 y en la posición 297; una sustitución con alanina en la posición 265 y con glutamina en la posición 297; una sustitución con ácido glutámico en la posición 265 y con alanina en la posición 297; o una sustitución con ácido glutámico en la posición 265 y con glutamina en la posición 297. En realizaciones preferidas, el anticuerpo de la divulgación comprende un dominio Fc que tiene una modificación (por ej., sustitución, inserción, eliminación) en la posición 234 y posición 235 de la región Fc. En un ejemplo específico de acuerdo con esta realización, el anticuerpo de la divulgación comprende un dominio Fc que tiene una sustitución en la posición 234 con alanina y una sustitución en la posición 235 con ácido glutámico. Incluso en otra realización más preferida, el anticuerpo de la divulgación comprende un Fc que tiene una sustitución con alanina en la posición 234 y una sustitución con alanina en la posición 235.

En otras realizaciones, el anticuerpo de la divulgación comprende una región Fc, cuya región Fc variante exhibe unión reducida o nula a uno o más ligandos efectores según se determina por ensayos estándar conocidos en la materia y divulgados en este documento, con relación a una molécula de control comparable. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación tiene una región Fc que exhibe unión reducida o nula a uno o más

ligandos efectores, cuya región Fc comprende una fenilalanina o prolina en la posición 233; una alanina en la posición 234; una alanina o ácido glutámico en la posición 235; una alanina en la posición 236, una alanina en la posición 237, una arginina en la posición 238; una alanina o ácido glutámico en la posición 265; una alanina o asparagina en la posición 270; una alanina o glutamina en la posición 297; una fenilalanina, asparagina o prolina en la posición 298; cualquier aminoácido en la posición 299 distinta de serina o treonina; o una combinación de dos o más de las sustituciones mencionadas con anterioridad. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación comprende un dominio Fc que tiene una alanina en la posición 265 y en la posición 297; una alanina en la posición 265 y una glutamina en la posición 297; un ácido glutámico en la posición 265 y una alanina en la posición 297; o un ácido glutámico en la posición 265 y una glutamina en la posición 297. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación comprende un dominio Fc que tiene una alanina en la posición 234 y un ácido glutámico en la posición 235. En realizaciones preferidas, el anticuerpo de la divulgación comprende un Fc que tiene una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235.

Los anticuerpos de la divulgación que comprenden un dominio Fc que tiene una alanina en las posiciones correspondientes a 234 y 235 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat se conocen como anticuerpos "ala-ala". En ciertas realizaciones, el uso de dominios Fc "ala-ala" y/u otras combinaciones de combinaciones de aminoácidos que se describen en este documento (que incluyen combinaciones que comprenden dominios Fc "ala-ala") pueden abolir la unión del dominio Fc a todos los FcγRs. La unión de un dominio Fc a uno o más FcγRs puede determinarse por cualquier método descrito en este documento y/o conocido en la materia.

En ciertas realizaciones, la una o más modificaciones de aminoácidos que abole la unión a todos los FcγRs o reduce o anula la unión a uno o más ligandos efectores comprenden combinaciones de las modificaciones enumeradas en este documento o combinaciones de las modificaciones enumeradas en este documento con cualquiera que pueda conferir unión nula a cualquier FcR (por ej., FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIIA) según se determina por los métodos divulgados en este documento o conocidos por los expertos en el arte. Como lo comprenderá ampliamente una persona experimentada en la materia, dichos anticuerpos de la divulgación pueden encontrar uso particular en el tratamiento de una enfermedad autoinmune en el sentido que los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos que se unen al antígeno sirven para modular la función inmune sin la respuesta asociada a la primera dosis común para los anticuerpos de células autoinmunes.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos que se unen al antígeno de la divulgación, o fragmentos que se unen al antígeno de los anteriores, tienen reducida (tales como, aunque sin limitarse a, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% o menos de 1% como cuando se compara con la unión de una proteína que comprende un dominio Fc de control) o, con mayor preferencia, ninguna unión detectable a uno o más de cualquier FcγR (por ej., FcγRI, FcγRII o FcγRIII) por medio de su dominio Fc según se determina por ensayos de rutina en la materia. Además o en forma alternativa, los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos que se unen al antígeno de la divulgación, o fragmentos que se unen al antígeno de los anteriores, pueden tener reducida (tales como, aunque sin limitarse a, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% o menos de 1% como cuando se compara con la unión por una proteína de control que comprende un dominio Fc de control) o, con mayor preferencia, ninguna unión detectable a cualquier receptor complementario, tal como, C1q, como se determina en ensayos usados como rutina. En realizaciones particulares, el anticuerpo es aglicosilado. En otras realizaciones, el anticuerpo carece de un dominio Fc (por ej., es un fragmento Fab, F(ab')₂ o cadena de anticuerpo simple).

Los anticuerpos de la divulgación de este modo son de particular utilidad porque tienen reducida o ninguna toxicidad *in vivo* causada por la producción de linfocinas o liberación de citoquinas. Los métodos de medición de la producción de linfocinas y liberación de citoquinas se conocen y son de rutina en la materia y se abarcan en este documento. Por ejemplo, la liberación de citoquinas puede medirse por medición de la secreción de citoquinas que incluyen aunque sin limitarse a Interleucina -2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-16 (IL-16), PDGF, TGF-α, TGF-β, TNF-α, TNF-β, GCSF, GM-CSF, MCSF, IFN-α, IFN-β, TFN-γ, IGF-I, IGF-II. Por ejemplo, véase, Isaacs et al., 2001, *Rheumatology*, 40: 724-738; Soubrane et al., 1993, *Blood*, 81(1): 15-19.

D. Diacuerpos CD3 DART™

Como se discutió con anterioridad, la presente divulgación en forma adicional abarca anticuerpos biespecíficos, específicos y multiespecíficos. Un ejemplo particularmente preferido de dichos anticuerpos comprende moléculas de diacuerpo "DART™" que comprenden por lo menos dos cadenas de polipéptidos que forman por lo menos dos sitios de unión a epítopes, por lo menos uno de los cuales se une en forma específica a CD3. Las moléculas de diacuerpo "DART™" ejemplificativas se divulgan en US20100174053, US20090060910, US20070004909, EP2158221, EP1868650, WO2010080538, WO2008157379, y WO2006113665.

En realizaciones preferidas, la primera cadena de polipéptido del diacuerpo DART™ comprende:

- (i) un dominio (A) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un epítope (1);

(ii) un dominio (B) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un epítotope (2); y

(iii) un dominio (C).

La segunda cadena de polipéptido de dicho diacuerpo DART™ comprende:

5 (i) un dominio (D) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2) específica para el epítotope (2);

(ii) un dominio (E) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específica para el epítotope (1); y

(iii) un dominio (F).

10 Los dominios del diacuerpo DART™ (A) y (B) no se asocian entre sí para formar un sitio que se une al epítotope. En forma similar, los dominios del diacuerpo DART™ (D) y (E) no se asocian entre sí para formar un sitio que se une al epítotope. Más bien, los dominios del diacuerpo DART™ (A) y (E) se asocian para formar un sitio de unión que se une al epítotope (1); dichos dominios del diacuerpo DART™ (B) y (D) se asocian para formar un sitio de unión que se une a dicho epítotope (2). Los dominios (C) y (F) se asocian entre sí en forma covalente.

15 Cada cadena de polipéptido de la molécula del diacuerpo DART™ comprende un dominio VL y un dominio VH, que están ligados en forma covalente de manera tal que los dominios no puedan autoensamblarse. La interacción de dos de las cadenas de polipéptidos producirá dos pares de VL-VH, formando dos sitios de unión al epítotope, es decir, una molécula bivalente. Ninguno de los dominios VH o VL se restringe a ninguna posición dentro de la cadena de polipéptidos, es decir, se restringe al término amino (N) o carboxi (C), como tampoco se restringen los dominios en sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio VL puede ser N-terminal al dominio VH y viceversa. La única restricción es que una cadena de polipéptido complementaria esté disponible con el fin de formar los diacuerpos DART™ funcionales. Donde los dominios VL y VH derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas complementarias de polipéptidos pueden ser idénticas. Por ejemplo, donde los dominios de unión derivan de un anticuerpo específico para el epítotope A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción VL_A-VH_A), cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas de polipéptidos del anticuerpo producirá la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, lo que produce un anticuerpo monoespecífico bivalente. Donde los dominios VL y VH derivan de anticuerpos específicos para diferentes antígenos, la formación de un diacuerpo funcional biespecífico DART™ requiere la interacción de dos cadenas de polipéptidos diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico DART™, una cadena de polipéptido comprenderá un VL_A y un VL_B; la homodimerización de dicha cadena producirá la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B, ya sea sin unión o de unión impredecible. En contraste, donde dos cadenas de polipéptidos diferentes estén libres para interactuar, por ej., en un sistema de expresión recombinante, uno que comprende un VL_A y un VH_B y el otro que comprende un VL_B y un VH_A, dos sitios de unión diferentes formarán: VL_A-VH_A y VL_B-VH_B. Para todos los pares de la cadena del polipéptido del diacuerpo DART™, la posibilidad de deficiencia de alineación o de unión de las dos cadenas es una posibilidad, es decir, la interacción de dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de diacuerpos funcionales se maneja fácilmente en base a la inmunoespecificidad del sitio de unión dimerizado apropiadamente con el uso de cualquier método basado en afinidad conocido en la técnica o ejemplificado en este documento, por ej., cromatografía por afinidad.

40 Una o más de las cadenas de polipéptidos del diacuerpo DART™ pueden comprender en forma opcional un dominio Fc o porción de los anteriores (por ej. un dominio CH2, o dominio CH3). El dominio Fc o porción de los anteriores puede derivar de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina que incluyen, aunque sin limitarse a, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio Fc (o porción de los anteriores) deriva de IgG. En realizaciones específicas, el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los anteriores. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, cuyo dominio Fc comprende un dominio CH2 y dominio CH3 seleccionado en forma independiente de cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de IgG y el dominio CH3 derivado de IgE, o el dominio CH2 derivado de IgG1 y el dominio CH3 derivado de IgG2, etc.). El dominio Fc puede diseñarse en una cadena de polipéptido que comprende la molécula de diacuerpo de la divulgación en cualquier posición con relación a otros dominios o porciones de dicha cadena de polipéptido (por ej., el dominio de Fc, o porción de los anteriores, puede ser del extremo terminal C para ambos dominios VL y VH del polipéptido de la cadena; puede ser n-terminal para ambos dominios VL y VH; o puede ser n-terminal para un dominio y de extremo terminal C para otro (es decir, entre dos dominios de la cadena de polipéptidos)).

55 Los dominios Fc en las cadenas de polipéptidos de las moléculas de diacuerpo DART™ dimerizarán con preferencia, lo que produce la formación de una molécula DART™ que exhibe propiedades similares a la inmunoglobulina, por ej., interacciones Fc-FcγR. Los diacuerpos que contienen Fc pueden ser dímeros, por ej., formados por dos cadenas de polipéptidos, donde cada una comprende un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de dichas cadenas de polipéptidos produce un diacuerpo DART™ bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la de un anticuerpo bivalente no modificado. Dichas moléculas de

5 diacuerpo DART™ exhibirán fenotipos alterados con relación a una inmunoglobulina de tipo salvaje, por ej., vida media sérica alterada, propiedades de unión, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo DART™ que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Dichos tetrámeros comprenden dos cadenas de polipéptidos “más pesadas”, es decir, una cadena de polipéptido que comprende un VL, un VH y un dominio Fc, y dos cadenas de polipéptidos “más livianas”, es decir, cadena de polipéptido que comprende un VL y un VH. Las cadenas más liviana y más pesada interactúan para formar un monómero, y dichos monómeros interactúan por medio de sus dominios Fc sin pares para formar una molécula con aspecto de Ig. Dicho diacuerpo DART™ con estructura de Ig es tetravalente y puede ser mono-específico, biespecífico o tetraespecífico.

VI. Métodos terapéuticos para el uso de los anticuerpos anti-CD3 de la presente divulgación

10 Los anticuerpos anti-CD3 de la presente divulgación y sus fragmentos que se unen al antígeno tienen utilidad particular en el tratamiento de los cánceres asociados con la expresión de CD3 y en el tratamiento de enfermedad autoinmune y otros trastornos inflamatorios.

15 Estos usos pueden incluir la formación de un complejo entre CD3 y un anticuerpo que se une específicamente a CD3. Algunos ejemplos de dichos anticuerpos incluyen aunque no se limitan a anticuerpos anti-CD3 monoclonales mAb1 y mAb2 o, con mayor preferencia, sus derivados humanizados. La formación de dicho complejo puede ser *in vitro* o *in vivo*. Sin intentar limitarse a la teoría, el anticuerpo anti-CD3 puede unirse a CD3 a través del dominio extracelular de CD3 y puede internalizarse dentro de una célula viva normal o con cáncer.

A. Tratamiento del cáncer

20 Los anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno de la presente divulgación se unen a CD3 presente sobre la superficie de las células T. Los fragmentos que se unen al antígeno de la presente divulgación pueden usarse en el contexto de una molécula biespecífica (o trispecífica o multiespecífica), tales como una molécula DART o BiTE, para redirigir las células T a una célula tumoral. La célula T puede luego matar la célula tumoral. Las moléculas biespecíficas (o trispecíficas o multiespecíficas) de la presente divulgación son capaces de unirse a ambos CD3 humano y el CD3 de un mamífero no humano (por ej., mono macaco), y también a un segundo (o adicional) y diferente(s) antígeno(s) o epítoto(s). El segundo antígeno o epítoto es con preferencia un antígeno del tumor expresado en una célula tumoral. Dichas células tumorales pueden ser de cánceres, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de la cavidad oral, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de laringe, cáncer de hueso, cáncer de piel, melanoma, cáncer de útero, cáncer de testículo, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, glioblastoma, cáncer de tiroides, linfoma, mieloma y leucemia. Dichos antígenos o epítotos adicionales son con preferencia antígenos tumorales o epítotos de la superficie celular (tales como: 17-1A, A33, antígeno de endoderma I primario de eritrocitos adultos, alfa fetoproteína, un antígeno de envoltura de un virus del tumor de ARN, antígeno oncofetal de tumor de vejiga, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, antígeno de linfoma de Burkitt-38,13, CA125, CD18, CD19, antígeno de linfoma B humano-CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CO17-1A, CTA-1, CTLA-4, receptor del factor de crecimiento epidérmico, Ep-CAM, EphA2, antígeno de eritrocito I fetal, antígeno de fibrosarcoma, gangliosida GD2, gangliosida GD3, gangliosida GM2, gangliosida GM3, GICA 19-9, gp IIIb/IIIa, gp72, HER1, HER-2/neu, HER3, HER4, antígeno de melanoma de alto peso molecular, antígeno HLA-DR, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37, antígeno de carcinoma de pulmón humano L20, antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, antígeno de glóbulo de grasa de leche humana, IgE, antígeno del carcinoma pan KS 1/4, LEA, antígeno del adenocarcinoma de pulmón F3, antígeno de linfocitos humanos malignos-APO-1, antígeno de melanoma gp75, antígeno asociado al melanoma p97, neoglicoproteína, nuC242, antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno específico de la próstata, antígeno de membrana específica de la próstata, fosfato de ácido prostático, antígeno SK-1, TAG-72, antígeno T, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno de superficie de trasplante de tipo de célula específico del tumor, factor de crecimiento endotelial vascular, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, y $\alpha v\beta 3$). En forma alternativa, dichos antígenos o epítotos adicionales pueden estar asociados con un patógeno (tales como: hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, paporavirus, virus de papiloma, paporavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, coxsackie virus, virus de paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (HIV-II), meningitis viral, encefalitis viral, dengue, viruela; micobacteria rickettsia, micoplasma, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, tétano, pertussis, cólera, plaga, difteria, clamidia, y legionella; leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria; clamidia y rickettsia).

55 Los anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno de la presente divulgación se unen a CD3 presente sobre la superficie de las células T. Con el uso de métodos convencionales, dichos anticuerpos pueden marcarse con fluoresceína, como se describió con anterioridad. Cuando dichas moléculas marcadas se incuban en la presencia de una molécula biespecífica (tal como por ejemplo, un diacuerpo UDART™ que tiene un dominio de unión al epítoto que se une al receptor de células T y un dominio de unión al epítoto que se une a fluoresceína (“TCR-UDART™”)), pueden unirse a la marca de fluoresceína y de este modo localizarse en la superficie de células que expresan CD3 y causan destrucción redirigida de dichas células.

En una realización alternativa, CD19 puede usarse como el “segundo” epítoto, de tal manera que un anticuerpo biespecífico, o con mayor preferencia, un diacuerpo DART™, que reconoce CD3 y CD19 se emplea para erradicar el linfoma de células B a través del coencastre del antígeno específico de células B (CD19) y el complejo receptor de células T/CD3 sobre células T efectoras. Como se divulgó en Moore, P.A. *et al.* (2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*,” Blood 2011 blood-2010-09-306449, un diacuerpo DART™ CD3/CD19 se usó para erradicar el linfoma de células B a través del coencastre del antígeno específico de células B CD19 y el complejo receptor de células T/CD3 sobre células T efectoras. La comparación lado a lado con un anticuerpo biespecífico de cadena simple que lleva secuencias Fv del anticuerpo idénticas CD19 y CD3 reveló que el DART es más potente al dirigir la lisis de células B. La mayor actividad con el DART CD19xCD3 se observó en todas las células B de destino que expresan CD19 evaluadas con el uso de PBMC en reposo y preestimulada humana o poblaciones de células T efectoras purificadas. La caracterización de un DART CD19xTCR biespecífico reveló potencia equivalente al DART CD19xCD3 lo que demuestra la flexibilidad de la arquitectura del DART para soportar asociaciones de células T/B para aplicaciones de destrucción de células T redirigidas. Es importante observar que el nivel potenciado de destrucción mediada por moléculas DART no se acompañó de un aumento en la activación de las células T no específicas o lisis de células CD19 negativas. Los estudios de asociación celular indican que la arquitectura de DART es apta para mantener el contacto célula:célula que aparentemente contribuye al alto nivel de destrucción de células blanco. Finalmente, la capacidad del DART CD19xTCR de inhibir el linfoma de células B en ratones NOD/SCID cuando se coadministra con PBMC humano demuestra en forma adicional el valor de las moléculas DART para el tratamiento de enfermedades producidas por células B. Los anticuerpos anti-CD3 de reacción cruzada de la presente divulgación podrían emplearse del mismo modo que los anticuerpos CD3 de Moore, P.A. *et al.* De este modo, la divulgación proporciona un tratamiento para cánceres (en especial linfomas y leucemias) que implica células con cáncer que expresan CD3.

Las moléculas biespecíficas (o trispecíficas o multiespecíficas) de la presente divulgación se administran con preferencia a un paciente en una o más dosis unitarias de normalmente 0,0001 mg/kg hasta 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Con preferencia, la dosificación administrada a un paciente es entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg hasta 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente.

B. Tratamiento de enfermedad autoinmune e Inflamación

Se describen métodos de tratamiento, prevención, reducción de la progresión de y/o alivio de los síntomas de enfermedades o trastornos mediados por la célula T, que incluyen rechazo a los injertos, enfermedad de huésped vs. injerto, reacciones de hipersensibilidad del tipo tardío no deseadas (tales como reacciones alérgicas del tipo demorado), enfermedades pulmonares mediadas por las células T, y enfermedades autoinmunes. Las enfermedades pulmonares mediadas por las células T incluyen sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumonitis intersticial aguda, alveolitis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática y otras enfermedades caracterizadas por daño inflamatorio pulmonar. Las enfermedades autoinmunes de las células T incluyen esclerosis múltiple, neuritis, polimiositis, psoriasis, vitiligo, Síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, diabetes Tipo 1, pancreatitis autoinmune, enfermedades inflamatorias intestinales (por ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad celíaca, glomerulonefritis, esclerodermia, sarcoidosis, enfermedades autoinmunes de tiroides (por ej., tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves), miastenia grave, enfermedad de Addison, uveoretinitis autoinmune, pénfigo vulgar, cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa, y lupus eritematoso sistémico, lupus (en particular, cutáneo), efectos del trasplante de órganos, enfermedad de huésped vs. injerto (GVHD), *etc.* En particular, los métodos de la presente son ventajosos en sujetos con enfermedad en la etapa inicial para aliviar o reducir el daño de la autoinmunidad y mantener un alto nivel de función y/o reducir la necesidad de otros tratamientos (por ej., en el tratamiento o profilaxis de diabetes tipo I, los métodos de la presente pueden reducir la necesidad de administración de insulina exógena en el sujeto). Además, los métodos de la presente pueden reducir en forma ventajosa la incidencia de, o no producir incidencia del síndrome de liberación de citoquinas asociados con la administración de anticuerpos terapéuticos, y, en particular, fragmentos que se unen al antígeno anti-células T (por ej., anticuerpo anti-CD3).

En ciertas realizaciones, el curso de tratamiento con un anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno de acuerdo con los métodos de la divulgación se repite a intervalos de 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, o 36 meses. En realizaciones específicas la eficacia del tratamiento con un anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno de la divulgación se determina como se describe en este documento o como se conoce en la materia a los 2 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, o 36 meses posteriores al tratamiento previo.

En otra realización, se administra a un sujeto una o más dosis unitarias de aproximadamente 0,5-50 µg/kg, aproximadamente 0,5-40 µg/kg, aproximadamente 0,5-30 µg/kg, aproximadamente 0,5-20 µg/kg, aproximadamente 0,5-15 µg/kg, aproximadamente 0,5-10 µg/kg, aproximadamente 0,5-5 µg/kg, aproximadamente 1-5 µg/kg, aproximadamente 1-10 µg/kg, aproximadamente 20-40 µg/kg, aproximadamente 20-30 µg/kg, aproximadamente 22-28 µg/kg o aproximadamente 25-26 µg/kg de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T. En otra realización, se administra a un sujeto una o más dosis unitarias de 200 µg/kg, 178 µg/kg, 180 µg/kg, 128 µg/kg, 100

5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 95 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 6,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T.

10 En una realización, se administra a un sujeto una o más dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, o 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno de la divulgación para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T.

15 En realizaciones particulares, se administra a un sujeto una o más dosis de alrededor de 5 - 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, con preferencia, 51 - 826 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. En otra realización, se administra a un sujeto una o más dosis unitarias de 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 1150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 1050 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 950 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 900 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 850 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 750 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 700 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 650 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 450 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 350 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 40 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, o 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para prevenir, tratar, reducir la progresión de, demorar la aparición de o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T.

20 En otra realización, se administra al sujeto un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno, en donde el curso del tratamiento se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o 14 días. En una realización, el régimen de tratamiento comprende administrar dosis de la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno cada día, cada 2 días, cada 3 días o cada 4 días. En ciertas realizaciones, el régimen de tratamiento comprende administrar dosis de la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno el lunes, martes, miércoles, jueves de una semana dada y no se administran dosis de la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno el viernes, sábado y domingo la misma semana hasta que las 14 dosis, 13, dosis, 13 dosis, 12 dosis, 11 dosis, 10 dosis, 9 dosis, u 8 dosis se han administrado. En ciertas realizaciones la dosis administrada es la misma cada día del régimen. En ciertas realizaciones, se administra a un sujeto un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno, en donde la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva es 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 175 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 95 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 90 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 85 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 65 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 55 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 45 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 6,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 3,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, o 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$; y/o en donde la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva es 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 1150 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 1050 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 950 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 900 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 850 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 750 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 700 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 650 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 450 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 350 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 150 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 40 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, o 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$. En otra realización, la dosis intravenosa de 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 1150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 1100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 1050 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 950 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 900 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 850 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 750 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 700 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 650 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 450 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 350 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 40 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos, o 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno se administra durante alrededor de 24 horas, alrededor de 22 horas, alrededor de 20 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 2 horas, alrededor de 1,5 horas, alrededor de 1 hora, alrededor de 50 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 5 minutos, alrededor de 2 minutos, alrededor de 1 minuto, alrededor de 30 segundos o alrededor de 10 segundos para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune o enfermedad de las células T. La dosificación total durante el transcurso del régimen es con preferencia un total de menos de 9000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 8000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 7000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 6000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, y puede ser de menos de 5000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 4000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 2000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, o 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. En realizaciones específicas, la dosificación total administrada en el régimen es de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, o 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$.

En realizaciones preferidas, la dosis aumenta durante el primer cuarto, primera mitad o primeros 2/3 de las dosis (por ej., durante los primeros 2, 3, 4, 5, o 6 días de un régimen de 10, 12, 14, 16, 18 o 20 días de una dosis por día)

del régimen de tratamiento hasta que la cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva diaria de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno se logre. En ciertas realizaciones, se administra a un sujeto un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno, en donde la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva aumenta en, por ej., 0,01 µg/kg, 0,02 µg/kg, 0,04 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,75 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, 50 µg/kg, 55 µg/kg, 60 µg/kg, 65 µg/kg, 70 µg/kg, 75 µg/kg, 80 µg/kg, 85 µg/kg, 90 µg/kg, 95 µg/kg, 100 µg/kg, o 125 µg/kg cada día; o aumenta en, por ej., 1 µg/m², 5 µg/m², 10 µg/m², 15 µg/m², 20 µg/m², 30 µg/m², 40 µg/m², 50 µg/m², 60 µg/m², 70 µg/m², 80 µg/m², 90 µg/m², 100 µg/m², 150 µg/m², 200 µg/m², 250 µg/m², 300 µg/m², 350 µg/m², 400 µg/m², 450 µg/m², 500 µg/m², 550 µg/m², 600 µg/m², o 650 µg/m², cada día a medida que el tratamiento progresa. En ciertas realizaciones, se administra a un sujeto un régimen de tratamiento que comprende una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno, en donde la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva aumenta en un factor de 1,25, un factor de 1,5, un factor de 2, un factor de 2,25, un factor de 2,5, o un factor de 5 hasta que la cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva diaria de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno se logre.

En una realización específica, se administra a un sujeto por vía intramuscular una o más dosis de 200 µg/kg o menos, con preferencia 175 µg/kg o menos, 150 µg/kg o menos, 125 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos, o 0,5 µg/kg o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T.

En otra realización, se administra a un sujeto por vía subcutánea una o más dosis de 200 µg/kg o menos, con preferencia 175 µg/kg o menos, 150 µg/kg o menos, 125 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos, o 0,5 µg/kg o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune.

En otra realización, se administra a un sujeto por vía intravenosa una o más dosis de 100 µg/kg o menos, con preferencia 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos, o 0,5 µg/kg o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T. En otra realización, la dosis intravenosa de 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos, o 0,5 µg/kg o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno se administra durante alrededor de 6 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 2 horas, alrededor de 1,5 horas, alrededor de 1 hora, alrededor de 50 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 5 minutos, alrededor de 2 minutos, alrededor de 1 minuto, alrededor de 30 segundos o alrededor de 10 segundos para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T.

En realizaciones específicas en las cuales se administran dosis crecientes durante los primeros días del régimen de dosificación, la dosis el día 1 del régimen es 5 - 100 µg/m²/día, y aumenta hasta la dosis diaria como se mencionó en el párrafo anterior el día 3, 4, 5, 6 o 7. Por ejemplo, el día 1, se administra al sujeto una dosis de aproximadamente 51 µg/m²/día, el día 2 aproximadamente 103 µg/m²/día, el día 3 aproximadamente 207 µg/m²/día, el día 4 aproximadamente 413 µg/m²/día y en los días posteriores del régimen (por ej., días 5-14) 826 µg/m²/día.

En otras realizaciones, la dosis inicial es 1/4, a 1/2, hasta igualar la dosis diaria al final del régimen pero se administra en porciones en intervalos de 6, 8, 10 o 12 horas. Por ejemplo, una dosis de 13 µg/kg/día se administra en cuatro dosis de 3-4 µg/kg en intervalos de 6 horas para reducir el nivel de liberación de citoquinas causado por la administración del anticuerpo.

En realizaciones específicas, para reducir la posibilidad de liberación de citoquinas y otros efectos adversos, las primeras 1, 2, 3, o 4 dosis o todas las dosis en el régimen se administran más lentamente por administración intravenosa. Por ejemplo, una dosis de 51 µg/m²/día puede administrarse durante alrededor de 5 minutos, alrededor

de 15 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 45 minutos, alrededor de 1 hora, alrededor de 2 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 6 horas, alrededor de 8 horas, alrededor de 10 horas, alrededor de 12 horas, alrededor de 14 horas, alrededor de 16 horas, alrededor de 18 horas, alrededor de 20 horas, y alrededor de 22 horas. En ciertas realizaciones, la dosis se administra por leve infusión durante un periodo de, por ej., 20 hasta 24 horas. En realizaciones específicas, la dosis se administra por infusión en una bomba, con preferencia aumentando la concentración de anticuerpo administrado a medida que la infusión progresa.

En otras realizaciones, una fracción determinada del régimen puede administrarse en dosis crecientes. Por ejemplo, para el régimen de 51 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ hasta 826 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ descrito con anterioridad, la fracción puede ser 1/10, 1/4, 1/3, 1/2, 2/3 o 3/4 de las dosis diarias. De acuerdo con lo anterior, cuando la fracción es 1/10, las dosis diarias serán 5,1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 1, 10,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 2, 20,7 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 3, 41,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 4 y 82,6 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 1/4, la dosis será de 12,75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 1, 25,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 2, 51 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 3, 103 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 4, y 207 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 1/3, la dosis será de 17 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 1, 34,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 2, 69 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 3, 137,6 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 4, y 275,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 1/2, la dosis será de 25,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 1, 51 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 2, 103 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 3, 207 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 4, y 413 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 2/3, la dosis será de 34 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 1, 69 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 2, 137,6 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 3, 275,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 4, y 550,1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 3/4, la dosis será de 38,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 1, 77,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 2, 155,3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 3, 309,8 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ el día 4, y 620 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ los días 5 a 14.

En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno no se administra por dosis diarias durante una cantidad de días, sino que se administra en su lugar por infusión en un modo no interrumpido durante 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 20 horas, 24 horas, 30 horas o 36 horas. La infusión puede ser constante o puede comenzar con una dosis más baja, por ejemplo, las primeras 1, 2, 3, 5, 6, u 8 horas de la infusión y luego aumentan hasta una dosis mayor a partir de entonces. Durante el transcurso de la infusión, el paciente recibe una dosis igual a la cantidad administrada en los regímenes ejemplificativos establecidos con anterioridad. Por ejemplo, una dosis de aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 750 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 1500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 2000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 4000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 5000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 6000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 7000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 8000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, o 9000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. En particular, la velocidad y la duración de la infusión está diseñada para minimizar el nivel del anticuerpo anti-CD3 libre o fragmentos que se unen al antígeno en el sujeto después de la administración. En ciertas realizaciones, el nivel de anticuerpo anti-CD3 libre o fragmentos que se unen al antígeno no debe exceder 200 ng/ml de anticuerpo libre. Además, la infusión se diseña para lograr un recubrimiento del receptor de células T combinadas y modulación de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o del 100%.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno se administra con el fin de lograr un determinado nivel de recubrimiento y modulación combinados de complejos del receptor de células T en células T, según se determina por métodos muy conocidos en la materia, véase, por ej., Ejemplo 11 de la publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2003/0108548. En realizaciones específicas, el régimen de dosificación logra un recubrimiento del receptor de células T combinadas y modulación de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o del 100% con, en realizaciones específicas, poco o ningún anticuerpo anti-CD3 libre o fragmentos que se unen al antígeno detectados (por ejemplo, menos de 200 ng/ml del fármaco se detecta en la sangre del paciente).

En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno se administran por vía parenteral, por ejemplo, vía intravenosa, por vía intramuscular o vía subcutánea, o, en forma alternativa, se administran por vía oral. El anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno también pueden administrarse como formulación de liberación prolongada.

En una realización específica, la administración de una o más dosis o un régimen de dosificación de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno no induce o reduce con relación a otros agentes inmunosupresores uno o más de los siguientes efectos adversos o indeseados: anomalías en los signos vitales (fiebre, taquicardia, bradicardia, hipertensión, hipotensión), eventos hematológicos (anemia, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia), cefalea, escalofríos, mareos, náusea, astenia, dolor de espalda, dolor de pecho (presión en el pecho), diarrea, mialgia, dolor, pruritus, soriasis, rinitis, sudoración, reacción en el sitio de inyección, vasodilatación, un aumento del riesgo de infección oportunista, activación de virus de Epstein Barr, apoptosis de células T y un aumento del riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer. En otra realización específica, la administración de una o más dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno no induce o reduce con relación a otros agentes inmunosupresores uno o más de los siguientes efectos adversos o indeseados: anomalías en los signos vitales (fiebre, taquicardia, bradicardia, hipertensión, hipotensión), eventos hematológicos (anemia, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia), cefalea, escalofríos, mareos, náusea, astenia, dolor de espalda, dolor de pecho (presión en el pecho), diarrea, mialgia, dolor, pruritus, soriasis, rinitis, sudoración, reacción en el sitio de inyección, vasodilatación, un aumento del riesgo de infección oportunista, activación de virus de Epstein Barr, apoptosis de células T, y un aumento del riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer.

De acuerdo con la divulgación, la dosis o régimen de dosificación que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno para el tratamiento de un trastorno autoinmune puede repetirse al 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses,

15 meses, 18 meses o 24 meses o más después de la dosis o régimen de dosificación inicial o anterior que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno. La dosis o régimen de dosificación reiterado puede administrarse como una cuestión de transcurso, cuando los síntomas asociados con dicho trastorno autoinmune recurren después de la mejora posterior a la dosis o régimen de dosificación inicial o anterior, o cuando los síntomas asociados con dicho trastorno autoinmune no mejoran después de la dosis inicial o régimen de dosificación de anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno de acuerdo con métodos de la presente. Por ejemplo, con respecto a diabetes, una dosis o régimen de dosificación reiterados que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno puede administrarse a un sujeto cuando, por ejemplo, el uso promedio del sujeto de insulina por día a 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses o 24 meses o más después del tratamiento inicial o anterior con anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno no disminuye en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% cuando se compara con los niveles anteriores al tratamiento. En forma alternativa, con respecto a diabetes, una dosis o un régimen de dosificación reiterados que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno puede administrarse a un sujeto cuando, por ejemplo, los niveles de HA 1 o HA 1 C del sujeto a 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses o 24 meses o más después del tratamiento inicial o anterior con anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno no disminuye en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% cuando se compara con los niveles anteriores al tratamiento. En otra realización, con respecto a diabetes, una dosis o régimen de dosificación reiterados que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno puede administrarse a un sujeto cuando, por ejemplo, la respuesta al C-peptido del sujeto a 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses o 24 meses o más después del tratamiento inicial o anterior con anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno reduce en más de 5%, más de 10%, más de 20%, más de 30%, más de 40%, más de 50%, más de 60%, más de 70%, más de 80% o más de 90% cuando se compara con los niveles anteriores al tratamiento.

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades inmunológicas no infecciosas causadas por respuestas inmunológicas que se orientan a los componentes normales de células humanas, tejidos y órganos. Las enfermedades autoinmunes son con frecuencia enfermedades crónicas que erosionan gradualmente tejidos y órganos de destino. Las enfermedades comunes ahora clasificadas como enfermedades autoinmunes debido a la presencia de respuestas autoinmunes inapropiadas incluyen diabetes dependiente de la insulina tipo I, artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD); miastenia grave, enfermedad celíaca, Síndrome de Sjogren, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, hepatitis autoinmune, psoriasis, artritis sorriática, asma, rinitis alérgica, efectos del trasplante de órganos, o enfermedad de huésped vs. injerto (GVHD) y numerosas otras enfermedades que incluyen una respuesta inmunológica inflamatoria.

Dado que las enfermedades autoinmunes son normalmente crónicas, en general requieren tratamiento y monitoreo de por vida. Las terapias convencionales para enfermedad autoinmune se orientan principalmente por lo tanto al manejo de las consecuencias de inflamación causadas por la enfermedad, y sólo algunas enfermedades autoinmunes pueden curarse o hacerse desaparecer con dicho tratamiento. Para algunas enfermedades autoinmunes, la administración de una de una limitada cantidad de medicaciones inmunosupresoras puede generar períodos de remisión o desaparición de la enfermedad activa. Los agentes inmunosupresores usados para la terapia auxiliar incluyen sustancias que suprimen la producción de citoquinas, desregular o suprimir la expresión del autoantígeno y enmascarar los antígenos de histocompatibilidad mayor (MHC). Las medicaciones inmunosupresoras incluyen fármacos antiinflamatorios (por ej., un fármaco antiinflamatorio no esteroide ("AINE"), ciclofosfamida, bromocriptina ciclosporina A, metotrexato, esteroides tales como glucocorticoides y citoquinas o antagonistas del receptor de citoquina. Los pacientes raramente son capaces de interrumpir estas medicaciones inmunosupresoras ya que su enfermedad autoinmune usualmente reaparece cuando se discontinúa la medicación. La enfermedad autoinmune puede convertirse en refractiva al tratamiento cuando las medicaciones inmunosupresoras se continúan durante largo tiempo y puede requerir incluso aumentar la dosis de agentes inmunosupresores.

Los anticuerpos terapéuticos orientados a CD3 se consideran que producen menos efectos colaterales a largo plazo que muchas quimioterapias inmunosupresoras que se encuentran actualmente disponibles para las enfermedades autoinmunes (WO 2007/117600). Sin embargo, las terapias anteriores basadas en anticuerpos se han encontrado que son problemáticas, en particular donde se empleó administración reiterada. Las terapias antilinfocíticas, tales como antilinfocito globulina (ALG), y anticuerpos monoclonales orientados a células B, tales como rituximab (Rituxin®) y alemtuzumab (CAMPATH®) reducen las poblaciones de células B en tejidos y en la circulación en pacientes tratados. Sin embargo, estas terapias también producen inmunosupresión severa, que es indeseable para el tratamiento prolongado de una enfermedad autoinmune crónica. La principal complicación de la terapia inmunosupresora severa es la infección. La inmunosupresión sistémica también puede estar acompañada de efectos indeseables tóxicos y una reducción en los niveles de mastocitos hematopoyéticos. Además, los pacientes que reciben terapias de anticuerpos con frecuencia desarrollan niveles significativos de anticuerpos anti-ratón

humano (HAMA), anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA) y respuestas anti-idiotípicas, lo que puede limitar los tratamientos reiterados cuando termina la remisión.

Como se discutió con anterioridad, los anticuerpos orientados a antígenos de la célula T, tales como el complejo receptor de células T (TCR), se han sugerido como posibles agentes terapéuticos para la inmunosupresión de la enfermedad autoinmune. Se considera que los anticuerpos anti-CD3 inducen dicha inmunosupresión al reducir las células T patogénicas e inducir células T regulatorias (WO 2007/117600; St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity," Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657; Ludvigsson, J. (2009) "The Role of Immunomodulation Therapy in Autoimmune Diabetes," J. Diabetes Sci. Technol. 3(2):320-330). Los anticuerpos anti células T, que incluyen anti-CD3, se han usado por lo tanto para influir en el estado inmunológico en un sujeto al suprimir, potenciar o redirigir respuestas de las células T a un antígeno. En particular, Teplizumab, se conoce también como hOKT3γ1(Ala-Ala) (que contiene una alanina en las posiciones 234 and 235) (MacroGenics, Inc.) es un anticuerpo anti-CD3 que se ha diseñado para alterar la función de los linfocitos T que median la destrucción de las células beta productoras de insulina de los islotes del páncreas. Teplizumab se une a un epítipo de la cadena CD3ε expresada en las células T maduras y con ello.

Debido en parte a su reactividad cruzada con CD3 no humano (lo que permite una dosificación más exacta y sensible), se considera que los anticuerpos anti-CD3 de la presente divulgación tienen utilidad particular en el tratamiento de enfermedad autoinmune a pesar de las fallas aparentes del arte previo.

Dichos anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno pueden usarse solos o en conjunción con otros agentes farmacológicos. En particular, se describen terapias que implican la administración de dichos anticuerpos o fragmentos que se unen al antígeno en conjunción con anticuerpos anti-células B (o fragmentos que se unen al antígeno de los mismos). Los anticuerpos anti-células B se conocen en la materia (véase WO 2007/117600; WO 2005/000901; WO 2004/035607; las Patentes de EE. UU. Nro. 5,500,362 y 5,736,137; Publicaciones de Patentes de EE. UU. Nros. 2003/0219433; 2005/0271658; 2005/0271658; 2005/0281817; 2006/024295; 2006/024300 y 2006/034835; Clark, E.A. et al. (1985) "Role Of The Bp35 Cell Surface Polipeptide In Human B-Cell Activation," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82(6):1766-1770; Press, O.W. et al. (1987) "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B Cell Lymphomas," Blood 69:584-591). Dicha administración conjunta puede lograrse con el uso de administración conjunta de distintos anticuerpos o fragmentos que se unen al antígeno de los anteriores, o al formar anticuerpos biespecíficos, o con mayor preferencia, al formar diacuerpos DART™, como se describió con anterioridad, que tiene la capacidad de unirse a ambos CD3 y antígeno de las células B.

Con preferencia el anticuerpo anti célula B empleado o fragmento que se une al antígeno se orientará a un marcador de superficie de células B, tal como un marcador seleccionado de CD19, CD20, CD22, CD23, CD32B, CD40, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD79a, CD79b, CD38, CD27, un antígeno asociado a la función de los linfocitos (LFA), tales como LFA-I o LFA-3, CFA-I, u otra molécula accesoria involucrada en la asociación de células T y células B que conduce a una activación de células T y células B en una respuesta inmunológica adaptativa. En una realización adicional preferida, el anticuerpo anti célula B puede ser un anticuerpo que disminuye las células B, tal como un anticuerpo orientado a un marcador seleccionado de CD19, CD20, CD22, CD23, CD32B, CD40, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), un antígeno asociado con la función de los linfocitos (LFA), tales como LFA-I o LFA-3, CFA-I, o una molécula accesoria involucrada en la asociación de las células T, células B.

En forma alternativa, dicho tratamiento combinado puede comprender la administración de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento que se une al antígeno de los anteriores, en combinación con un anticuerpo (o fragmento que se une al antígeno de los anteriores) que reconoce un antígeno presente sobre una célula que presenta el antígeno (por ej., B7-H3). Incluso en una realización preferida adicional, el tratamiento combinado comprende la administración de un anticuerpo anti-CD3 (o fragmento que se une al antígeno de los anteriores) en combinación con un anticuerpo (o fragmento que se une al antígeno de los anteriores) que reconoce un polipéptido involucrado en la activación de células B (ya sea directa o indirectamente) o un inmunomodulador tales como un miembro de la familia de citoquinas del TNF, o un interferón (por ej., interferón α, β o γ). Como lo entienden aquellas personas con experiencia en la materia, dichos interferones están involucrados en la regulación de las proteínas que funcionan juntas en el procesamiento y la presentación del antígeno. Estas citoquinas estimulan las células para aumentar su expresión de cadenas pesadas HLA de clase I. En una realización preferida, el tratamiento combinado comprende administrar a un sujeto que tiene enfermedad autoinmune activa un anticuerpo para un antígeno de una célula T en combinación con un anticuerpo a β-interferón. En una realización adicional preferida, el tratamiento combinado comprende administrar a un sujeto un anticuerpo orientado a un antígeno de la célula T en combinación con un anticuerpo seleccionado de anticuerpos de β-interferón AVONEX®, BETASERON® y REBIF®. En una realización adicional, el tratamiento combinado comprende administrar a un sujeto un anticuerpo orientado a un antígeno de una célula T en combinación con un anticuerpo orientado a β-interferón para el tratamiento de un sujeto que tiene esclerosis múltiple.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD3 puede ser un anticuerpo no mitogénico o un anticuerpo mitogénico reducido que inhibe o previene la activación de células T cuando una célula T entra en contacto con su antígeno específico sobre una célula que presenta el antígeno, en particular un antígeno que presenta la célula B. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo de célula T no mitogénico" significa un anticuerpo que está diseñado por alteración del receptor de Fc del anticuerpo de manera tal que no desencadena los eventos de

activación inicial y asegura la liberación de citoquinas que se observan cuando se activa una célula T. Un “anticuerpo de células T reducido mitogénico” es un anticuerpo específico para un antígeno en la célula T que reduce los eventos de activación inicial y liberación de citoquinas que ocurren cuando una célula T se activa. El anticuerpo no mitogénico o mitogénico reducido puede ser útil para prevenir los “efectos colaterales a la primera dosis” iniciales observados cuando el anticuerpo anti-linfocítico se administra a un paciente. El anticuerpo no mitogénico o reducido puede ser un anticuerpo diseñado que tiene un fragmento de Fc modificado que previene o inhibe la unión mediante células efectoras.

C. Métodos de administración

En el presente documento se describen sujetos humanos tratados con el fin de lograr y mantener remisiones clínicas durante períodos más extensos que las remisiones logradas por sujetos tratados con un tratamiento convencional. Por ejemplo, donde una terapia convencional logra una remisión de los síntomas de una enfermedad autoinmune durante tres meses, las composiciones de la presente divulgación pueden brindar una remisión completa de los síntomas de hasta seis meses, hasta 12 meses y en algunos casos hasta uno o dos años o más. Se contempla que para ciertas enfermedades autoinmunes puede ser posible proporcionar una remisión completa que no recaiga, en particular donde el tratamiento comienza apenas después de diagnosticar la enfermedad autoinmune.

La remisión clínica lograda con el tratamiento combinado puede ser una remisión completa o puede ser una remisión parcial en la cual las reducciones significativas en los síntomas de la enfermedad se mantienen durante un período prolongado. Por ejemplo, un sujeto que recibe el tratamiento descrito en el presente documento puede tener reducidas respuestas autoinmunes según se determina por niveles reducidos de autoanticuerpos detectables en los fluidos y tejidos corporales, por ejemplo en el líquido cefalorraquídeo (CSF), suero, orina o en tejidos corporales. Un sujeto que recibe el tratamiento combinado también puede tener respuestas reducidas de las células T a los autoantígenos según se detecta por ensayos in vitro de la proliferación o producción de citoquinas con el uso de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células T purificadas cuando se compara con sujetos tratados con el tratamiento convencional.

Las composiciones de la presente divulgación pueden administrarse por cualquier medio apropiado, que incluye administración parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneana, intrapulmonar, intranasal, y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneana, o subcutánea. Además, el anticuerpo puede administrarse en forma apropiada por infusión con pulso, por ej., con dosis crecientes del anticuerpo. Con preferencia, la administración se da por vía intravenosa o vía subcutánea, y con mayor preferencia por infusión(es) intravenos(as). Cada exposición puede proporcionarse con el uso del mismo o diferente medio de administración. En una realización, cada exposición es por vía intravenosa. En otra realización, cada exposición se da por administración subcutánea. Incluso en otra realización, las exposiciones se dan por ambas, administración intravenosa y subcutánea.

En una realización, los anticuerpos terapéuticos se administran como una infusión intravenosa lenta que puede comenzar a una velocidad por hora para administrar las moléculas de la divulgación en aproximadamente 15 minutos a 4 horas. Sin embargo, si el sujeto experimenta una reacción relacionada con la infusión, la velocidad de la infusión se reduce con preferencia, por ej., hasta la mitad de la tasa actual. Los sujetos tratados pueden recibir un tratamiento profiláctico de acetaminofeno/paracetamol (por ej., alrededor de 1g) y difenilhidramina HCl (por ej., alrededor de 50 mg o dosis equivalentes de un agente similar) por boca alrededor de 30 hasta 60 minutos antes del comienzo de una infusión.

La terapia provista por la combinación de composiciones de la presente divulgación (que incluyen diacuerpos DART™) puede administrarse a un sujeto con el uso de una dosis inicial del primer anticuerpo que es menor que la cantidad de dicho anticuerpo necesaria para lograr una respuesta clínica en tratamiento para una enfermedad autoinmune cuando se administra como un tratamiento con anticuerpo único. Una dosis de un anticuerpo anti célula T terapéutico que es menor que la dosis necesaria para lograr la depleción de células T que son capaces de reconocer y responder a autoantígenos en un tratamiento que proporciona un único anticuerpo puede ser suficiente para proporcionar una respuesta clínica deseada. Los métodos para determinar la dosificación de un anticuerpo terapéutico necesario para lograr una respuesta clínica se conocen para aquellas personas con experiencia en la materia. Por ejemplo, una respuesta clínica en el sujeto puede medirse como el tiempo hasta la progresión de la enfermedad, reducción de los síntomas clínicos, reducción en los niveles de marcadores de laboratorio, reducción en la necesidad de tratamiento, o por cualquier otro medio clínico reconocido como indicador útil para la mejora en el estado de la enfermedad autoinmune.

El segundo anticuerpo de un tratamiento combinado también puede administrarse a un sujeto que necesita tratamiento como una dosis inicial que es menos que una dosis efectiva para lograr una respuesta clínica cuando el anticuerpo se administra solo. Por ejemplo, la dosis de un anticuerpo de disminución anti célula B que logra menos de 100% de disminución de células B, menos de 50% de disminución de células B, menos de 30% de disminución o incluso ninguna disminución de células B puede administrarse junto con un primer anticuerpo anti-células T para lograr una respuesta clínica que proporciona supresión de una respuesta inmunológica a un autoantígeno igual a, o mejor que la respuesta clínica lograda por la administración de una cantidad de un anticuerpo de disminución de células B que proporciona 100% de disminución de células B en el sujeto cuando se administra sola.

En algunos casos, la respuesta clínica puede ser una respuesta que ni el primero ni el segundo anticuerpo logra cuando se administra solo. En otros casos, la respuesta clínica puede ser equivalente a la lograda por administración de un tratamiento con un único anticuerpo, donde el tratamiento combinado proporciona menos inmunosupresión de un sistema inmunológico del sujeto tratado que una terapia con anticuerpo solo. En una realización preferida, la respuesta sinérgica provista por el tratamiento combinado reduce o elimina una respuesta del sujeto a un autoantígeno mientras que suministra niveles inferiores de inmunosupresión. La inmunosupresión general es un problema significativo para las terapias con anticuerpos disponibles con anterioridad.

D. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados en las realizaciones de la presente divulgación se preparan para almacenamiento, envío y administración, mezclando una composición de la presente divulgación que tiene una pureza deseada con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales aceptables desde el punto de vista farmacéutico reconocidos en el arte farmacéutico en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

El término "aceptables desde el punto de vista farmacéutico" significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales, y más particularmente en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ej., adyuvante de Freund (completo o incompleto), excipiente o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos apropiados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares.

Las composiciones de la divulgación incluyen composiciones de medicamentos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ej., composiciones no estériles o impuras) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son apropiadas para administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un agente profiláctico y/o terapéutico divulgados en este documento o una combinación de esos agentes y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Con preferencia, composiciones de la divulgación comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de anticuerpos humanizados de la divulgación y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

En general, los ingredientes de las composiciones de la divulgación se suministran ya sea separados o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tales como una ampolla o sobre que indica la cantidad de principio activo. Donde la composición pretende administrarse por infusión, puede dispensarse con un frasco para infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico o solución salina. Donde la composición se administra por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de modo tal que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas apropiadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles donde los agentes activos son solubles en agua, o dispersiones o polvos estériles para preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. Las composiciones para usar en el tratamiento combinado pueden prepararse por incorporación del antagonista o anticuerpo activo en la cantidad requerida con vehículos apropiados, por ejemplo agua, etanol, poliol (por ej., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas apropiadas de los anteriores. Los agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio pueden incluirse en la composición.

Las composiciones de la divulgación pueden formularse como formas de sales o neutras. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen, aunque no se limitan a, aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos de hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

E. Kits

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con anticuerpos humanizados de la divulgación. En forma adicional, uno o más agentes terapéuticos o profilácticos diferentes útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico. También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. En forma opcional se pueden asociar con

dicho(s) recipiente(s) una nota en la forma indicada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuya nota refleja la aprobación de parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración a los humanos.

5 También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende uno o más anticuerpos humanizados de la divulgación. En otra realización, un kit comprende, en forma adicional, uno o más agentes terapéuticos o profilácticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende, en forma adicional, uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con cáncer. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente terapéutico o profiláctico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

15 También se describe un artículo de fabricación que contiene anticuerpos que se usarán para el tratamiento combinado para tratar la enfermedad autoinmune. El artículo de fabricación comprende un envase que comprende un primer anticuerpo que se une a un antígeno presente en una célula T y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, excipiente o diluyente dentro del recipiente. El artículo de fabricación comprende, en forma adicional, un segundo recipiente que comprende un segundo anticuerpo orientado a un marcador de superficie de las células B y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, excipiente o diluyente e instrucciones para administrar la composición a un sujeto que necesita tratamiento para la enfermedad autoinmune. Donde el primer y segundo anticuerpos se determinan que son complementarios y no afectan en forma adversa entre sí, el primero y el segundo anticuerpo pueden proveerse en un envase simple que contiene el primero y segundo anticuerpo en concentraciones apropiadas para administración junto con un prospecto para envase e instrucciones para administración.

20 Los envases del artículo de fabricación pueden ser de cualquier material apropiado que no reaccionará con o afectará de otro modo la preparación. El artículo de fabricación puede comprender en forma adicional un segundo o un tercer recipiente que comprende un tampón diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como agua bacteriostática para inyección, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación también puede incluir otro material que puede desearse desde el punto de vista comercial y del usuario que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

VII. Métodos de diagnóstico con el uso de los anticuerpos anti-CD3 de la presente divulgación

30 Los anticuerpos para CD3 hechos por los métodos divulgados en este documento también pueden usarse para identificar la presencia o ausencia de células cancerosas, o el nivel de los anteriores, que circulan en la sangre después de su liberación de la superficie celular (por ej., CD3 soluble). Dicho antígeno en circulación puede ser un antígeno CD3 intacto, o un fragmento de los anteriores que mantiene la capacidad de detectarse de acuerdo con los métodos que se enseñan en este documento. Dicha detección puede, por ejemplo, efectuarse por análisis FACS con el uso de métodos estándar comúnmente usados en la materia.

35 En una realización preferida de los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento, el anticuerpo lleva un rótulo detectable. Algunos ejemplos de rótulos que pueden usarse incluyen un agente radiactivo (por ej., Escandio-47, Tecnecio-99m, Indio-111, Yodo-131, Renio-186, Renio-188, Samario-153, Holmio-166, Lutetio-177, Cobre-64, Escandio-47, Yttrio-900), una enzima o un fluoróforo, tales como ficoeritrinao o isotiocianato de fluoresceína (se conoce también como fluoroisotiocianato o FITC).

40 Un método de uso de los anticuerpos para diagnóstico es la toma de imágenes in vivo del tumor relacionando el anticuerpo con un agente radiactivo o radio-opaco, administrar el anticuerpo al individuo y con el uso de una máquina de rayos X u otra máquina para diagnóstico por imágenes para visualizar la localización del anticuerpo marcado en la superficie de las células con cáncer que expresan el antígeno. El anticuerpo se administra a una concentración que promueve la unión en condiciones fisiológicas.

45 Las técnicas in vitro para detección de CD3 son de rutina en la materia e incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), y análisis por transferencia Western.

50 También se describen métodos para ayudar al diagnóstico de cáncer caracterizados por células cancerosas que expresan CD3 en un individuo con el uso de cualquier anticuerpo que se une a CD3 y cualquier otro método que puede usarse para determinar el nivel de expresión CD3. Como se usa en este documento, los métodos para "diagnóstico auxiliar" significa que estos métodos ayudan en la realización de una determinación clínica relacionada con la clasificación, o naturaleza, del cáncer, y pueden o no ser concluyentes con respecto al diagnóstico definitivo. De acuerdo con lo anterior, un método para ayudar al diagnóstico del cáncer puede comprender el paso de detectar el nivel de CD3 en una muestra biológica del individuo y/o determinar los niveles de expresión de CD3 en la muestra. Los anticuerpos que reconocen el antígeno o una porción del mismo también pueden usarse para crear inmunoensayos de diagnóstico para detectar el antígeno liberado o secretado de células vivas y muertas cancerosas en los fluidos corporales, que incluyen aunque sin limitarse a, sangre, saliva, orina, fluido pulmonar o fluido ascítico. Los anticuerpos anti-CD3 hechos por los métodos divulgados en este documento pueden usarse para determinar si

un individuo que recibió el diagnóstico de cáncer puede considerarse un candidato para inmunoterapia con el uso de anticuerpos dirigidos contra CD3. En una realización, una muestra de biopsia puede analizarse para determinar la expresión de CD3, con el uso de anticuerpos dirigidos contra CD3. Los individuos con células cancerosas que expresan CD3 son candidatos apropiados para inmunoterapia con el uso de anticuerpos dirigidos contra CD3. El tinte con anticuerpo anti-CD3 también puede usarse para distinguir tejidos cancerosos de tejidos normales.

Los métodos de uso de anticuerpos anti-CD3 para fines de diagnóstico son útiles tanto antes como después de cualquier forma de tratamiento contra el cáncer, por ej., quimioterapia o terapia por rayos, para determinar qué tumores son probables de responder a un tratamiento dado, pronóstico para un individuo con cáncer, subtipo de tumor u origen de enfermedad metastásica, y progresión de la enfermedad o respuesta al tratamiento.

Las composiciones de esta divulgación son particularmente apropiadas para el diagnóstico de los estados patológicos distintos del cáncer, con el uso de los métodos en general descritos con anterioridad en aplicación con otras células enfermas (no cancerosas). Los estados patológicos apropiados para usar en los métodos de esta invención incluyen, aunque no se limitan a, enfermedades o trastornos asociados con respuestas autoinmunes o inflamatorias en individuos. Los métodos descritos con anterioridad pueden usarse para modular las respuestas inflamatorias o autoinmunes en individuos. Las enfermedades y afecciones que resultan de inflamación y trastornos autoinmunes que pueden estar sujetas a diagnóstico y/o tratamiento con el uso de las composiciones y métodos de la invención incluyen, a modo de ilustración y no como limitación, esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis, apoplejía, otros traumas cerebrales, enfermedad inflamatoria intestinal que incluyen colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, miastenia grave, lupus, artritis reumatoide, asma, diabetes aguda de inicio en la juventud, demencia por SIDA, aterosclerosis, nefritis, retinitis, dermatitis atópica, psoriasis, isquemia de miocardio y lesión pulmonar mediada por leucocitos aguda.

Incluso otras indicaciones para diagnóstico y/o uso terapéutico de los anticuerpos y otros agentes terapéuticos de la divulgación incluyen administración a individuos que presentan riesgo de rechazo a los órganos o a los injertos. En los últimos años se ha presentado una mejora considerable en la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para tejidos y órganos de trasplante tales como piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás el principal problema pendiente es la falta de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor para el órgano transplantado o aloinjerto. Cuando los órganos o las células alogénicas se transplantan en un huésped (es decir, el donante y el receptor son diferentes individuos de la misma especie), el sistema inmunológico probablemente monte una respuesta inmunológica a antígenos extraños en el trasplante (enfermedad de huésped versus injerto) conduciendo a la destrucción del tejido transplantado.

Los anticuerpos monoclonales para CD3 hechos por los métodos divulgados en este documento pueden usarse para identificar la presencia o ausencia de mastocitos de cáncer humano en una variedad de tejidos. Ha surgido la hipótesis de que los mastocitos con cáncer (CSC) cumplen una función en el crecimiento y metástasis tumoral (Ghotra, V.P. *et al.* (2009) "The Cancer Stem Cell Microenvironment And Anti-Cancer Therapy," *Int. J. Radiat. Biol.* 85(11):955-962; Gupta, P.B. *et al.* (2009) "Cancer Stem Cells: Mirage Or Reality?" *Nat. Med.* 15(9):1010-1012; Lawson, J.C. *et al.* (2009) "Cancer Stem Cells In Breast Cancer And Metastasis," *Breast Cancer Res. Treat.* 118(2):241-254; Hermann, P.C. *et al.* (2009) "Pancreatic Cancer Stem Cells--Insights And Perspectives," *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(10):1271-1278; Schatton, T. *et al.* (2009) "Identification And Targeting Of Cancer Stem Cells," *Bioessays* 31(10):1038-1049; Mittal, S. *et al.* (2009) "Cancer Stem Cells: The Other Face Of Janus," *Amer. J. Med. Sci.* 338(2):107-112; Alison, M.R. *et al.* (2009) "Stem Cells And Lung Cancer: Future Therapeutic Targets?" *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(9):1127-1141; Charafe-Jauffret, E. *et al.* (2009) "Breast Cancer Stem Cells: Tools And Models To Rely On," *BMC Cancer* 9:202; Scopelliti, A. *et al.* (2009) "Therapeutic Implications Of Cancer Initiating Cells," *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(8):1005-1016; Publicación por PCT WO 2008/091908). Bajo esta hipótesis, los CSC proveen un subgrupo pequeño distinto de células dentro de cada tumor que son capaces de autorenovarse indefinidamente y de desarrollarse en una o varias células tumorales más adultas que se limitan relativamente en su capacidad de replicación. Se ha llegado a la hipótesis de que estos mastocitos con cáncer podrían ser más resistentes a los agentes quimioterapéuticos, radiación u otras condiciones tóxicas, y de este modo, persisten después de las terapias clínicas y el crecimiento tardío en tumores secundarios, metástasis o en ser responsables de recaída. Se ha sugerido que los CSC pueden surgir de mastocitos de tejido 'normal' o de células progenitoras de tejidos más diferenciadas.

Los usos descritos en esta Solicitud que muestran su uso para anticuerpos anti-CD3 también abarcan el uso de otros agonistas de CD3, antagonistas y moduladores como se describe en este documento para el uso de identificación y tratamiento de mastocitos con cáncer. En dichas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y otros agonistas de CD3, antagonistas y moduladores se usan para la identificación, diagnóstico o tratamiento terapéutico de mastocitos con cáncer con el uso de métodos similares descritos, y las alteraciones dentro del alcance del especialista experimentado se hacen para definir el método para la identificación /diagnóstico o tratamiento de los mastocitos con cáncer.

Luego de haber descrito en general la divulgación, la misma se comprenderá más fácilmente a través de referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden limitar la presente divulgación salvo que se indique de otro modo.

Ejemplo 1

mAb1 unido a CD3 tanto humano como de mono macaco

Con el fin de evaluar la capacidad de mAb1 de unirse a CD3 humano, se realizó un ELISA de captura. Las placas se recubrieron con 1 µg/ml de CD3 soluble de macaco ("sCD3") y se incubó en la presencia de varias concentraciones de una variante quimérica de anticuerpo mAb1 (ch-mAb1) (que contenía las secuencias variables de mAb1 y las regiones constantes de un anticuerpo humano), una variante humanizada (h-mAb1) y un anticuerpo compuesto por la cadena liviana del anticuerpo mAb1 quimérico y la cadena pesada de la variante humanizada de mAb1. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 1A**. El experimento muestra la capacidad de mAb1 de unirse al CD3 de una especie de mamífero no humano. En forma adicional, la unión del anticuerpo mAb quimérico se comparó con la de un anticuerpo compuesto por la variante humanizada mAb1 LC-2 y la cadena pesada de mAb1. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 1B**. El experimento muestra la capacidad de mAb1 de unirse a CD3 humano. Las **Figuras 1A y 1B** de este modo revelan que el mAb1 humanizado fue capaz de unirse a ambos CD3 humano y a CD3 de un mamífero no humano. El mAb humanizado mostró unión a sCD3 y hCD3 que fue similar al mAb1 quimérico.

Ejemplo 2

Humanización de mAb1

Los derivados humanizados de mAb1 se prepararon. Las secuencias de aminoácidos y secuencias de polinucleótidos codificadoras de estos derivados humanizados se muestran a continuación. Los CDR se muestran en negrita y subrayados.

Secuencia de aminoácidos de Variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 1 (**SEC ID NRO.:10**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITC**SASSSVS YMNWYQKPG** KAPKRLIYDS
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPE DFATYYC**QQW SRNPPT**FGGG
 TKVEIK

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 1 (**SEC ID NRO.:11**):

gacatccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgcct ctgtgggcga
 cagagtgaca atcacctggt ccgccagctc ctccgtgtcc tacatgaact
 ggtatcagca gaagcccggc aaggcccca agcggctgat ctacgactcc
 tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga ttctccggct ctggctccgg
 caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccag gacttcgcca
 cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc cccctacctt cggcggaggc accaaggtgg
 aatcaag

Secuencia de aminoácidos de variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 2 (mAb1 LC-2) (**SEC ID NRO.:12**):

DVVMTQSPAI MSAFPGEKVT ITC**SASSSVS YMNWYQKPG** KAPKRWIYDS
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPE DFATYYC**QQW SRNPPT**FGGG
 TKVEIK

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 2 (**SEC ID NRO.:13**):

gacgtggtga tgaccagtc tctgcatc atgagtgctt tcccaggcga
 gaaagtgacc attacatgct ctgctccag ctctgtgtcc tacatgaact
 ggtatcagca gaagccaggg aaagcaccca agaggtggat ctacgactcc
 tccaagctgg cctccggcgt gccaaagcgg ttctctggta gtggctcagg
 aaccgagttt actctgacca tttccagcct gcagcctgaa gatttcgcaa

catactattg tcagcagtgg tccagaaatc cccctacatt tggcggaggg actaaagtgg
 aatcaag

Secuencia de aminoácidos de la cadena variable pesada de mAb1 humanizado (**SEC ID NRO.:14**):

5 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RSTMHWVRQA PGQGLEWIGY
INPSSAYTNY NQKFKDRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCASPQ
VHYDYNGFY WGQGTLVTVS S

Secuencia de polinucleótido que codifica la cadena variable pesada de mAb1 humanizado (**SEC ID NRO.:15**):

10 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc
 cgtgaagggtg tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc cggccacca
 tgcactgggtg gcgacaggcc ccaggccagg gactggaatg gatcggctac
 atcaaccctt ccagcgcta caccaactac aaccagaaat tcaaggaccg
 cgtgaccatc accgccgaca agtccaccag caccgcctac atggaactgt
 ctagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcg ctccccccag
 15 gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt
 gacagtgtcc tcc

Ejemplo 3

Humanización de mAb2

20 Los derivados humanizados de mAb2 se prepararon. Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de polinucleótidos codificadoras de estos derivados humanizados se muestran a continuación. Los CDR se muestran en negrita y subrayados.

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 1 (h-mAb2 VL-1) (**SEC ID NRO.:16**):

25 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 1 (h-mAb2 VL-1) (**SEC ID NRO.:17**):

30 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg gttccagcag aagccaggac aggaccaag gaccctgatc
 ggggggtacaa aaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga

35 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 2 (h-mAb2 VL-2) (**SEC ID NRO.:18**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

40 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 2 (h-mAb2 VL-2) (**SEC ID NRO.:19**):

ES 2 732 213 T3

5 caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 3 (h-mAb2 VL-3) (SEC ID NRO.:20):

10 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQE KPGQAPRTLI
GTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 3 (h-mAb2 VL-3) (SEC ID NRO.:21):

15 caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
20 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 4 (h-mAb2 VL-4) (SEC ID NRO.:22):

25 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPGQAPRGLI
GTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 4 (h-mAb2 VL-4) (SEC ID NRO.:23):

30 caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg gttccagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
35 ggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 5 (h-mAb2 VL-5) (SEC ID NRO.:24):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAPRTLI
GTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF

ES 2 732 213 T3

GGGTKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 5 (h-mAb2 VL-5) (**SEC ID NRO.:25**):

5 caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
10 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 6 (h-mAb2 VL-6) (**SEC ID NRO.:26**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
15 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 6 (h-mAb2 VL-6) (**SEC ID NRO.:27**):

20 caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

25 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 7 (h-mAb2 VL-7) (**SEC ID NRO.:28**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQE KPGQAPRGLI
GGTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

30 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 7 (h-mAb2 VL-7) (**SEC ID NRO.:29**):

35 caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

ES 2 732 213 T3

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 8 (h-mAb2 VL-8) (SEC ID NRO.:30):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
5 GGGTKLTVLG

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 8 (h-mAb2 VL-8) (SEC ID NRO.:31):

caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
10 acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgac
gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

15 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 9 (h-mAb2 VL-9) (SEC ID NRO.:32):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAFRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

20 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 9 (h-mAb2 VL-9) (SEC ID NRO.:33):

caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcattcag gggcctgac
25 ggggggtacaa aaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

30 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 10 (h-mAb2 VL-10) (SEC ID NRO.:34):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPDHLFTGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

35 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 10 (h-mAb2 VL-10) (SEC ID NRO.:35):

caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact
acgctaattg gttccagcag aagcccgacc acctgttcac tgggctgac
ggcggaacca aaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag

ES 2 732 213 T3

tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

5 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 1 (h-mAb2 VH-1) (**SEC ID NRO.:36**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS WFAIWGQGTL VTVSS

10 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 1 (h-mAb2 VH-1) (**SEC ID NRO.:37**):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
15 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tccgcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

20 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 2 (h-mAb2 VH-2) (**SEC ID NRO.:38**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS WFAIWGQGTL VTVSS

25 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 2 (h-mAb2 VH-2) (**SEC ID NRO.:39**):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
30 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tccgcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

35 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 3 (h-mAb2 VH-3) (**SEC ID NRO.:40**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS WFAIWGQGTL VTVSS

ES 2 732 213 T3

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 3 (h-mAb2 VH-3) (**SEC ID NRO.:41**):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
5 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
10 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 4 (h-mAb2 VH-4) (**SEC ID NRO.:42**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
15 **HGNFGNSYVS WFAY**WGQGTL VTVSS

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 4 (h-mAb2 VH-4) (**SEC ID NRO.:43**):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
20 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca gggcacactg
25 gtgaccgtgt ccagc

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 5 (h-mAb2 VH-5) (**SEC ID NRO.:44**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
30 **HGNFGNSYVS WFAY**WGQGTL VTVSS

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 5 (h-mAb2 VH-5) (**SEC ID NRO.:45**):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
35 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga

ES 2 732 213 T3

cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca gggcacactg
gtgaccgtgt ccagc

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 6 (h-mAb2 VH-6) (SEC ID NRO.:46):

5 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 6 (h-mAb2 VH-6) (SEC ID NRO.:47):

10 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
15 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 7 (h-mAb2 VH-7) (SEC ID NRO.:48):

20 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 7 (h-mAb2 VH-7) (SEC ID NRO.:49):

25 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
30 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizado 8 (h-mAb2 VH-8) (SEC ID NRO.:50):

35 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado 8 (h-mAb2 VH-8) (SEC ID NRO.:51):

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggagggtc
 cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta
 tgaattgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcaagg
 atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa
 5 ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
 aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
 ggggacactg gtgactgtgt ctcc

10 Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado QV (h-mAb2 VL-QV) (SEC ID NRO.:52):

EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNLLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

15 Secuencia de polinucleótido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizado QV (h-mAb2 VL-QV) (SEC ID NRO.:53):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctgggtgcagc caaagggatc
 actgaaactg tcctgcgccg cctccggctt cacctttaac acatacgcta
 tgaattgggt gcgacaggca cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg
 atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa
 20 ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt ctgtatctgc
 agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgccc
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
 ggggacactg gtgactgtgt ctcc

Ejemplo 4

25 **mAb2 se une a CD3 tanto humano como de mono macaco**

Como se discutió con anterioridad, el anticuerpo mAb2 se aisló originalmente en base a la capacidad de unirse a CD3 humano. Con el fin de evaluar la capacidad de mAb2 de unirse a CD3 no humano, se realizó un ELISA de captura. Las placas se recubrieron con 1 µg/ml de CD3 (ya sea humano o de mono macaco) y se incubaron en la presencia de varias concentraciones de una variante quimérica de anticuerpo mAb2 (ch-mAb2) (que contenía las secuencias variables de mAb2 y las regiones constantes de un anticuerpo humano). Como control, también se incubaron las placas con un anticuerpo compuesto por la cadena liviana de un anticuerpo mAb2 humanizado y la cadena pesada del anticuerpo quimérico. Los resultados de este experimento se muestran en las **Figuras 2A y 2B**, y revelan que la variante quimérica mAb2 exhibió unión equivalente a CD3 humano y a CD3 de mono macaco.

Ejemplo 5

35 **Análisis de las características de unión de las variantes de h-mAb2 de cadenas livianas y cadenas pesadas**

Se condujo un análisis para determinar el efecto de variaciones en los residuos de marco de la cadena liviana de mAb2. La **Tabla 2** indica las sustituciones estudiadas.

Tabla 2										
Cadena liviana										
Residuo de Kabat Nro.		36	38	41	42	43	44	45	46	SEC ID NRO.:
SEC ID NRO.: 5 Residuo Nro.:		38	40	43	44	45	46	47	48	
Variante	mAb2-VL	V	E	D	H	L	F	T	G	5
	h-mAb2 VL-1	F	Q	G	Q	A	P	R	T	16
	h-mAb2 VL-2	V								18
	h-mAb2 VL-3		E							20
	h-mAb2 VL-4								G	22
	h-mAb2 VL-5	V	E							24
	h-mAb2 VL-6	V							G	26
	h-mAb2 VL-7		E						G	28
	h-mAb2 VL-8	V	E						G	30
	h-mAb2 VL-9	V	E				F		G	32
	h-mAb2 VL-10			D	H	L	F	T	G	34
Cadena pesada										
Residuo de Kabat Nro.		30	49	52a	58	93				SEC ID NRO.:
SEC ID NRO.:7 Residuo Nro.:		30	49	53	61	99				
Variante	mVH	N	A		Y	V				7
	hVH-1	S	G			A				36
	hVH-2	N								38
	hVH-3		A							40
	hVH-4					V				42
	hVH-5	N	A							44
	hVH-6	N				V				46
	hVH-6L	N			E	V				54
	hVH-6M	N		N	E	V				72
	hVH-7		A			V				48
	hVH-8	N	A			V				50
	hVH-8L	N	A		E	V				55
	hVH-8M	N	A	N	E	V				74

Los anticuerpos que tienen cadenas livianas de mAb2 de **SEC ID NRO.:11**, pero que contienen una sustitución (numerada por Kabat) de D41G, H42Q, L43A, F44P, T45R, o G46T y cadenas pesadas de mAb2 quimérico (CDR de mAb2 con hFR1-mFR2-hFR3-4) se formaron y su unión se evaluó con el uso de un ELISA de captura. Las placas se recubrieron con 1 µg/ml del dominio extracelular de CD3 humano (hCD3 soluble o "shCD3") y se incubaron en la presencia de varias concentraciones de anticuerpo. Los resultados (**Figura 3**) indican que una sustitución de T en la posición de Kabat 46 eliminó la habilidad del anticuerpo de unirse a shCD3.

5

Se condujeron estudios adicionales para evaluar el impacto de las variaciones en las posiciones de cadena liviana de Kabat 36, 38, 44 y 46. Se formaron anticuerpos que tienen una cadena liviana de h-mAb2 VL-8, h-mAb2 VL-9 o h-mAb2 VL-10 y la cadena pesada del anticuerpo quimérico mAb2 y se evaluaron con el uso del ELISA de captura descrito con anterioridad. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 4**, y revelan que la unión a shCD3 por parte de un anticuerpo que tiene el hVL-8 de cadena liviana fue similar a la de un anticuerpo que tiene el mAb2 quimérico de cadena liviana.

Además, se formaron anticuerpos que tienen un h-mAb2 VL-6, h-mAb2 VL-7 o h-mAb2 VL-8 de cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo quimérico mAb2 y se evaluaron con el uso del ELISA de captura descrito con anterioridad (excepto que las placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de shCD3 en solución salina con tampón de fosfato) para determinar el impacto de las sustituciones adicionales en las posiciones 36, 38 y 46. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 5**, y revelan que las sustituciones de Kabat F36V y T46G fueron suficientes para producir un anticuerpo cuya unión a shCD3 fue similar a la de un anticuerpo que tiene el mAb2 quimérico de cadena liviana.

El impacto de las sustituciones en la secuencia de la cadena pesada de mAb2 se evaluó por la formación de anticuerpos que tienen la cadena liviana del anticuerpo mAb2 quimérico y cadena pesada h-mAb2 VH-5, h-mAb2 VH-6 o h-mAb2 VH-7 y evaluar la unión con el uso del ELISA de captura descrito con anterioridad (usando un recubrimiento a 1 µg/ml de shCD3). Los resultados de estas investigaciones se muestran en la **Figura 6**. En forma adicional se formaron anticuerpos que tienen la cadena liviana del anticuerpo mAb2 quimérico y una variante humanizada de cadena pesada h-mAb2 VH-4, h-mAb2 VH-7 o h-mAb2 VH-9. Se evaluó la unión de dichos anticuerpos con el uso del ELISA de captura descrito con anterioridad. Los resultados de estas investigaciones se muestran en la **Figura 7**.

Las cadenas pesadas hVH-6L (y su variante, hVH-6M), y hVH-8L (y su variante VH-8M) son particularmente preferidas para producir anticuerpos que tienen una afinidad inferior por CD3 que los anticuerpos compuestos por hVH-1, hVH-2, hVH-3, hVH-4, hVH-5, hVH-6, hVH-7 o hVH-8 de la **Tabla 2**. Dichos anticuerpos de afinidad reducida con preferencia estarán compuestos por cualquiera de cadena pesada hVH-6L o cadena pesada VH-8L en combinación con cualquiera de las cadenas livianas de h-mAb2 VL-1, h-mAb2 VL-2, h-mAb2 VL-3, h-mAb2 VL-4, h-mAb2 VL-5, h-mAb2 VL-6, h-mAb2 VL-7, h-mAb2 VL-8, h-mAb2 VL-9, o h-mAb2 VL-10. Un anticuerpo desimmunizado particularmente preferido estará compuesto por cadena pesada hVH-6L (o su variante, hVH-6M) y cadena liviana de h-mAb2 VL-6, o cadena pesada de hVH-8L (o su variante, hVH-8M) y cadena liviana de h-mAb2 VL-6. Las secuencias de dichos polipéptidos se presentan a continuación:

Secuencia de aminoácidos de hVH-6L (**SEC ID NRO.:54**):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS
```

Secuencia de aminoácidos de hVH-8L (**SEC ID NRO.:55**):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS
```

Las cadenas pesadas de hVH-6L y hVH-8L se modificaron en forma adicional para producir variantes que poseen una modificación de asparagina en la posición 52a (S52aN). Las secuencias de aminoácidos y las correspondientes secuencias de codificación de polinucleótidos de estas cadenas pesadas modificadas son como sigue:

Secuencia de aminoácidos de hVH-6M (**SEC ID NRO.:72**):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS
```

Secuencia de polinucleótido que codifica hVH-6M de cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:73**):

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta
tgaattgggt ccgccaggct ccaggaaggg ggctggagtg ggttgggaagg
```

atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa
 ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
 aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
 cacggttaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg
 5 gtgactgtgt cttcc

Secuencia de aminoácidos de hVH-8M (**SEC ID NRO.:74**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
 IRNKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
 HGNFVNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

10 Secuencia de polinucleótido que codifica hVH-8M de cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:75**):

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
 cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta
 tgaattgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcaagg
 atcaggaaca agtacaaca ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa
 15 ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
 aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
 cacggttaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
 ggggacactg gtgactgtgt cttcc

20 Las cadenas pesadas de hVH -8 di-1 y hVH-8 di-2 son particularmente preferidas para producir anticuerpos que son menos inmunogénicos que los anticuerpos compuestos por hVH-1, hVH-2, hVH-3, hVH-4, hVH-5, hVH-6, hVH7 o hVH-8 de la **Tabla 2**. Dichos anticuerpos desinmunizados estarán compuestos con preferencia por cualquiera de cadena pesada hVH-8 di-1 o cadena pesada hVH-8 di-2 en combinación con cualquiera de las cadenas livianas de h-mAb2 VL-1, h-mAb2 VL-2, h-mAb2 VL-3, h-mAb2 VL-4, h-mAb2 VL-5, h-mAb2 VL-6, h-mAb2 VL-7, h-mAb2 VL-8, h-mAb2 VL-9, o h-mAb2 VL-10. Un anticuerpo desinmunizado particularmente preferido estará compuesto por
 25 cadena pesada hVH-8 di-1 y cadena liviana h-mAb2 VL-6, o cadena pesada de hVH-8 di-2 y cadena liviana h-mAb2 VL-6.

Secuencia de aminoácidos de hXR32VH-8 di-1 (**SEC ID NRO.:56**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
 TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
 30 HGNFVNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Secuencia de aminoácidos de hXR32VH-8 di-2 (**SEC ID NRO.:57**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
 TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
 HGNFVNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

35 Dichos anticuerpos desinmunizados estarán compuestos con preferencia por cualquiera de cadena pesada hVH-8L di-1 o cadena pesada de VH-8L di-2 en combinación con cualquiera de las cadenas livianas de h-mAb2 VL-1, h-mAb2 VL-2, h-mAb2 VL-3, h-mAb2 VL-4, h-mAb2 VL-5, h-mAb2 VL-6, h-mAb2 VL-7, h-mAb2 VL-8, h-mAb2 VL-9, o h-mAb2 VL-10. Un anticuerpo desinmunizado particularmente preferido estará compuesto por cadena pesada hVH-9M di-1 y cadena liviana h-mAb2 VL-6, o cadena pesada de hVH-8L di-2 y cadena liviana h-mAb2 VL-6.

40 Las variantes humanizadas adicionales del anticuerpo monoclonal murino mAb2 de cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:7**) también se produjeron. Las secuencias de aminoácidos de dichas variantes se presentaron a continuación, con cambios a partir de **SEC ID NRO.:7** indicados en negrita y subrayados:

ES 2 732 213 T3

La secuencia de aminoácidos de la variante "a" (I51T Y52cA) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:76**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TASK**A**NNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
5 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "b" (I51T N54S) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:77**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNSYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
10 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "c" (I51T A56T) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:78**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNY**T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
15 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "d" (I51T Y52cA N54S) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:79**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKA**N**SYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
20 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "e" (I51T N54S A56T) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:80**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNSY**T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
25 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "f" (I51T Y52cA N54S A56T) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:81**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKA**N**S**Y**T YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
30 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "g" (I51T D61A) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:82**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYAT YYA**A**SVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
35 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "h" (I51T D65G) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:83**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYAT YYADSVKG**R**F TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
40 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "i" (I51T Y52cA N54S D61A) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:84**):

EVKLLES^GGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANSYAT YYAA^ASVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN^NLKT EDTAMYYCVR
 5 HG^NFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "j" (I51T Y52cA N54S D65G) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:85**):

EVKLLES^GGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANSYAT YYADSVK^GRF TISRDDSQSI LYLQMN^NLKT EDTAMYYCVR
 10 HG^NFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:86**):

EVKLLES^GGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANSYAT YYAA^ASVK^GRF TISRDDSQSI LYLQMN^NLKT EDTAMYYCVR
 15 HG^NFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

La secuencia de aminoácidos de la variante "2k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-A49G V93A)) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:87**):

EVQLVES^GGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN^N TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
TRSKANSYTT YYAA^ASVK^GRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
 20 HG^NFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSS

La secuencia de aminoácidos de la variante "5k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal murino humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:88**):

EVQLVES^GGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN^N TYAMNWVRQA PGKGLEWV^AR
TRSKANSYTT YYAA^ASVK^GRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
 25 HG^NFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSS

Todas dichas variantes humanizadas adicionales del anticuerpo monoclonal murino mAb2 de cadena pesada puede emplearse para formar los anticuerpos desinmunizados de la presente divulgación. Dichos anticuerpos humanizados y desinmunizados adicionales estarán compuestos preferentemente por cualquiera de las cadenas pesadas: **a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, 2k** o **5k**, en combinación con cualquiera de las cadenas livianas: h-mAb2 VL-1, h-mAb2 VL-2, h-mAb2 VL-3, h-mAb2 VL-4, h-mAb2 VL-5, h-mAb2 VL-6, h-mAb2 VL-7, h-mAb2 VL-8, h-mAb2 VL-9, o h-mAb2 VL-10. Un anticuerpo desinmunizado particularmente preferido estará compuesto por cadena pesada **2k** o **5k** y cadena liviana de h-mAb2 VL-6, o cadena pesada de hVH-8M8L di-2 y cadena liviana h-mAb2 VL-6. Las variantes **2k** y **5k** se unen a la proteína A en la región variable, facilitando de este modo la purificación de moléculas (tales como dímeros) que pueden carecer de regiones de Fc u otros dominios que pueden usarse para secuestrar dichas moléculas de otras moléculas. Las variantes hVH-8M, hVH-8L, hVH-6M y hVH-6L exhibieron inmunogenicidad reducida con relación a sus respectivos polipéptidos progenitores.

La divulgación en particular se refiere a anticuerpos humanizados y desinmunizados compuestos por cadena pesada de hVH-8 y cadena liviana de VL-6. La divulgación en forma adicional en particular se refiere a anticuerpos humanizados y desinmunizados compuestos por cadena pesada de hVH-4 y cadena liviana de VL-6. La divulgación en forma adicional en particular se refiere a anticuerpos humanizados y desinmunizados compuestos por cadena pesada de hVH-**2k** y cadena liviana de VL-6

Ejemplo 6

Análisis de las características de unión de las variantes de MAb2 quimérico y humanizado, cadenas pesadas y livianas

45 Con el fin de evaluar la capacidad de mAb2 quimérico y humanizado de unirse a CD3 no humano, se realizó un ELISA de captura. Las placas se recubrieron con 1 µg/ml del dominio extracelular de CD3 (CD3 soluble) (ya sea

humano o de mono macaco) y se incubaron en la presencia de varias concentraciones de anticuerpo. Los resultados de este experimento se muestran en las **Figuras 8A y 8B**, y revelan que mAb2 y su variante humanizada exhibió unión equivalente a CD3 soluble humano y a CD3 soluble de mono macaco.

Ejemplo 7

5 Cuantificación de la unión de mAb2 a CD3 Humano y de Mono macaco

Con el fin de cuantificar el grado de unión entre mAb2 y CD3 humano o de mono macaco, se condujeron análisis BIACORE™. El análisis BIACORE™ mide la constante de disociación, k_d . La afinidad de unión (K_D) entre un anticuerpo y su blanco es una función de constantes cinéticas para asociación (constante de asociación, k_a) y disociación (constante de disociación, k_d) de acuerdo con $K_D = k_d/k_a$. El análisis BIACORE™ usa resonancia plasmónica de superficie para medir directamente estos parámetros cinéticos. El anticuerpo anti-CD3 mAb2 (6,3-100 nM) se inmovilizó a un soporte con el uso de anticuerpos anti-EK y se incubó en la presencia de CD3 humano soluble (shCD3) o CD3 soluble de mono macaco (scCD3). El transcurso del tiempo de disociación se midió y se condujo un ajuste bivalente de los datos. Los resultados del análisis BIACORE™ se muestran en las **Figuras 9A-9D**. Los datos de cinética se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3			
shCD3			
Anticuerpo	k_a	k_d	K_D
ch-mAb2	$1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$2,5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$	14,7 nM
h-mAb2	$1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$3,8 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$	20,0 nM
scCD3			
Anticuerpo	k_a	k_d	K_D
ch-mAb2	$1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$2,3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$	14,4 nM
h-mAb2	$1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$4,1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$	24,1 nM

15 Ejemplo 8

Datos de unión biespecífica para diacuerpos DART™ que contienen CDR de h-mAb2

Los CDR de mAb2 humanizados (h-mAb2) se usaron para producir una serie de diacuerpos DART™ que tienen un primer sitio de unión al epítoto anti-CD3 y un segundo sitio de unión al epítoto capaz de unirse a Her2/neu (diacuerpo DART™ "Her2-h-mAb2"), o a CD19 (diacuerpo DART™ "CD19-h-mAb2") o al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (diacuerpo DART™ "ERBITUX™-h-mAb2").

diacuerpo DART™ Her2/neu-h-mAb2

Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-Her-2VH de E coil del diacuerpo DART™ Her2-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia Her2VH y entre la secuencia Her2VH y la secuencia E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:58**):

25 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGQV QLQQSGPELV KPGASLKLSC TASGFNIKDT
YIHWVKQRPE QGLEWIGRIY PTNGYTRYDP KFQDKATITA DTSSNTAYLQ
VSRLTSEDTA VYYCSRWGGD GFYAMDYWGQ GASVTVSSGG CGGGKVAALK
30 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

Secuencia de aminoácidos de Her2VL-hXR32VH-K coil del diacuerpo DART™ Her2-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia Her2VL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia de K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:59**):

35 DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQK GHSPKLLIYS
ASFRYTGVPD RFTGNRSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYTTPTTFGG

GTKLEIKRAG GGSGGGGEVQ LVESGGGLVQ PGGSLRLSCA ASGFTFNTYA
 MNWVRQAPGK GLEWVARIRS KYNNYATYYA DSVKDRFTIS RDDSKNSLYL
 QMNSLKTEDT AVYYCVRHGN FGNSYVSWFA YWGQGTTLVTV SSGGCGGGEV
 AALEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEK

5 **diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2**

Secuencia de aminoácidos de CD19VL-hXR32VH-E coil del diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ (las ligaduras entre la secuencia CD19VL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:60**):

DIQLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYLNWY QQIPGQPPKL
 10 LIYDASNLVS GIPPRFSGSG SGTDFTLNIH PVEKVDAATY HCQQSTEDPW
 TFGGGTKLEI KGGSGGGGGE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFNT
 YAMNWRQAP GKGLEWVARI RSKYNNYATY YADSVKDRFT ISRDDSKNSL
 YLQMNSLKTE DTAVYYCVRH GNFGNSYVSW FAYWGQGTLV TVSSGGCGGG
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEK

15 Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-CD19VH-K coil del diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia CD19VH y entre la secuencia CD19VH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:61**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 20 GGGTKLTVLG GGSGGGGQV QLQQSGAELV RPSGSSVKISC KASGYAFSSY
 WMNWVKQRPQ QGLEWIGQIW PGDGDNTYNG KFKGKATLTA DESSTAYMQ
 LSSLASEDSA VYFCARRETT TVGRYYYAMD YWGQGTTVTV SSGGCGGGKV
 AALKEKVAAL KEKVAALKEK VAALKE

ERBITUX™-h-mAb2 diacuerpo DART™

25 Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-EGFRVH-E coil del diacuerpo DART™ ERBITUX™-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia EGFRVH y entre la secuencia EGFRVH y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:62**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 30 GGGTKLTVLG GGSGGGGQV QLKQSGPGLV QPSQSLSTC TVSGFSLTNY
 GVHWVRQSPG KGLEWLGVIW SGGNTDYNTF FTSRLSINKD NSKSQVFFKM
 NSLQSNDAI YYCARALTY YEFAYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAALEK
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE K

35 Secuencia de aminoácidos de EGFRVL-hXR32VH-Kcoil del diacuerpo DART™ ERBITUX™-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia EGFRVL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:63**):

DILLTQSPVI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TNIHWYQQRT NGSPRLLIKY
 ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ NNNWPTTFGA
 GTKLELKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN
 40 WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM

NSLKTEDTAV YYCVRHGNGF NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGKVAA
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Dichos diacuerpos DART™ se encontraron que son capaces de unirse a CD3 de mono macaco (**Figuras 10A-10C**).

5 Los CDR de mAb2 humanizados (h-mAb2) se usaron para producir una serie adicional de diacuerpos DART™ que tienen un primer sitio de unión al epítoto anti-CD3 y un segundo sitio de unión al epítoto capaz de unirse a B7-H3 (diacuerpo DART™ “B7-H3-1-h-mAb2” y B7-H3-2-h-mAb2”).

diacuerpo DART™ B7-H3-1-h-mAb2

10 Secuencia de aminoácidos del hBRCA69DVL-hXR32VH-E coil del diacuerpo DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hBRCA69DVL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:64**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
 GTKLEIKGGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFNTYAM
 NWVRQAPGKG LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ
 15 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNGF GNSYVSWFAY WGQGTLVTVS SGGCGGGEVA
 ALEKEVAALKE KEVAALKEKVA ALEK

Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-hBRCA69DVH-K coil del diacuerpo DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia hBRCA69DVH y entre la secuencia hBRCA69DVH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:65**):

20 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
 WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
 LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGKVAALK
 25 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

diacuerpo DART™ B7-H3-2-h-mAb2

Secuencia de aminoácidos de hBRCA84DVL-hXR32VH-E coil del diacuerpo DART™ B7-H3-2-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hBRCA84DVL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:66**):

30 DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVN TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
 ASYRYSVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPPTFGG
 GTKLEIKGGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFNTYAM
 NWVRQAPGKG LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ
 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNGF GNSYVSWFAY WGQGTLVTVS SGGCGGGEVA
 35 ALEKEVAALKE KEVAALKEKVA ALEK

Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-hBRCA84DVH-K coil del diacuerpo DART™ B7-H3-2-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia hBRCA84DVH y entre la secuencia hBRCA84DVH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:67**):

40 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGLSLRLSC AASGFTFSSS

GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
 MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTTVTVSS GCGGGKVAA
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

5 Dichos diacuerpos DART™ se encontraron que son capaces de unirse a CD3 soluble de mono macaco (**Figura 10D**).

Ejemplo 9

Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s)

Diacuerpos Específicos para HER2/neu y CD3 Median potente destrucción de células T redirigida

10 Los diacuerpos de reactivo de redireccionamiento con afinidad dual (DART™) específicos para HER2/neu y CD3 se prepararon. Dichos diacuerpos DART™ tienen la capacidad de localizar una célula T (al unir dicha célula T a la porción que se une a CD3 de un diacuerpo DART™ que se une a CD3) en la ubicación de una célula tumoral (al unir dicha célula con cáncer a la porción que se une a HER2/neu del diacuerpo DART™). La célula T localizada puede mediar entonces la destrucción de la célula tumoral en un proceso denominado en este documento destrucción "redirigida".

15 El diacuerpo reactivo de redireccionamiento por afinidad dual (DART™) específico para HER2/neu y CD3 se construye de forma que tenga los dominios anti-HER2/neu variables de trastuzumab y los dominios variables anti-CD3 de h-mab2 VH-8 y h-mab2 VL-6 (**SEC ID NROs: 58-59**).

20 Con el fin de demostrar la capacidad de los diacuerpos DART™ de mediar dicha destrucción redirigida de células cancerosas, el antes mencionado diacuerpo DART™ HER2/neu x CD3 se incubaba en varias concentraciones con células de tumor de destino (Células de tumor SKOV-3, células de tumor SKBR-3, células de tumor A549, y células de tumor MCF-7) y se determina PBMC efectoras en reposo (proporción E:T = 30:1) y citotoxicidad (ensayo LDH). Los resultados de estas investigaciones demuestran la capacidad del diacuerpo DART™ HER2/neu x CD3 para mediar la destrucción redirigida de células tumorales.

Ejemplo 10

25 Terapia con anticuerpo monoclonal anti-TCR para pacientes con diabetes autoinmune

Pacientes: Cuarenta pacientes con diabetes Tipo 1 se reclutan para participación de acuerdo con los siguientes criterios: entre 7 y 20 años de edad, dentro de 6 semanas de diagnóstico de acuerdo con los criterios de la American Diabetes Association, y confirmación de la presencia de anticuerpos anti-GAD65, anti-ICA512, y/o anti-insulina. Los pacientes permanecen bajo el cuidado de sus médicos personales durante el transcurso del estudio.

30 Los pacientes elegibles se asignan en forma aleatoria a un grupo de control y un anticuerpo anti-CD3 humanizado (N297Q) (que comprende h-mab2 VH-8 y h-mab2 VL-6) como grupos de tratamiento. Luego de la aleatorización, se extrajeron muestras de sangre para establecer los niveles de HA1c basales, una respuesta al C-péptido de pretratamiento a un MMTT se establece y se realiza un FPIR de pretratamiento a IGTT. Los pacientes en ambos grupos se hospitalizan para recibir o bien un tratamiento de 6 días de anticuerpo monoclonal anti-CD3 humanizado
 35 (N297Q) o placebo. El anticuerpo se administra por vía intravenosa en la siguiente dosificación: 17 µg/m² el día 1, 34,3 µg/m² el día 2, 69 µg/m² el día 3, 137,6 µg/m² el día 4, y 275,3 µg/m² los días 5 y 6. En forma alternativa, el anticuerpo puede administrarse por vía intravenosa en la siguiente dosificación: 1,6 µg/kg/día el día 1; 3,2 µg/kg/día el día 2; 6,5 µg/kg/día el día 3; 13 µg/kg/día el día 4; y 26 µg/kg/día los días 5 a 14. En los estudios de aumento de la dosis, el tratamiento puede ser, por ej., 1,42 µg/kg/día el día 1; 5,7 µg/kg/día el día 2; 11 µg/kg/día el día 3; 26
 40 µg/kg/día el día 4; y 45,4 µg/kg/día los días 5 a 14. En estudios posteriores, la terapia se altera para aumentar la dosificación y/o reducir el transcurso del tiempo de tratamiento. Por ejemplo, en estudios posteriores puede administrarse a los pacientes un tratamiento de 4 días: 6,4 µg/kg/día el día 1; 13 µg/kg/día el día 2, y 26 µg/kg/día los días 3 y 4.; durante los estudios adicionales de aumento de la dosis, el tratamiento puede ser 8 µg/kg/día el día 1; 16 µg/kg/día el día 2; y 32 µg/kg/día los días 3 y 4.

45 Durante los estudios iniciales la dosificación del anticuerpo en los primeros tres días de tratamiento se administra por medio de la infusión IV durante 20 horas para monitorear las reacciones adversas. Estudios posteriores disminuirán el tiempo de administración y/o separarán la dosificación en 2 a 4 partes iguales que se administrarán como inyección en bolos distribuida en forma pareja en el transcurso de 12 horas. Los pacientes en el grupo de control sufren análisis metabólicos e inmunológicos pero no reciben anticuerpos monoclonales. Se monitorean los pacientes durante todo el estudio para determinar los efectos inmunosupresores del anticuerpo monoclonal anti- CD3 (N297Q).

Se monitorea a los pacientes durante 18 meses después del tratamiento. La función de las células β se determina cada 6 meses en el caso de intolerancia a la glucosa y cada 12 meses en el caso de tolerancia normal a la glucosa. Se permite que los pacientes tengan una dieta normal, y permanezcan bajo el cuidado de su médico personal

mientras dura el estudio. Se repiten los ensayos inmunológicos en intervalos de 6 meses. Se aplicará tratamiento de insulina a pacientes como lo indica su médico personal.

La función de las células β se analizará de acuerdo con los cambios de los niveles de péptidos C según se mide por radioinmunoensayo. Después de extraer muestras para C-péptido basal y glucosa, se da a los pacientes una comida mixta. Los niveles de C-péptido se miden en muestras extraídas después de 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min. La respuesta del C-péptido a la prueba de tolerancia de comida mixta (MMTT) se expresa como el área total bajo la curva de respuesta (AUC). Se considera que ha ocurrido un cambio en la respuesta si la respuesta difiere por más de 7,5 por ciento de respuesta al ingresar al estudio. Las respuestas del C-péptido de los pacientes a MMTT se monitorean continuamente 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses y 18 meses después del tratamiento. En forma alternativa, la función de las células β se evalúa por FPIR a IGTT. Los niveles séricos de insulina se miden por una modificación de un método de radioinmunoensayo de doble anticuerpo con el uso de tirosina A14-insulina marcada monoyodada (Amersham Pharmacia). FPIR se calcula como la suma de los niveles de insulina a los 1 y 3 minutos después de la carga de glucosa (0,5 g/kg). Los niveles de hemoglobina glicosilada se miden por la prueba de inhibición por aglutinación de látex.

Monitoreo inmunológico: El nivel de autoanticuerpos contra GAD65, IA2/ICA512, e insulina se miden con ensayos de radiounión como se conoce en la materia (por ej., Woo et al., 2000, J. Immunol Methods 244:91-103). La determinación de genotipos HLA-DQA y HLA-DQB se realiza por secuenciación directa de 2 polimorfismos exónicos después de la amplificación por PCR. El nivel de citoquinas en el suero después de la administración del anticuerpo monoclonal se mide por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La producción de anticuerpos anti-idiotípicos se monitorea por ensayo ELISA con el uso de un anti-CD3 adherido a las placas (N297Q) o por citometría de flujo para medir el bloqueo de unión de anti-CD3-FITC a la cadena CD3 de TCR.

Análisis estadístico: Se conducirá el análisis de los datos sobre la función residual de las células beta, nivel de anticuerpos, nivel de citoquinas y nivel de hemoglobina glicosilada. Se realizará un análisis χ^2 para evaluar el efecto del tratamiento farmacológico antes y después de la administración del medicamento. La comparación entre el grupo de control y el grupo de tratamiento se realizará con el test de Mann-Whitney U.

Ejemplo 11

Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s) Diacuerpos Específicos para B7H3 y CD3 Median la potente destrucción de células T redirigida

Los reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™), Diacuerpos Específicos para el antígeno B7H3 y CD3 se prepararon. B7H3 se ha detectado en forma inmunohistoquímica en líneas celulares de tumor (Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production," Nature Immunol. 2:269-274; Saatian, B. et al. (2004) "Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation," Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287:L217-L225; Castriconi et al. (2004) "Identification Of 4lg-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34):12640-12645; Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," J. Immunol. 168:6294-6297). Varios estudios independientes han demostrado que las células de tumor maligno humano exhiben un marcado aumento en la expresión de proteína B7-H3 y que esta expresión aumentada se asoció con un aumento de la severidad de la enfermedad (Zang, X. et al. (2007) "The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition," Clin. Cancer Res. 13:5271-5279), lo que sugiere que B7-H3 está explotado por tumores como vía de evasión inmune (Hofmeyer, K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278).

La porción que se une a CD3 de dichos diacuerpos DART™ se comparó con las antes mencionadas regiones variables de cadena liviana y pesada del mAb2 anti-CD3 humanizado (h-mAb2 VH-8 y h-mAb2 VL-6). La porción de B7H3 de dichos diacuerpos DART™ estaba compuesta por hBRCA84D-2 de Cadena liviana y hBRCA84D-2 de Cadena pesada (**SEC ID NROs. 66-67**).

Dichos diacuerpos DART™ tienen la capacidad de localizar una célula T (al unir dicha célula T a la porción que se une a CD3 de un diacuerpo DART™ que se une a CD3) en la ubicación de una célula tumoral (al unir dicha célula con cáncer a la porción que se une a B7H3 del diacuerpo DART™). La célula T localizada puede mediar entonces la destrucción de la célula tumoral por medio del proceso de destrucción "redirigida".

Con el fin de demostrar la capacidad de dichos diacuerpos DART™ de mediar dicha destrucción redirigida de células cancerosas, el diacuerpo DART™ se incubó en varias concentraciones con células de tumor de destino (Células de tumor A498, Células de tumor RECA905021E) y PBMC efectoras en reposo (proporción E:T = 30:1) y se determinó la citotoxicidad (ensayo LDH). Un diacuerpo DART™ (4420-h-mAb2) que tiene especificidad dual por CD3 (h-mAb2) y fluoresceína (anticuerpo 4420) se empleó como control.

Diacuerpo DART™ 4420-h-mAb2

Secuencia de aminoácidos de 4420VL-hXR32VH-E coil del diacuerpo DART™ 4420-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia 4420VL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:68**):

5 DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVSNR F SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
 WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN
 TYAMNWRQA PGKLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDS KNS
 LYLQMNLSKT EDTAVYYCVR HG NFGNSYVS WFAYWGQGT L VTVSSGGCGG
 10 GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEK

Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-4420VH-K coil del diacuerpo DART™ 4420-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia 4420VH y entre la secuencia 4420VH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:69**):

15 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV KLD ETGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY
 WMNWRQSPE KGLEWVAQIR NKPYN YETYY SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY
 LQMNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCGGGKVAALKEK
 VAALKEKVAALKEKVAALKE

20 Los resultados de estas investigaciones (**Figuras 11A-11B**) demuestran la capacidad de los diacuerpos CD3 x B7H3 DART™ para mediar la destrucción redirigida de células de tumor que expresan B7H3.

Ejemplo 12

Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s) Diacuerpos Especificos para A33 y CD3 Median la potente destrucción de células T redirigida

25 Los reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™), Diacuerpos Especificos para el antígeno A33 y CD3 (diacuerpo DART™ "A33-h-mAb2") se prepararon. A33 es un antígeno de la membrana que se expresa en epitelio colónico humano normal y de intestino delgado y >95% de los cánceres de colon humanos (Heath, J.K. *et al.* (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein and a Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 94:469-474).

30 Dichos diacuerpos DART™ tienen la capacidad de localizar una célula T (al unir dicha célula T a la porción que se une a CD3 de un diacuerpo DART™ que se une a CD3) en la ubicación de una célula tumoral (al unir dicha célula con cáncer a la porción que se une a A33 del diacuerpo DART™). La célula T localizada puede mediar entonces la destrucción de la célula tumoral por medio del proceso de destrucción "redirigida".

35 La porción que se une a CD3 de dichos diacuerpos DART™ estaba compuesta por las antes mencionadas regiones variables de cadena liviana y pesada de mAb2 humanizados (h-mAb2 VH-8 y h-mAb2 VL-6). La porción A33 de dichos diacuerpos DART™ estaba compuesta por el anticuerpo RECA47.

Diacuerpo DART™A33-h-mAb2

40 Secuencia de aminoácidos de RECA47VL-hXR32VH-K coil del diacuerpo DART™ A33-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia RECA47VL y la secuencia hXR32VH y entre la secuencia hXR32VH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:70**):

QIVLTQSPAI MSASPGERVT MTCSARSSIS FMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
 SNLASGVPVR FSGSGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYCQQW SSYPLTFGSG
 TKLELKRGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM

NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGKVAA LKEKVAALKE
KVAALKEKVA ALKE

Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-RECA47VH-E coil del diacuerpo DART™ A33-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL y la secuencia RECA47VH y entre la secuencia RECA47VH y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:71**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGQV QLQQSGPELV KPGASVKISC KASGYTFSGS
WMNWVKQRPG QGLEWIGRIY PGDGETNYNG KFKDKATLTA DKSSTTAYME
LSSLTSVDSA VYFCARIYGN NVYFDVWGAG TTVTVSSGGC GGGEVAALEK
EVAALEKEVA ALEKEVAALE K

Con el fin de demostrar la capacidad de dichos diacuerpos DART™ de mediar dicha destrucción redirigida de células cancerosas, el diacuerpo DART™ se incubó a varias concentraciones con células de tumor de destino (células de tumor Colo205, células de tumor RECA905021E) y PBMC efectoras en reposo (proporción E:T = 30:1) y se determinó la citotoxicidad (Ensayo LDH). Los resultados de estas investigaciones (**Figuras 12A-12E**) demuestran la capacidad de A33 x Diacuerpos DART™ CD3 para mediar la destrucción redirigida de células de tumor que expresan A33.

Ejemplo 13

Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s) Diacuerpos Específicos para CD3

hacen que la destrucción mediada por células T redirigidas sea equivalente a la de otros diacuerpos de CD3 específicos de los humanos

Con el fin de evaluar en forma adicional los diacuerpos reactivos específicos de CD3 de reorientación de afinidad dual (DART™) de la presente divulgación, la capacidad del antes mencionado diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 para producir la destrucción mediada por las células T redirigidas se comparó con el del diacuerpo CD19 x CD3 DART de Moore, P.A. *et al.* (2011) ("*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*," Blood 117(17):4542-4551). El diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ exhibe especificidad por CD3 humano así como también no humano; el diacuerpo CD19 x CD3 DART de Moore, P.A. *et al.* (2011)) exhibe especificidad sólo por CD3 humano.

De acuerdo con lo anterior, células de linfoma de células B humanas Raji (véase, Drexler, H.G. *et al.* (1998) "*History And Classification Of Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines*," Leuk. Lymphoma 31(3-4):305-316; Arndt, R. (1984) "*Demonstration Of C3-Binding Circulating Immune Complexes Using Raji, Conglutinin And Anti-C3 Assays--A Critical Review*," Immun. Infekt. 12(1):3-11) o células de linfoma de células de manto humano JeKo-1 (Salaverria, I. *et al.* (2006) "*Mantle Cell Lymphoma: From Pathology And Molecular Pathogenesis To New Therapeutic Perspectives*," Haematologica 91:11-16; Jeon, H.J. *et al.* (1998) "*Establishment And Characterization Of A Mantle Cell Lymphoma Cell Line*," Br. J. Haematol. 102(5):1323-1326) se incubaron en la presencia de un diacuerpo DART™ y células mononucleares de sangre periférica en reposo (PBMC) (E:T = 30:1). Los resultados de este experimento (**Figuras 13A y 13B**) revelaron que el diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ de la presente divulgación causó destrucción mediada por células T redirigidas que fue equivalente a la observada con el uso de un diacuerpo DART CD19 x CD3 específico para CD3 humano. De este modo la extensión de especificidad por homólogos de CD3 no humanos no dañó la habilidad del diacuerpo DART™ para mediar la destrucción redirigida.

Ejemplo 14

Citólisis redirigida por Reactivos de reacción cruzada de mono macaco de reorientación de afinidad dual (DART™s) - Diacuerpos Específicos para CD3

Se investigó la capacidad del antes mencionado diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 para producir la destrucción mediada por las células T redirigidas en la presencia de humano o mono macaco.

Células de cáncer de colon humano HT-29 (Marchis-Mouren, G. *et al.* (1988) "HT 29, A Model Cell Line: Stimulation By The Vasoactive Intestinal Peptide (VIP); VIP Receptor Structure And Metabolism," Biochimie 70(5):663-671); Fogh, J. *et al.* (1975) In: J. Fogh (ed.), HUMAN TUMOR CELLS IN VITRO, New York: Plenum Press. 1975) se incubaron en la presencia de células T humanas o de monos macacos (proporción E:T = 30:1) y cualquiera del antes mencionado diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 o un diacuerpo DART CD19 x CD3 cuyas secuencias de CD3 derivaron del anticuerpo FN-18. El anticuerpo FN-18 exhibe especificidad sólo por CD3 de mono macaco (Nooij, F.J. *et al.* (1986)

“Differentiation Antigens On Rhesus Monkey Lymphocytes. I. Identification Of T Cells Bearing CD3 and CD8, and Of A Subset Of CD8-Bearing Cells,” Eur. J. Immunol. 16(8):975-979; Meng, G. *et al.* (1998) “The Effect of Anti-CD3-Immunotoxin On T Lymphocyte Function *in vitro*,” Transpl. Immunol. 6(1):53-59). Se midió el porcentaje resultante de citotoxicidad como función de concentración del diacuerpo. Los resultados (**Figuras 14A y 14B**) muestran que el diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 fue capaz de mediar la citólisis en la presencia de células efectoras de células T tanto humanas como no humanas. En contraste, el diacuerpo FN-18 era capaz de mediar la citólisis en la presencia de células T de mono macaco.

Ejemplo 15

Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s), Diacuerpos que requieren compromiso de células de destino

Con el fin de demostrar que la destrucción redirigida observada mediada por los Diacuerpos DART™ CD3 de la presente divulgación era específica, se determinó el grado de destrucción en presencia y ausencia de células de destino.

Se incubaron PMBC humanas en presencia del antes mencionado diacuerpo DART™ ERBITUX™-h-mAb2, un diacuerpo DART™ ERBITUX™-receptor de células T (capaz de unirse a EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico) y el receptor de células T), o un diacuerpo DART™ ERBITUX™-FN18 CD3 (capaz de unirse a EGFR y a CD3 de mono macaco). Las incubaciones se condujeron en la presencia o ausencia de células de destino A498 de cáncer de riñón (Giard, D.J. *et al.* (1973) “*in vitro* Cultivation Of Human Tumors: Establishment Of Cell Lines Derived from a Series Of Solid Tumors,” J. Natl. Cancer Inst. 51:1417-1423; Fogh, J. (1978) “Cultivation, Characterization, and Identification Of Human Tumor Cells With Emphasis On Kidney, Testis And Bladder Tumors,” Natl. Cancer Inst. Monogr. 49:5-9).

La glicoproteína CD69 es un antígeno de activación inicial de linfocitos T y B que se expresa en células de la mayoría de los linajes hematopoyéticos, que incluyen neutrófilos después de la estimulación (Atzenia, F. *et al.* (2002) “Induction Of CD69 Activation Molecule On Human Neutrophils by GM-CSF, IFN- γ , and IFN- α ,” Cellular Immunol. 220(1): 20-29). The CD69 Mean Fluorescent Intensity (MFI) por lo tanto se midió (como función de la concentración de diacuerpos) como medio para evaluar la activación del sistema inmunológico (véase, por ej., Ampel, N.M. *et al.* (2002) “In Vitro Whole-Blood Analysis of Cellular Immunity In Patients With Active *Coccidioidomycosis* by Using the Antigen Preparation T27K,” Clinical Diagnostic Laboratory Immunology 9(5):1039-1043).

Los resultados (**Figuras 15A y 15B**) muestran que la activación del sistema inmunológico (medida por MFI de CD69) aumentó solamente cuando se incubaron células T CD4+ o CD8+ con el diacuerpo DART™ ERBITUX™-h-mAb2 de la presente divulgación o un diacuerpo DART™ ERBITUX™-receptor de células T (capaz de unirse a EGFR y el receptor de células T). El diacuerpo DART™ ERBITUX™-FN18 CD3 (capaz de unirse a EGFR y a CD3 de mono macaco) no indujo un aumento en CD69 MFI.

Ejemplo 16

Destrucción redirigida por diacuerpos DART™ de Mono macaco humanizados / humanos con reacción cruzada

Para demostrar en forma adicional la habilidad del diacuerpo DART™ de la presente divulgación para mediar la destrucción redirigida, se determinaron las células de destino A498 de cáncer de riñón o las células de carcinoma epidermoide A431 (Lee, C.M. *et al.* (2010) “The Distribution Of The Therapeutic Monoclonal Antibodies Cetuximab And Trastuzumab Within Solid Tumors,” BMC Cancer 10:255; páginas 1-11; Bryant, J.A. *et al.* (2004) “EGF Activates Intracellular And Intercellular Calcium Signaling By Distinct Pathways In Tumor Cells,” Cancer Biol. Ther. 3(12):1243-1249) y el grado de destrucción redirigida mediada por varios diacuerpos DART™ en la presencia de células efectoras PMBC (E:T = 30:1).

Se incubaron células en la presencia de cualquiera de diacuerpo DART™ ERBITUX™-h-mAb2, diacuerpo DART™ ERBITUX™-m-mAb2 o diacuerpo DART™ 4420-h-mAb2 (control negativo) o un anticuerpo de control secundario. La unión a células blanco se determinó por medición de MFI. La destrucción redirigida se evaluó midiendo el % de citotoxicidad.

Los resultados de esta investigación se muestran en las **Figuras 16A-16D**. Se encontró que los diacuerpos que tienen especificidad por CD3 y EGFR son capaces de unirse a células A498 o A431 (**Figura 16A y 16C**, respectivamente), y mediar la destrucción redirigida de estas células (**Figura 16B y 16D**, respectivamente).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MacroGenics, Inc.
 Huang, Ling
 Johnson, Leslie

<120> Moléculas que se unen a CD3 capaces de unirse a CD3 humano y no humano

<130> 1301.0075I

<150> US 61/488,716
 <151> 2011-05-21

<150> US 61/530,353
 <151> 2011-09-01

<160> 88

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1
 Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
 100 105

<210> 2
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 2
 cagggtggtgc tgaccagtc cccgccatc atgtccgct tcccggcga gaaagtgaca 60
 atgacctgct ccgctcctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagtccgcg 120

ES 2 732 213 T3

```

acctcccca agcgggtgat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga      180
ttctctgget cgggctccgg caccagctac tccctgacca tctctccat gaaaccgag      240
gacgccgcca cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc ccctacctt cggcggaggc      300
accaagctgc agatcaccag a                                          321

```

<210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1                               5                               10          15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser
                20                               25          30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35                               40          45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
                    50                               55          60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                               70          75          80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                               90          95
Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly
                100                              105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115                              120

```

<210> 4
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

```

<400> 4
caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgctc cgtgaagatg      60
tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc cgggccacca tgcaactgggt gaaacagcgg      120
cctggacagg gcttggaatg gatcggctac atcaaccctt ccagcgcta caccaactac      180
aaccagaagt tcaaggacaa ggccaccctg accgcccaca agtcctccag caccgcctac      240
atgcagctgt cctccctgac ctccaggagac tccgccgtgt actactgcgc ctccccccag      300
gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc      360
tcc                                          363

```

<210> 5
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 732 213 T3

<400> 5

```

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1                               10                15

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
                35                                40                45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50                    55                                60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                    70                                75                80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                                90                95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
                100                            105                110

```

<210> 6

<211> 330

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 6

```

caggccgtgg tgacacagga gtcagctctg accacatccc caggcgaaac agtgactctg      60
acctgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact acgctaattg ggtgcaggag      120
aagcccgacc acctgttcac tgggctgac ggcggaacca acaaaagggc acccggtgtg      180
cctgcccggg tttctggcag tctgatcgga gacaaggccg ctctgacaat tactggcgcc      240
cagacagagg atgaagctat ttacttctgt gcactgtggg atagcaatct gtgggtgttt      300
gggggtggca ccaaactgac agtgctggga      330

```

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
                20                        25                30

```

ES 2 732 213 T3

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120 125

<210> 8
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 8
 gaggtgaagc tgctggaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc actgaaactg 60
 tctcgcgccc cctccggctt cacctttaac acatagceta tgaattgggt gcgacaggca 120
 cctggcaagg gcttgagtg ggtggcaagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actctgtgaa ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt 240
 ctgtatctgc agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg 300
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360
 gtgactgtgt cttcc 375

<210> 9
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80

ES 2 732 213 T3

<400> 11
gacatccaga tgaccagtc ccctccagc ctgtccgct ctgtggcgca cagagtgaca 60
atcacctgtt ccgccagetc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagcccggc 120
aaggccccca agcggctgat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180
ttctccggct ctggctccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccag 240
gacttcgcca cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc ccctacctt cggcggaggc 300
accaaggtgg aaatcaag 318

<210> 12
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada liviana de mAb1 humanizado Variante 2 (mAb1 LC-2)

<400> 12
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 1

<400> 13
gacgtggtga tgaccagtc tctgccatc atgagtgett tcccaggcga gaaagtgacc 60
attacatgct ctgcttcag ctctgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagccaggg 120
aaagcaccca agaggtgat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gccagccgg 180
ttctctggta gtggctcagg aaccgagttt actctgacca tttccagcct gcagcctgaa 240
gatttcgcaa catactattg tcagcagtgg tccagaaatc ccctacatt tggcggaggg 300
actaaagtgg aaatcaag 318

ES 2 732 213 T3

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada pesada de mAb1 humanizado

<400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado

<400> 15
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaaggtg 60
 tcttgcaagg cctccggcta cacottcacc cgggtccacca tgcaactgggt gcgacaggcc 120
 ccaggccagg gactggaatg gatcggtctac atcaaccctt ccagcgcccta caccaactac 180
 aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc accgcccaca agtccaccag caccgcctac 240
 atggaactgt ctagcctgog gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc ctccccccag 300
 gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360
 tcc 363

<210> 16
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 1 (h-mAb2 VL-1)

ES 2 732 213 T3

<400> 16

```

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1                               10                      15

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
                35                               40                      45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50                               55                      60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                               70                      75                      80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                               90                      95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
                100                               105                      110

```

<210> 17

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 1 (h-mAb2 VL-1)

<400> 17

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gaccctgac gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330

```

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 2 (h-mAb2 VL-2)

ES 2 732 213 T3

<400> 18

```

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

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

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
          50           55           60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
          65           70           75           80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
          85           90           95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110
    
```

<210> 19

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 2 (h-mAb2 VL-2)

<400> 19

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330
    
```

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 3 (h-mAb2 VL-3)

ES 2 732 213 T3

<400> 20

```

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
          35           40           45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
          50           55           60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
          65           70           75           80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
          85           90           95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110
  
```

<210> 21

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 3 (h-mAb2 VL-3)

<400> 21

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg           60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccaggag           120
aagccaggac aggcaccaag gaccctgac gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc           180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca           240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc           300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga           330
  
```

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 4 (h-mAb2 VL-4)

ES 2 732 213 T3

<400> 22

```

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
          35           40           45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
          50           55           60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
          65           70           75           80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
          85           90           95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110
  
```

<210> 23

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 4 (h-mAb2 VL-4)

<400> 23

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330
  
```

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 5 (h-mAb2 VL-5)

ES 2 732 213 T3

<400> 24

```

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
          35           40           45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
          50           55           60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
          65           70           75           80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
          85           90           95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110
    
```

<210> 25

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 5 (h-mAb2 VL-2)

<400> 25

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag      120
aagccaggac aggcaccaag gaccctgac gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330
    
```

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 6 (h-mAb2 VL-6)

ES 2 732 213 T3

<400> 26

```

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
          35           40           45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
          50           55           60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
          65           70           75           80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
          85           90           95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110
    
```

<210> 27

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 6 (h-mAb2 VL-6)

<400> 27

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330
    
```

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 7 (h-mAb2 VL-7)

<400> 28

```

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1           5           10           15
    
```

ES 2 732 213 T3

```

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

```

<210> 29
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 7 (h-mAb2 VL-7)

```

<400> 29
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccaggag      120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgata ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330

```

<210> 30
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 8 (h-mAb2 VL-8)

```

<400> 30
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1          5          10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
      20                      25                      30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

```

ES 2 732 213 T3

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

<210> 31
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 8 (h-mAb2 VL-8)

<400> 31 caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcgggaac tgtgaccctg	60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag	120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc	180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca	240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc	300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga	330

<210> 32
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 9 (h-mAb2 VL-9)

<400> 32 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly 1 5 10 15		
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser 20 25 30		
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly 35 40 45		
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe 50 55 60		

ES 2 732 213 T3

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 33
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 9 (h-mAb2 VL-9)

<400> 33
 caggetgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120
 aagccaggac aggcattcag gggcctgatc gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 34
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena variable de mAb2 humanizado Variante 10 (h-mAb2 VL-10)

<400> 34
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 35
 <211> 330

ES 2 732 213 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable liviana de mAb2 humanizado Variante 10 (h-mAb2 VL-10)

<400> 35

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg      60
acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact acgctaattg gttccagcag      120
aagcccgacc acctgttcac tgggetgac ggcggaacca aaaaagggc tcctggacc      180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga      330
  
```

<210> 36

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 1 (h-mAb2 VH-1)

<400> 36

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20          25          30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50          55          60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65          70          75          80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85          90          95
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100         105         110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120          125
  
```

<210> 37

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 1 (h-mAb2 VH-1)

ES 2 732 213 T3

<400> 37
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagttaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgttacta ttgtgcaaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 38
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 2 (h-mAb2 VH-2)

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 39
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 2 (h-mAb2 VH-2)

ES 2 732 213 T3

<400> 39
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagttaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgttacta ttgtgcaaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 40
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 3 (h-mAb2 VH-3)

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 41
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 3 (h-mAb2 VH-3)

ES 2 732 213 T3

<400> 41
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagttaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtacta ttgtgcaaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 4 (h-mAb2 VH-4)

<400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 43
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 4 (h-mAb2 VH-4)

ES 2 732 213 T3

<400> 43
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagttaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgttacta ttgtgtgaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 44
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 5 (h-mAb2 VH-5)

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 45
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 5 (h-mAb2 VH-5)

ES 2 732 213 T3

<400> 45
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtacta ttgtgcaaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 46
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 6 (h-mAb2 VH-6)

<400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 47
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 6 (h-mAb2 VH-6)

ES 2 732 213 T3

<400> 47
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagttaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtacta ttgtgtgaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 48
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 7 (h-mAb2 VH-7)

<400> 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 49
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 7 (h-mAb2 VH-7)

ES 2 732 213 T3

<400> 49
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggett caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcagget 120
 cctggaaaggg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagttaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgttacta ttgtgtgaga 300
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 50
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de mAb2 humanizado Variante 8 (h-mAb2 VH-8)

<400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 51
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante 8 (h-mAb2 VH-8)

ES 2 732 213 T3

<400> 51
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgeta tgaattgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcaagg atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca 240
 ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga 300
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360
 gtgactgtgt cttcc 375

<210> 52
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante QV (h-mAb2 VL-QV)

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120 125

<210> 53
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de mAb2 humanizado Variante QV (h-mAb2 VL-QV)

ES 2 732 213 T3

<400> 53
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc actgaaactg 60
 tcttgcgccg cctccggett cacctttaac acatacgeta tgaattgggt gcgacaggca 120
 cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actctgtgaa ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt 240
 ctgtatctgc agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg 300
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360
 gtgactgtgt cttcc 375

<210> 54
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de hVH-6L

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 55
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de hVH-8L

ES 2 732 213 T3

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 56

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de hXR32VH-8 di-1

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de hXR32VH-8 di-2

ES 2 732 213 T3

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 58

<211> 272

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-Her-2VH E coil

<400> 58

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

ES 2 732 213 T3

```

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
      35                               40                               45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
      50                               55                               60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
      65                               70                               75                               80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
      85                               90                               95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
      100                              105                              110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu
      115                              120                              125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
      130                              135                              140

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu
      145                              150                              155                              160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
      165                              170                              175

Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr
      180                              185                              190

Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp
      195                              200                              205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala
      210                              215                              220

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
      225                              230                              235                              240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
      245                              250                              255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
      260                              265                              270

```

<210> 59

<211> 276

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del Her2VL-hXR32VH-K coil

ES 2 732 213 T3

<400> 59

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50           55           60

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
          115          120          125

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
130          135          140

Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
145          150          155          160

Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala
          165          170          175

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
          180          185          190

Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu
          195          200          205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser
210          215          220

Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225          230          235          240

Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
          245          250          255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
          260          265          270

Ala Leu Glu Lys
          275

```

<210> 60

<211> 278

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del CD19VL-hXR32VH-E coil

ES 2 732 213 T3

<400> 60

```

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
          20           25           30

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
          115          120          125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130          135          140

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145          150          155          160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
          165          170          175

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
          180          185          190

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
          195          200          205

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
210          215          220

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225          230          235          240

Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu
          245          250          255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
          260          265          270

Val Ala Ala Leu Glu Lys
          275

```

<210> 61

<211> 276

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-CD19VH-K coil

ES 2 732 213 T3

<400> 61

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140
 Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr
 165 170 175
 Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu
 180 185 190
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
 195 200 205
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg
 210 215 220
 Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
 245 250 255
 Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
 260 265 270
 Ala Leu Lys Glu
 275

<210> 62

<211> 271

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-EGFRVH-E coil

ES 2 732 213 T3

<400> 62

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly
 115 120 125

Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
 130 135 140

Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp
 165 170 175

Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser
 180 185 190

Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr
 195 200 205

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe
 210 215 220

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270

<210> 63

<211> 274

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del EGFRVL-hXR32VH-K coil

ES 2 732 213 T3

<400> 63

```

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20           25           30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35           40           45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85           90           95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100          105          110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115          120          125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130          135          140

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145          150          155          160

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165          170          175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180          185          190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195          200          205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210          215          220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225          230          235          240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245          250          255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260          265          270

Lys Glu

```

<210> 64

<211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hBRCA69DVL-hXR32VH-E coil

ES 2 732 213 T3

<400> 64

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20          25          30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
          85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
          100          105          110

Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
          115          120          125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
130          135          140

Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
145          150          155          160

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
          165          170          175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
          180          185          190

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
          195          200          205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
210          215          220

Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225          230          235          240

Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
          245          250          255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
260          265          270

Leu Glu Lys
          275

```

<210> 65

<211> 272

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-hBRCA69DVH-K coil

ES 2 732 213 T3

<400> 65

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
 165 170 175

Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
 180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
 210 215 220

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

<210> 66

<211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hBRCA84DVL-hXR32VH-E coil

ES 2 732 213 T3

<400> 66

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 115 120 125
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 130 135 140
 Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 210 215 220
 Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 245 250 255
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
 260 265 270
 Leu Glu Lys
 275

<210> 67

<211> 274

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-hBRCA84DVH-K coil

ES 2 732 213 T3

<400> 67

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile
 165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly
 210 215 220

Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
 245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Lys Glu

<210> 68

<211> 279

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del 4420VL-hXR32VH-E coil

ES 2 732 213 T3

<400> 68

```

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20          25          30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35          40          45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50          55          60

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115         120         125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130         135         140

Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145         150         155         160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
165         170         175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile
180         185         190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195         200         205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
210         215         220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225         230         235         240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu
245         250         255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260         265         270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
275

```

<210> 69

<211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-4420VH-K coil

ES 2 732 213 T3

<400> 69

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly
 115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr
 165 170 175

Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 180 185 190

Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val
 195 200 205

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

<210> 70

<211> 274

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del RECA47VL-hXR32VH-K coil

<400> 70

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
 20 25 30

ES 2 732 213 T3

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 115 120 125
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 130 135 140
 Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 165 170 175
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 195 200 205
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220
 Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
 245 250 255
 Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 260 265 270
 Lys Glu

<210> 71

<211> 271

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del hXR32VL-RECA47VH-E coil

ES 2 732 213 T3

<400> 71

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu
 115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140

Tyr Thr Phe Ser Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr
 165 170 175

Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
 180 185 190

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
 195 200 205

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe
 210 215 220

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270

<210> 72

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de hVH-6M

ES 2 732 213 T3

<400> 72

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Thr	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ala	
	50					55					60					
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	
65					70					75				80		
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
				85					90					95		
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	
			100					105						110		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120					125				

<210> 73

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de hVH-6M

<400> 73

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc	60
tctctgtcag cctctggatt caccttcaac acatagccta tgaattgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggctggagtg ggttgaagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc	180
gagtatgccc actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca	240
ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga	300
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg	360
gtgactgtgt cttcc	375

<210> 74

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de hVH-8M

ES 2 732 213 T3

<400> 74

```

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Ala
50          55          60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100         105         110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

<210> 75

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos que codifican la cadena variable pesada de hVH-8M

<400> 75

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc      60
tctctgtcag cctctggatt caccttcaac acatagccta tgaattgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggttgaagg atcaggaaca agtacaaca ttatgcaacc      180
gagtatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca      240
ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga      300
cacgtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg      360
gtgactgtgt cttcc                                          375

```

<210> 76

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "a" (I51T Y52cA) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

ES 2 732 213 T3

<400> 76

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30

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

Ala Arg Thr Ala Ser Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 77

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "b" (I51T N54S) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 77

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30

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

Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 78

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 732 213 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "c" (I51T A56T) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 78

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 79

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "d" (I51T Y52cA N54S) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 79

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 80

<211> 125

ES 2 732 213 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "e" (I51T N54S A56T) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 80

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 81

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "f" (I51T Y52cA N54S A56T) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 81

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

ES 2 732 213 T3

<210> 82
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "g" (I51T D61A) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 82
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120 125

<210> 83
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "h" (I51T D65G) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

ES 2 732 213 T3

<400> 83

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30

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

Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 84

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "i" (I51T Y52cA N54S D61A) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 84

```

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30

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

Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50           55           60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 85

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 732 213 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "j" (I51T Y52cA N54S D65G) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 85

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 86

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 86

```

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20           25           30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85           90           95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100          105          110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115          120          125

```

<210> 87

<211> 125

ES 2 732 213 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "2k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-A49G V93A)) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 87

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20          25          30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Gly Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50          55          60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65          70          75          80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85          90          95
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100         105         110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

<210> 88

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la variante "5k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) de la cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal murino de mAb2 humanizado

<400> 88

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20          25          30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50          55          60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65          70          75          80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85          90          95
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100         105         110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

REIVINDICACIONES

1. Una molécula que se une a CD3 que comprende un fragmento que se une a antígeno de un anticuerpo, en donde dicho fragmento que se une a antígeno comprende un dominio VL específico de CD3 de anticuerpo y un dominio VH específico de CD3 de anticuerpo, en donde dicho dominio VL específico de CD3 y dicho dominio VH específico de CD3 forman un dominio de unión a antígeno capaz de unirse en forma inespecífica a ambos de un epítipo de CD3 humano y un epítipo de CD3 de un mamífero no humano, en donde:
- 5
- (I) dicho dominio VL específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab2 VL-4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, h-mab2 VL-6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, h-mab2 VL-7 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, h-mab2 VL-8 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, h-mab2 VL-9 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, y h-mab2 VL-10 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, y
- 10
- (II) dicho dominio VH específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab2 VH-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, h-mab2 VH-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, h-mab2 VH-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, h-mab2 VH-4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, h-mab2 VH-5 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, h-mab2 VH-6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, h-mab2 VH-7 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y h-mab2 VH-8 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.
- 15
2. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho dominio VL específico de CD3 es h-mab2 VL-6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
- 20
3. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho dominio VH específico de CD3 es h-mab2 VH-8 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o h-mab2 VH-4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42.
4. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha molécula es un anticuerpo.
- 25
5. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo:
- (A) carece de una región Fc; o
- (B) comprende una región Fc que:
- (i) carece de función efectora; o
- (ii) tiene función efectora reducida; o
- 30
- (iii) daña la capacidad de la región Fc de dicho anticuerpo de unirse a un receptor Fc;
- en donde dicha carencia de función efectora, reducción en la función efectora y dicho daño de la capacidad de unión es con relación a la de un receptor Fc tipo salvaje.
6. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha molécula es un diacuerpo que se une a CD3 que comprende una primera cadena de polipéptido y una segunda cadena de polipéptido, dichas cadenas están unidas en forma covalente entre sí, en donde:
- 35
- (I) dicha primera cadena de polipéptido comprende un amino terminal y un carboxi terminal y del N-terminal al C-terminal:
- (i) un dominio (A) que comprende dicho dominio VL específico de CD3;
- (ii) un dominio (B) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2); y
- 40
- (iii) un dominio (C);
- en donde dichos dominios (A) y (B) no se asocian entre sí para formar un sitio que se une a epítipo;
- y
- 45
- (II) dicha segunda cadena de polipéptido comprende un amino terminal y un carboxi terminal y del N-terminal al C-terminal:
- (i) un dominio (D) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de dicha segunda inmunoglobulina (VL2);

(ii) un dominio (E) que comprende dicho dominio VH específico de CD3;

y

(iii) un dominio (F);

en donde dichos dominios (D) y (E) no se asocian entre sí para formar un sitio que se une a epítoto; y

5 en donde:

(1) dichos dominios (A) y (E) se asocian para formar dicho dominio que se une a antígeno que es capaz de unirse en forma inmuno-específica a ambos de CD3 humano y CD3 de un mamífero no humano;

10 (2) dichos dominios (B) y (D) se asocian para formar un sitio de unión que se une en forma inmuno-específica a un segundo epítoto, dicho segundo epítoto es diferente del epítoto CD3 unido por el dominio de unión a antígeno formado a partir de dicha asociación de dichos dominios (A) y (E); y

(3) dichos dominios (C) y (F) se asocian entre sí en forma covalente.

7. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicho segundo epítoto no es un epítoto de CD3.

15 8. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicho segundo epítoto es un epítoto de CD3 que es diferente del epítoto de CD3 unido por el dominio de unión a antígeno formado a partir de dicha asociación de dichos dominios (A) y (E).

9. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que está humanizada.

10. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-9, que es capaz de unirse en forma inmuno-específica a CD3 y a fluoresceína.

20 11. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6-9 que es capaz de unirse en forma inmuno-específica a ambos de: (i) CD3 y (ii) (a) un antígeno de tumor, o (ii) (b) un antígeno de superficie de célula, receptor o ligando del receptor.

25 12. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 11, en donde dicha molécula es capaz de unirse en forma inmuno-específica a CD3 y a un antígeno de tumor expresado en una célula tumoral, en donde dicha célula de tumor es una célula tumoral de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de la cavidad oral, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer de laringe, cáncer de hueso, cáncer de piel, melanoma, cáncer de útero, cáncer de testículo, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, glioblastoma, cáncer de tiroides, linfoma, mieloma y leucemia.

30 13. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 11, en donde dicha molécula es capaz de unirse en forma inmuno-específica a CD3 y a un antígeno de superficie de célula, receptor o ligando de receptor, en donde dicho antígeno de superficie de célula, receptor o ligando de receptor es HER2/neu, B7-H3, CD20, PSMA, IGF-1R, o Ep-CAM.

35 14. La molécula que se une a CD3 de conformidad con la reivindicación 11, en donde dicha molécula es capaz de unirse en forma inmuno-específica a CD3 y a un antígeno de superficie de célula, receptor o ligando de receptor, en donde dicho antígeno de superficie de célula, receptor o ligando de receptor es una molécula involucrada en una asociación célula T — célula B, en donde dicha molécula involucrada en dicha asociación célula T — célula B se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD32B, CD38, CD40, CD79a, CD79b, CD80, CD86, LFA-I, LFA-3 y CFA-I.

40 15. El díacuerpo que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6-14, en donde dicho díacuerpo que se une a CD3 comprende un dominio Fc o porción del mismo.

16. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, y un vehículo, excipiente o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

45 17. La molécula que se une a CD3 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o de la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

50 18. La molécula que se une a CD3 o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde dicha enfermedad autoinmune o inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en: diabetes dependiente de insulina tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, miastenia grave, enfermedad celíaca, Síndrome de Sjogren, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, hepatitis

autoinmune, psoriasis, artritis psoriática, asma, rinitis alérgica, efectos del transplante de órganos, o enfermedad de huésped vs. injerto (GVHD).

19. La molécula que se une a CD3 o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 18, en donde dicha enfermedad autoinmune o inflamatoria es diabetes dependiente de insulina tipo I.

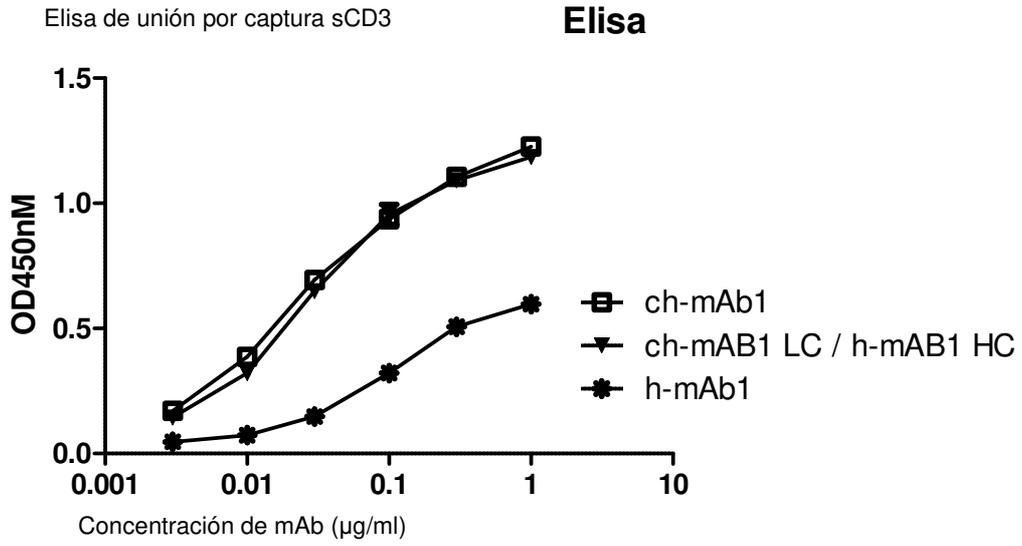


Figura 1A

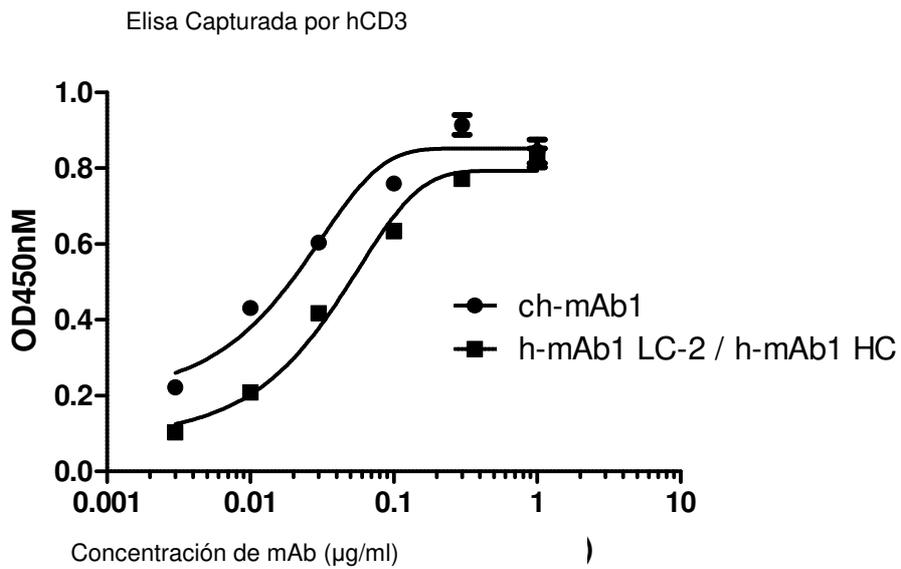


Figura 1B

Elisa Capturada con cynoCD3

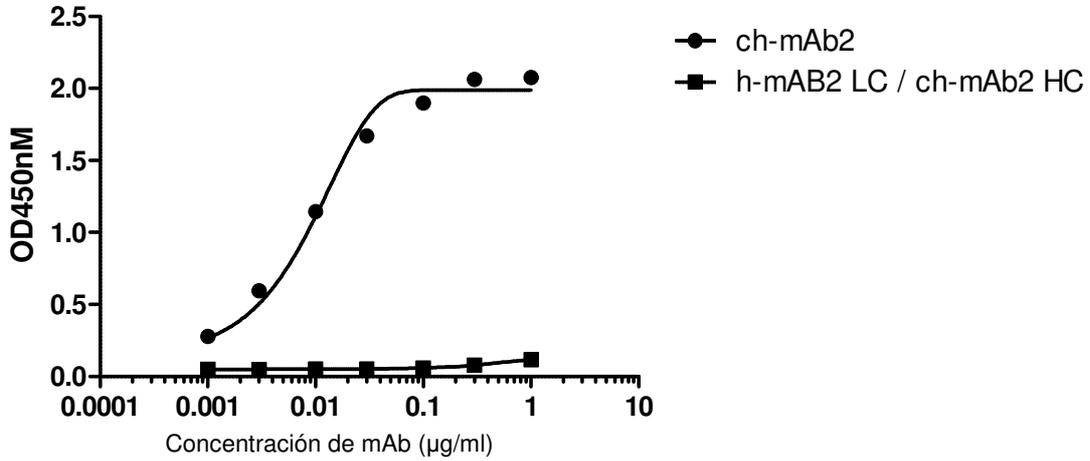


Figura 2A

Elisa Capturada con cynoCD3

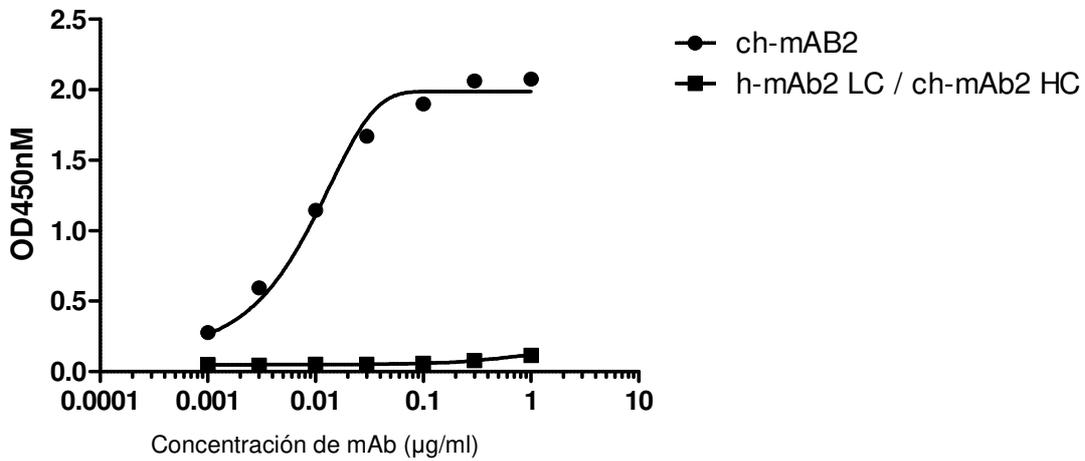
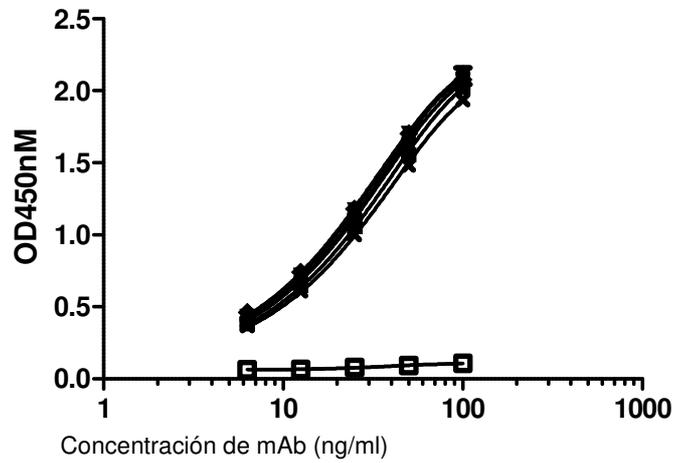


Figura 2B

Elisa capturada con hCD3



- ch-mAb2
- mAb2-41G LC / ch-mAb HC
- ▲ mAb2-42Q LC / ch-mAb HC
- ▼ mAb2-43A LC / ch-mAb HC
- ◆ mAb2-44P LC / ch-mAb HC
- ✱ mAb2-45R LC / ch-mAb HC
- ◻ mAb2-46T LC / ch-mAb HC

Figura 3

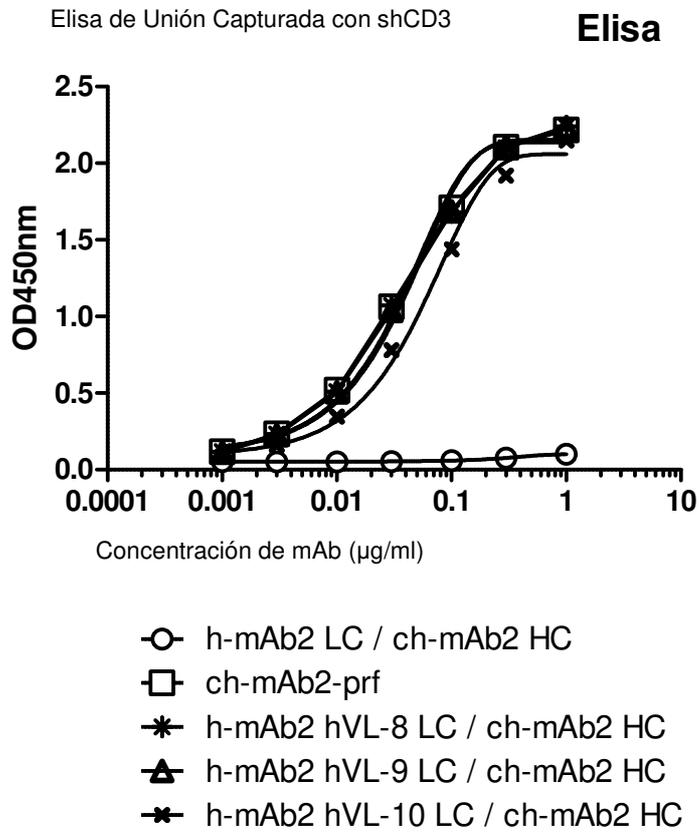


Figura 4

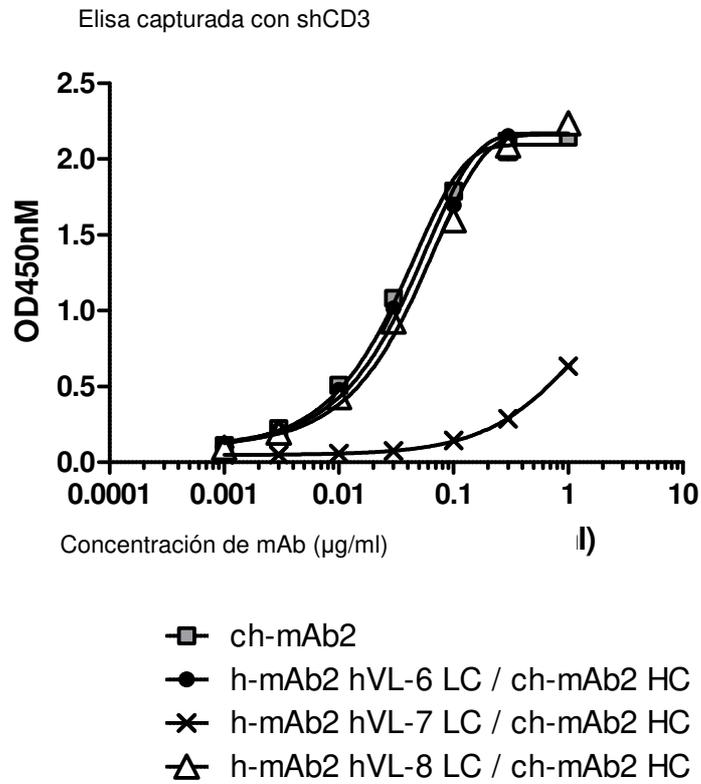


Figura 5

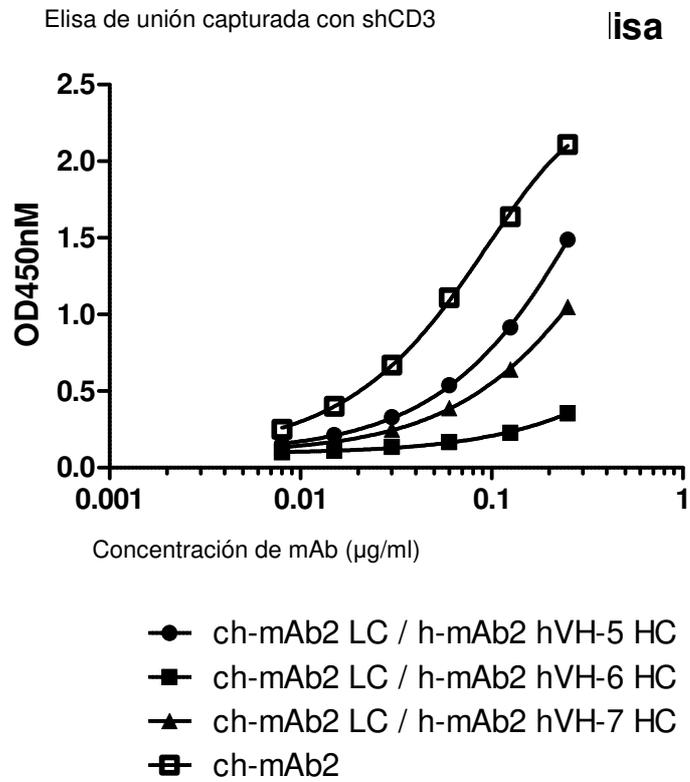


Figura 6

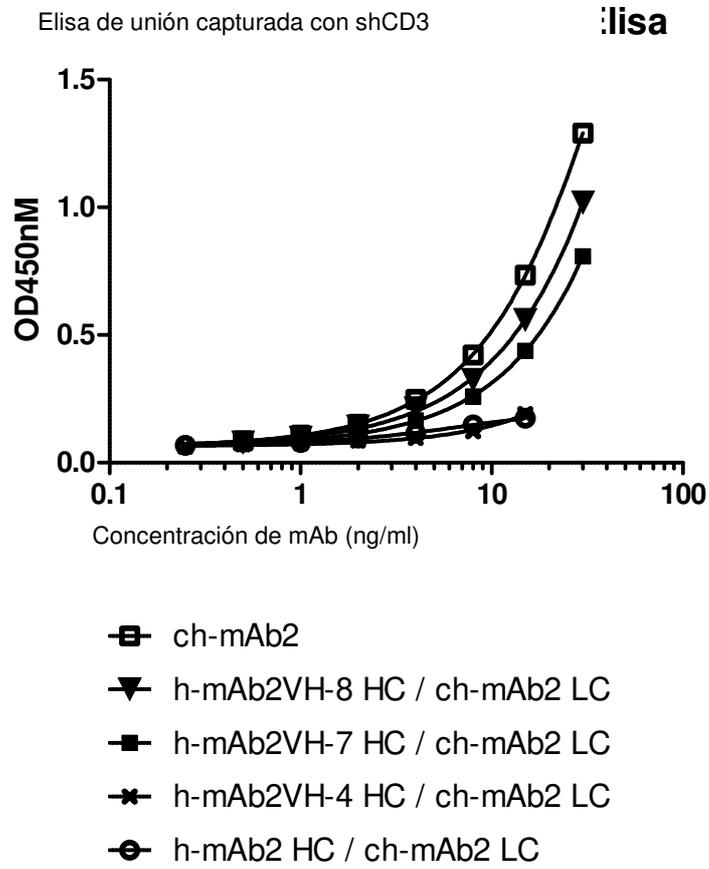


Figura 7

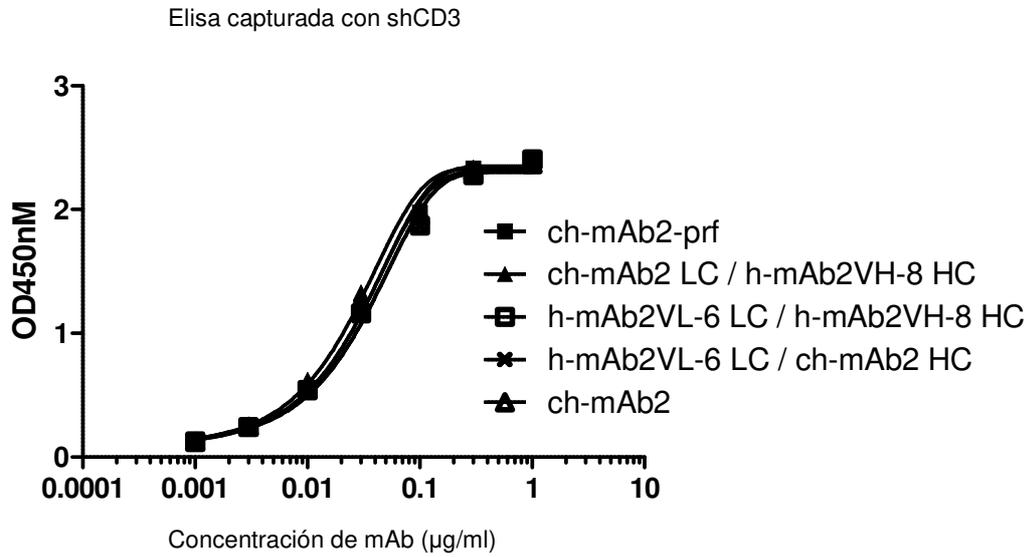


Figura 8A

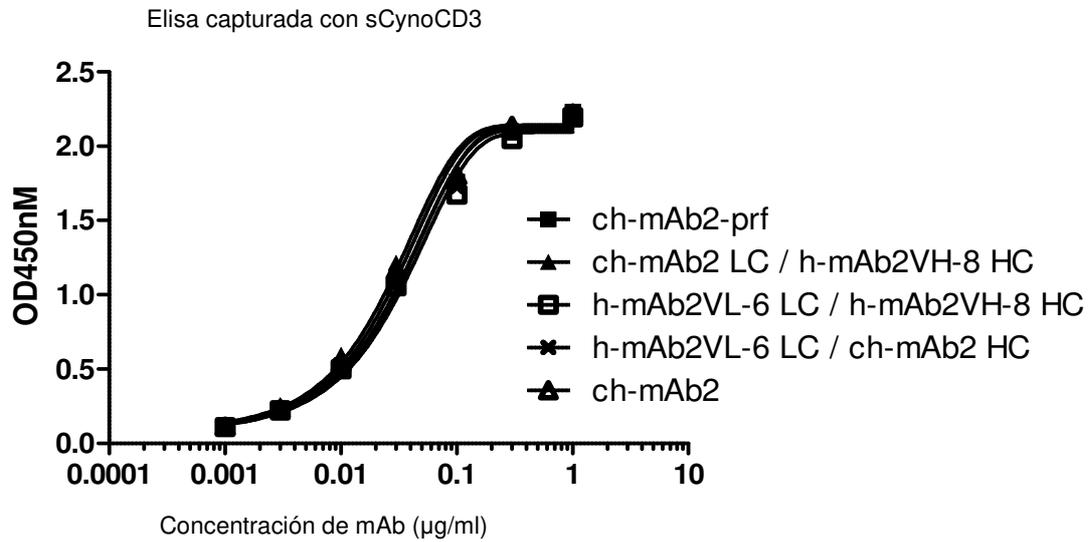
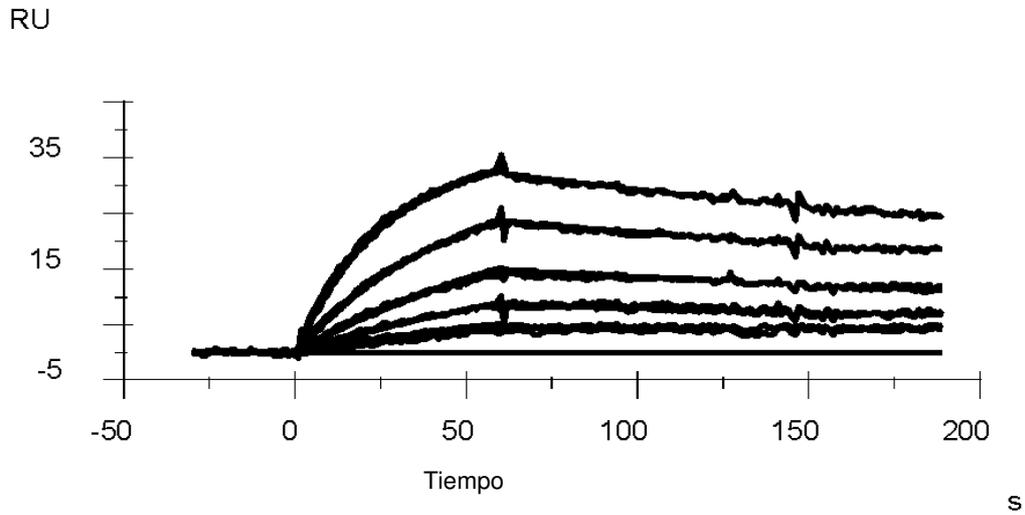
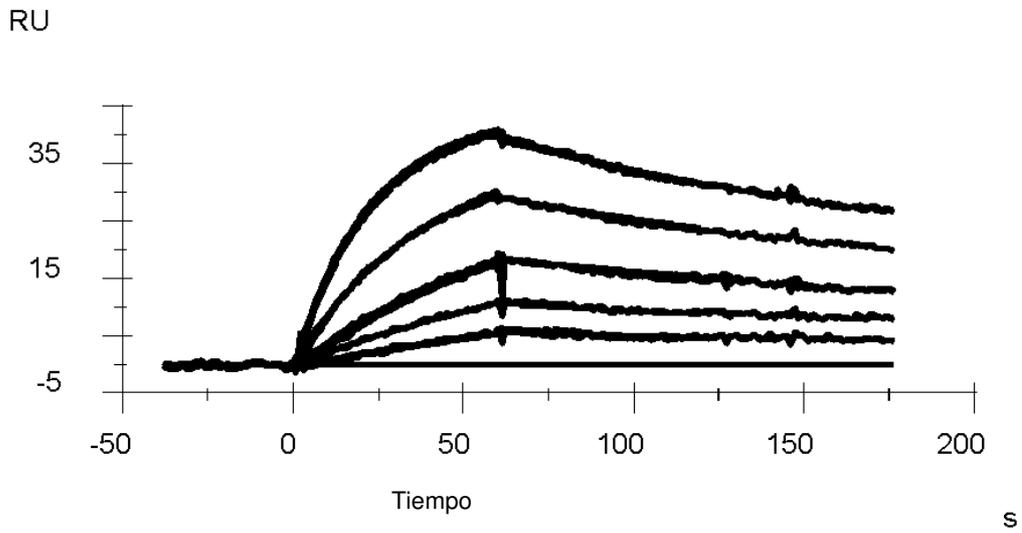


Figura 8B



ch-mAb2 / shCD3
 $K_a = 1.7 \times 10^5$ $K_d = 2.5 \times 10^{-3}$ $K_D = 14.7\text{nM}$

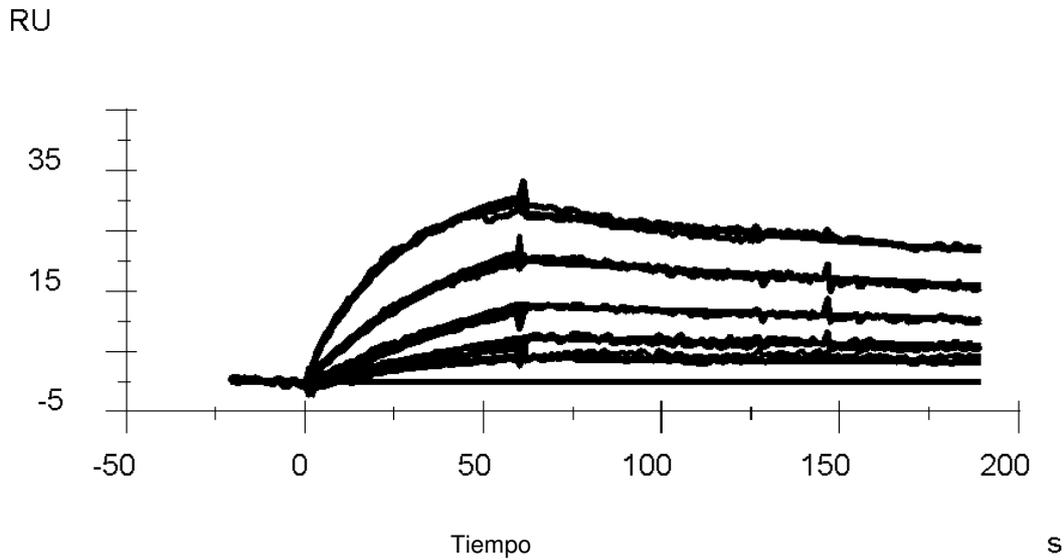
Figura 9A



shCD3
 $K_a = 1.9 \times 10^5$ $K_d = 3.8 \times 10^{-3}$ $K_D = 20.0 \text{ nM}$

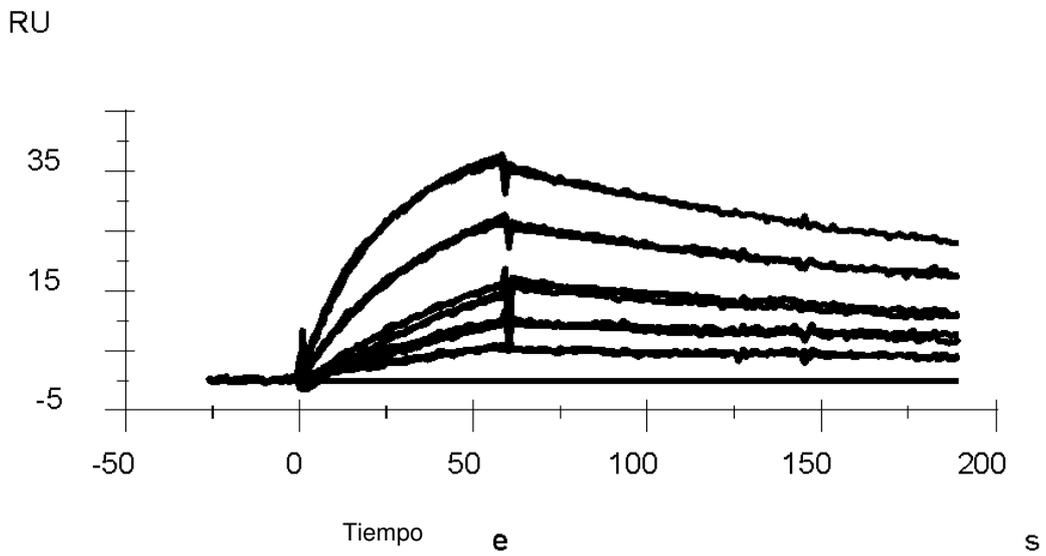
h-mAb2 8.6 /

Figura 9B



ch-mAb2 / scCD3
 $K_a = 1.6 \times 10^5$ $K_d = 2.3 \times 10^{-3}$ $K_D = 14.4$ nM

Figura 9C



h-mAb2 8.6 / shCD3
 $K_a = 1.7 \times 10^5$ $K_d = 4.1 \times 10^{-3}$ $K_D = 24.1$ nM

Figura 9D

Elisa de unión biespecífica capturada con cynoCD3

Elisa

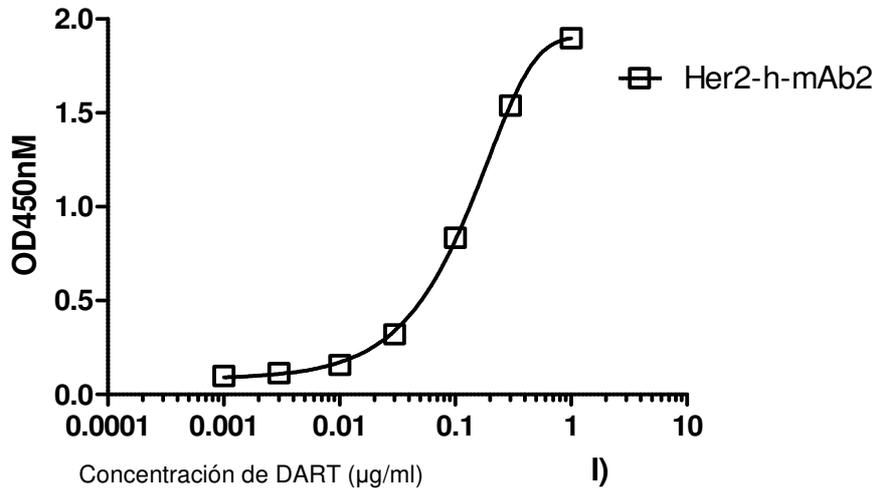


Figura 10A

Elisa de unión biespecífica capturada con cynoCD3

Elisa

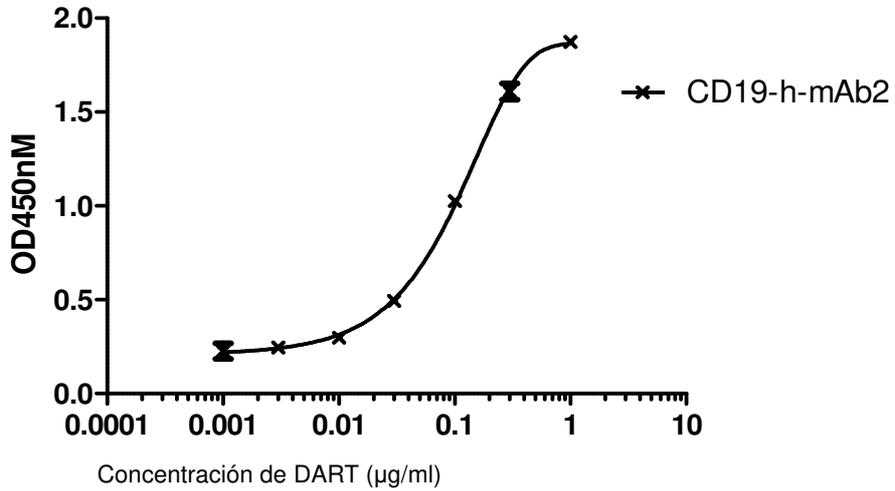


Figura 10B

Elisa de unión biespecífica capturada con cynoCD3

isa

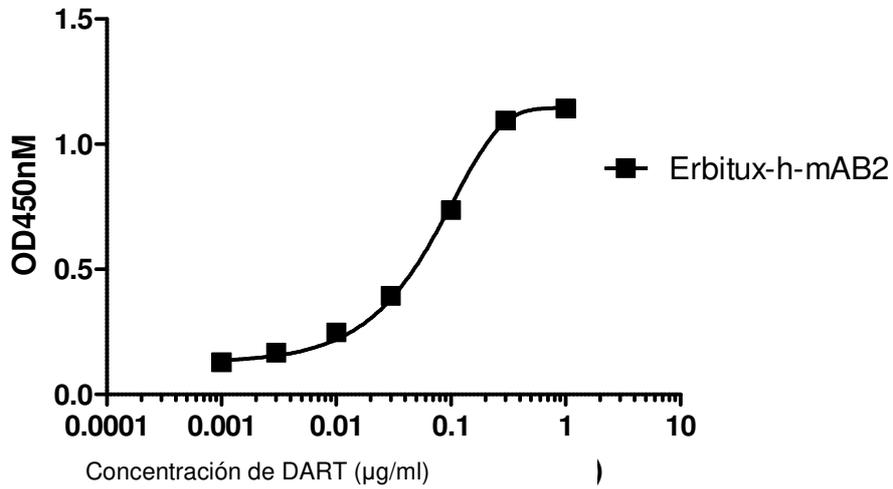


Figura 10C

Elisa de unión biespecífica con sCynCD3-shB7H3

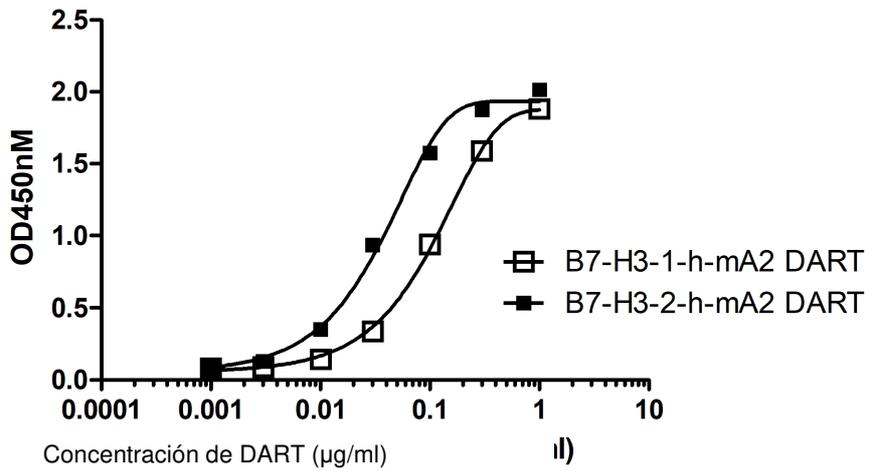
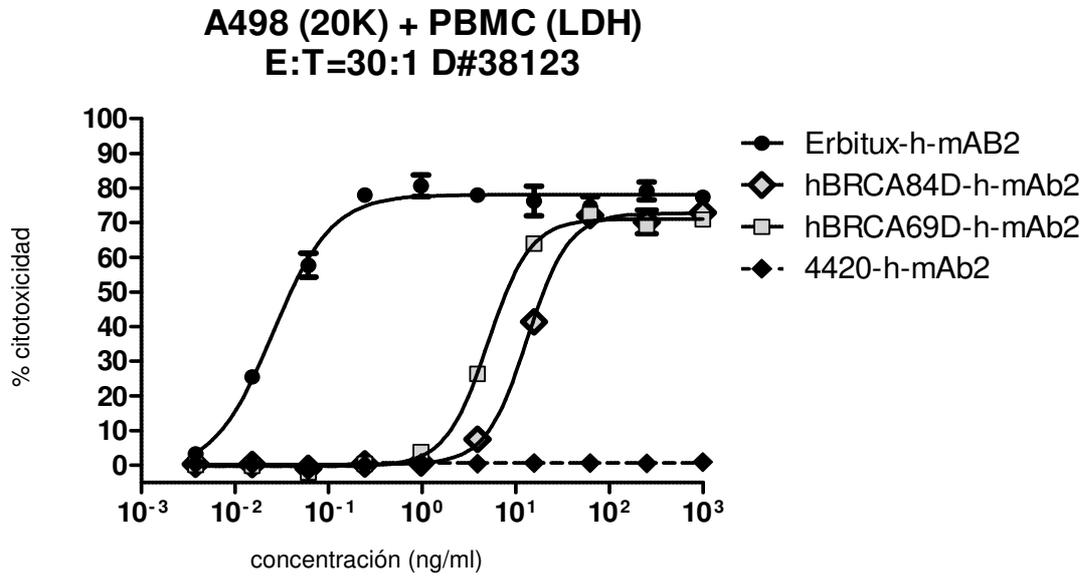
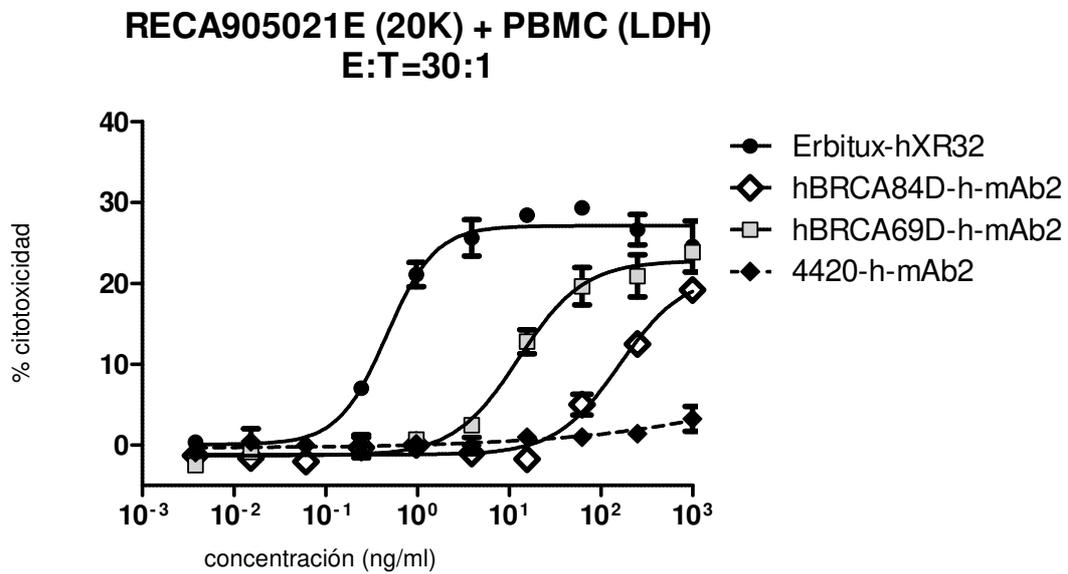


Figura 10D



11A

Figura



11B

Figura

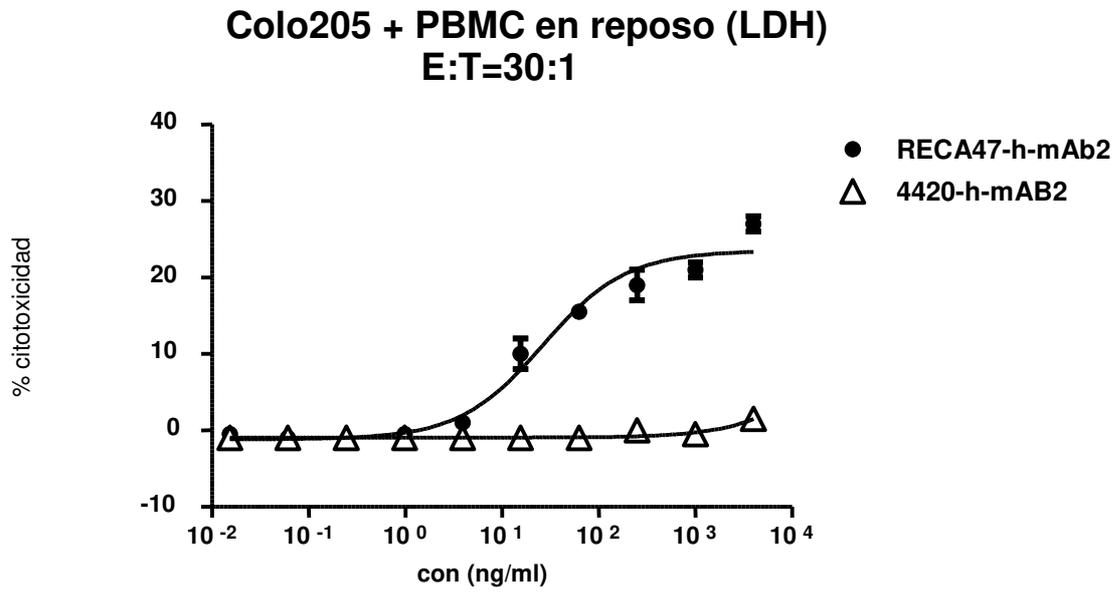


Figura 12A

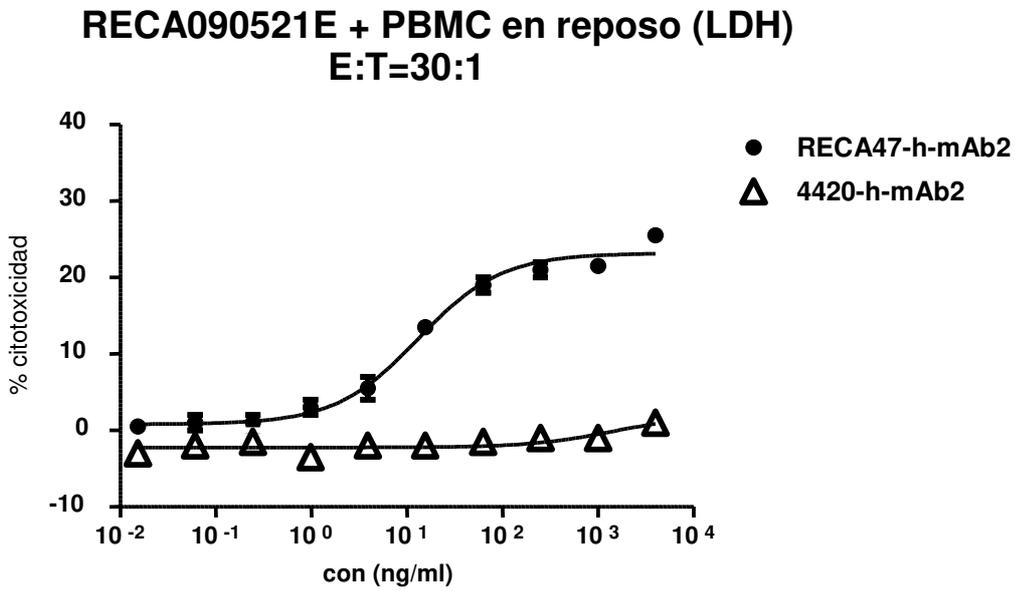


Figura 12B

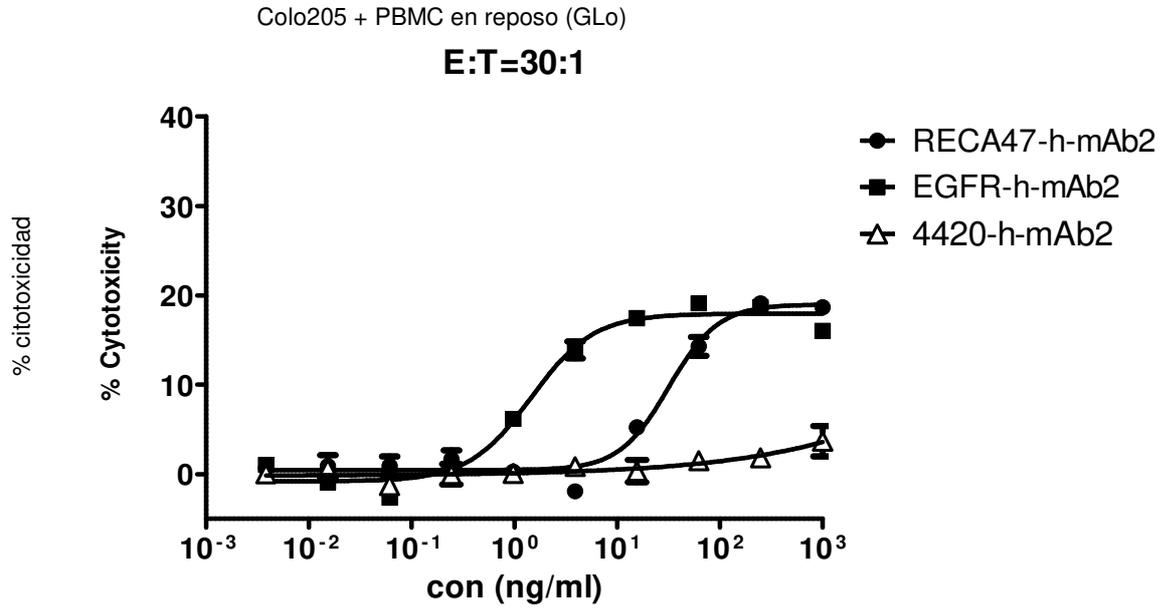


Figura 12C

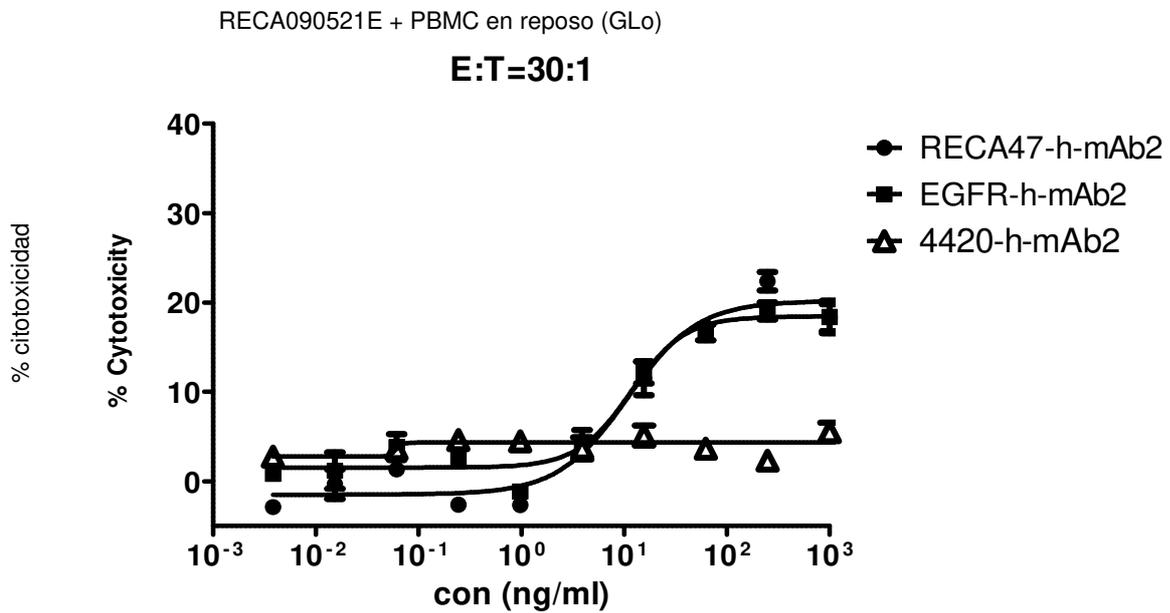


Figura 12D

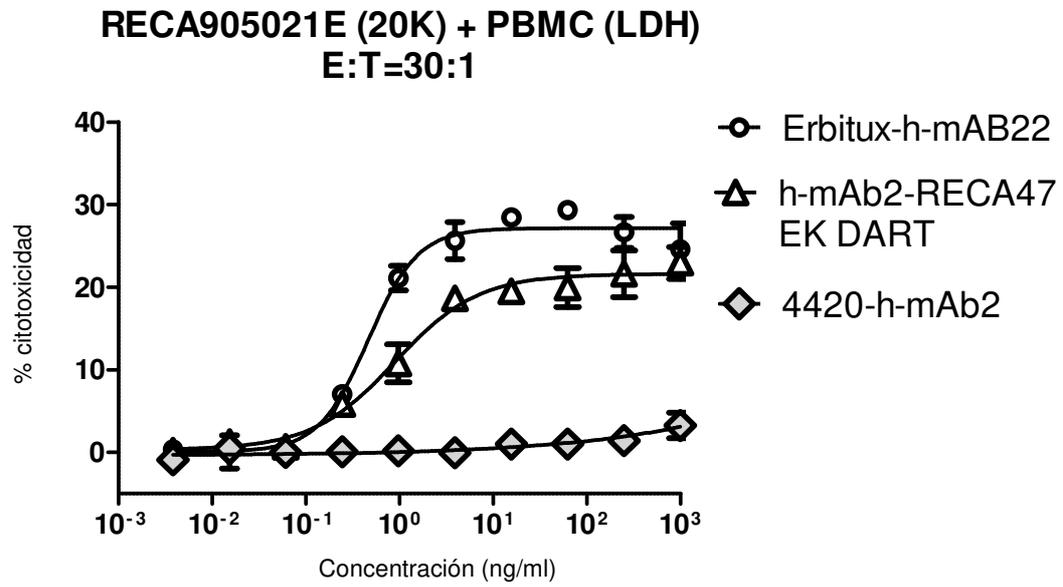


Figura 12E

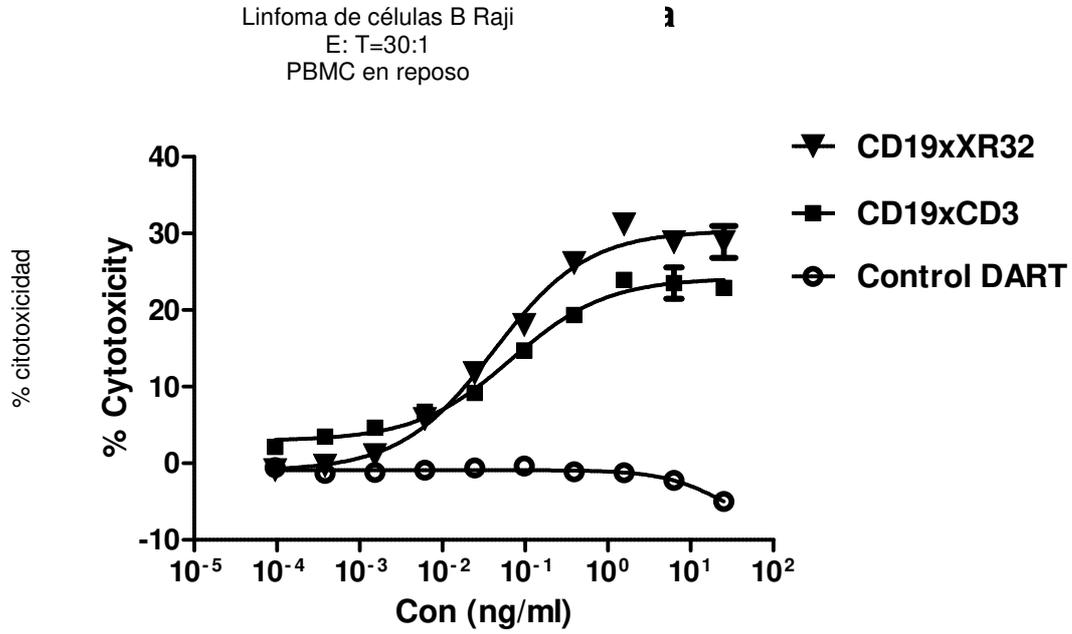


Figura 13A

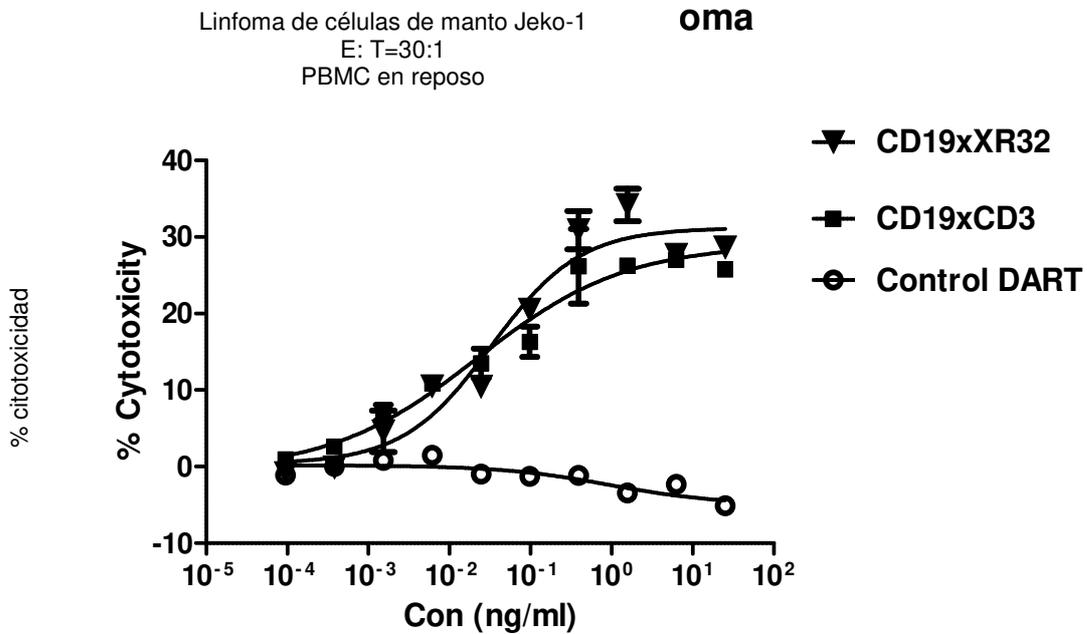


Figura 13B

Células blanco de cáncer de colon HT-29
Efectoras PBMC Humanas

Cells

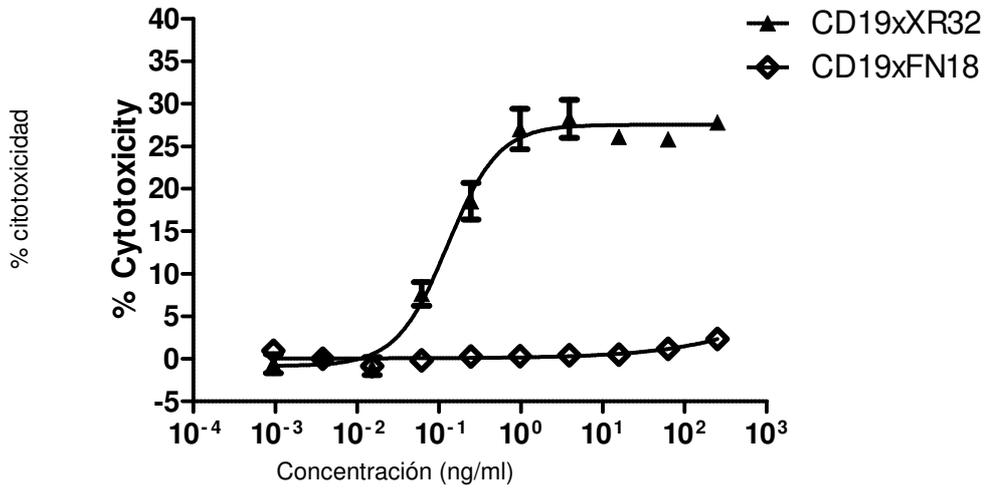


Figura 14A

Células blanco de cáncer de colon HT-29
Efectoras línea de células T de Macaco

**ells
tor**

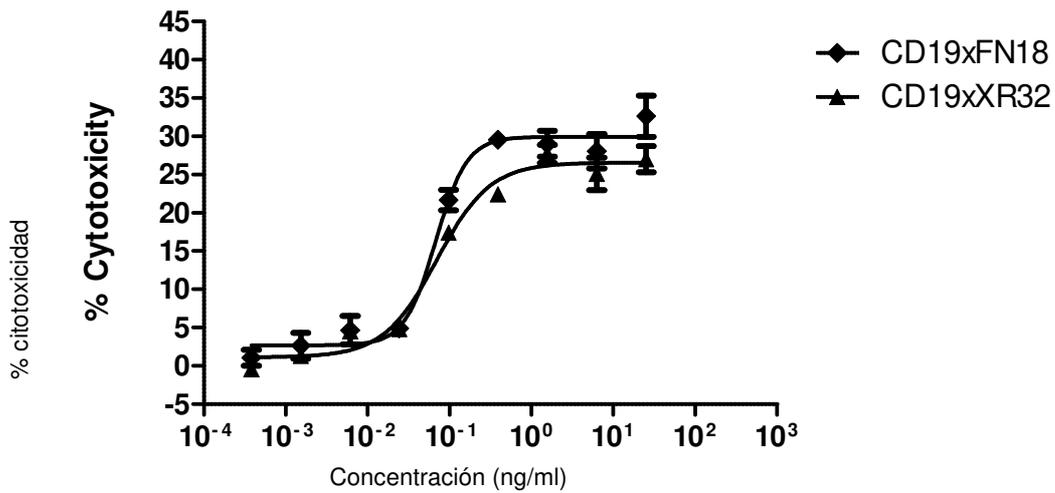


Figura 14B

Activación de células T CD4⁺

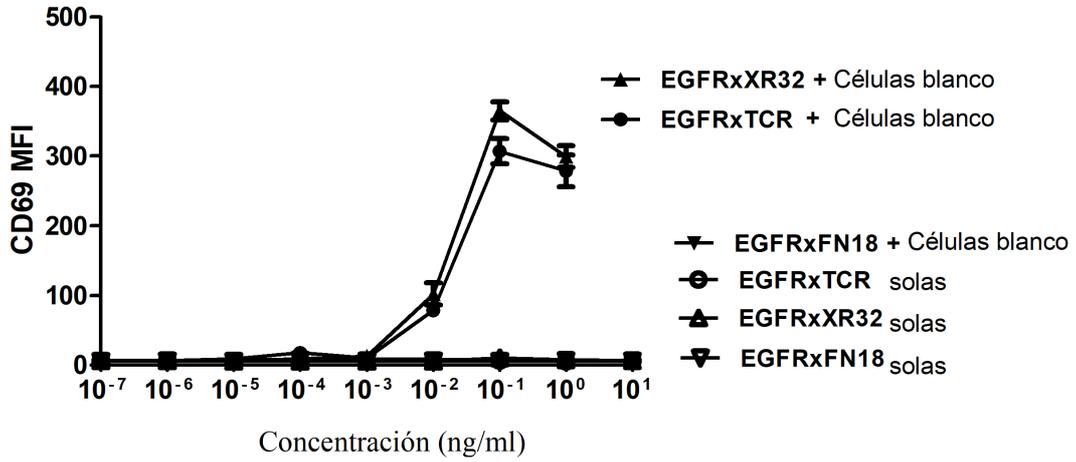


Figura 15A

Activación de células T CD8⁺

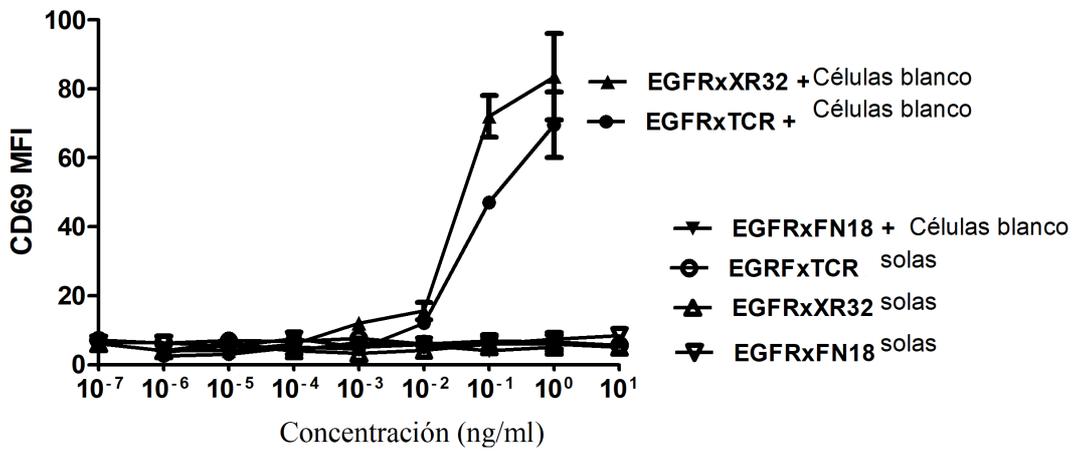


Figura 15B

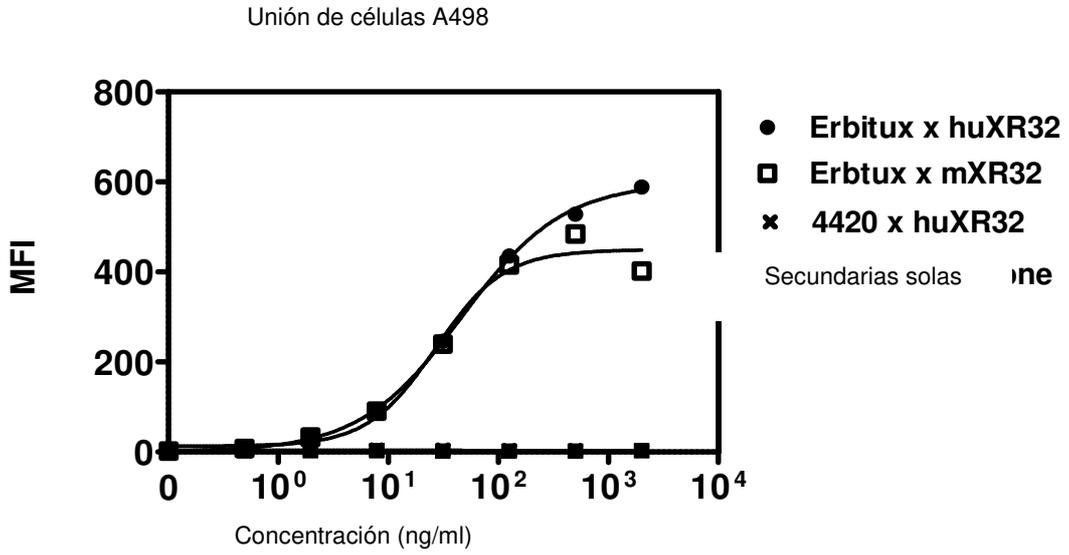


Figura 16A

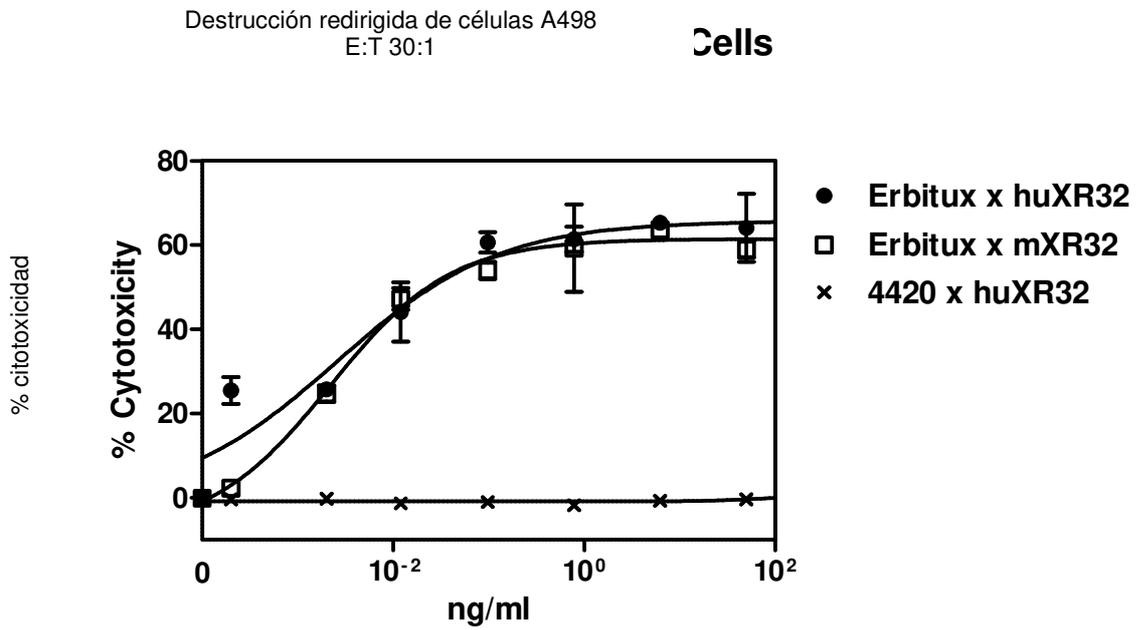


Figura 16B

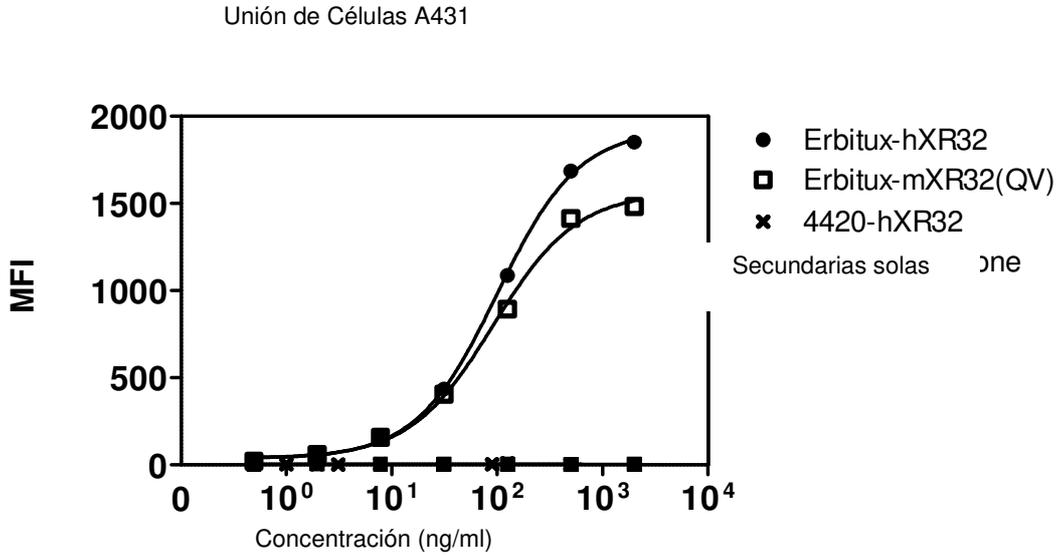


Figura 16C

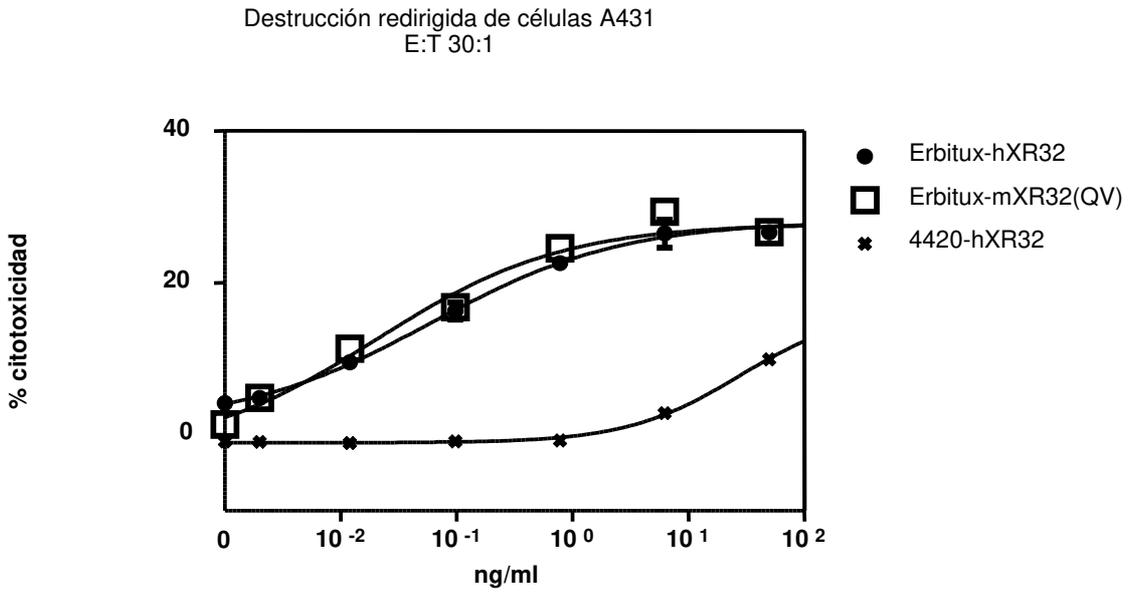


Figura 16D