

REPUBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-297917- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:23:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No. _____

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de:

Título: MOLECULAS QUE SE UNEN A CD3 CAPACES DE UNIRSE A CD3 HUMANO Y NO HUMANO

Solicitante: MACROGENICS, INC.

De Rockville, Maryland. Estados Unidos de America

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Diciembre de 2013

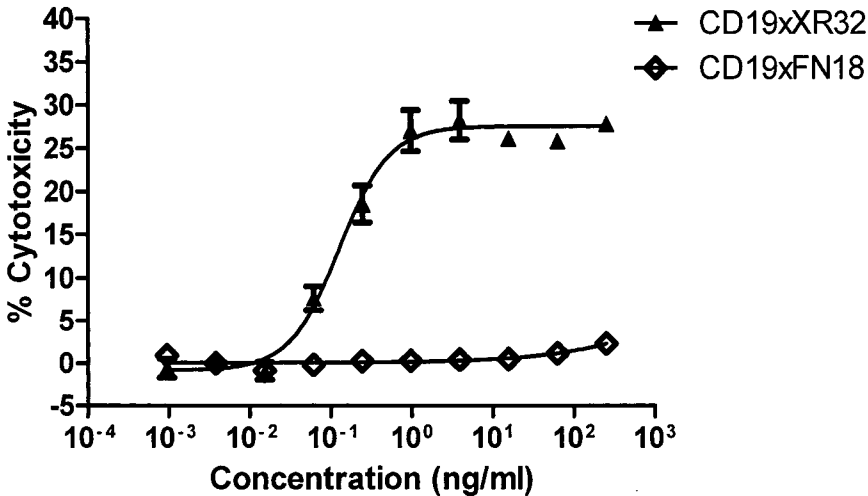
WF- 6682

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-297917- -00000-0000 Fecha: 2013-12-20 15:23:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 5	Radicación
---	--	------------

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/038219	Fecha 16/05/2012
Publicación Internacional No.		WO/2012/162067	Fecha 29/11/2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
MOLECULAS QUE SE UNEN A CD3 CAPACES DE UNIRSE A CD3 HUMANO Y NO HUMANO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C07K 16/00 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. MACROGENICS, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		9640 Medical Center Drive	No. TELÉFONO
CIUDAD		Rockville	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		Maryland	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	Estados Unidos de América
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. HUANG		Ling	Estados Unidos de América
2. JOHNSON		Leslie S.	Estados Unidos de América
3.			
4.			
5.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
JARAMILLO CAMPUZANO		MAURICIO	C.C. 80.421.942 T.P. 74.555
DIRECCIÓN		Calle 67 NO. 7 – 35, oficina 1204	No. TELÉFONO 3192900
CIUDAD		Bogotá D.C.	CORREO ELECTRÓNICO jbenoit@gpzlegal.com
PAÍS		Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL 12-170684

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD X SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1.Estados Unidos de América		US	61/488,716	2011/05/21
2.Estados Unidos de América		US	61/530,353	2011/09/01
3.				
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.				
☐ SI X NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI X NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.				
☐ SI X NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA X SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
ANEXOS				
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. X Descripción N° de folios: 92		9. X Poderes, si fuera el caso. Exp. No. 12-170684		
2. X Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 18		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. X Dibujos y/o figuras N° folios: 21		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. X Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas		
6. X Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		
		Universidades públicas o privadas		
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación.		
		Entidades sin ánimo de lucro		
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.		
		☐ Hoja de información complementaria.		
		☐ Otros, especificar		
		14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT
(21) No. de solicitud:	(51) int. Cl: C07K 16/00 (2006.01)
(22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s): MACROGENICS, INC.
(30) Prioridad: (31) No. Prioridad: 61/488,716 61/530,353 (32) Fecha: 21/05/2011 01/09/2011	(72) Inventor(es): Ling HUANG Leslie S. JOHNSON
(33) País: Estados Unidos de América	(74) Apoderado(s): MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO
(54) Título: MOLÉCULAS QUE SE UNEN A CD3 CAPACES DE UNIRSE A CD3 HUMANO Y NO HUMANO	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha: 16/05/2012 No. de solicitud PCT: PCT/US2012/038219	(87) Publicación internacional Fecha: 29/11/2012 No. Publicación: WO/2012/162067
Resumen reivindicación (es): La presente invención 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 que muestran reacción cruzada con CD3 de un mamífero no humano (<i>por ej.</i>, 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 alteraciones. HT-29 Colon Cancer Target Cells Human PBMC Effector 	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Hacienda 662



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 124420

Bogotá D.C., Diciembre 03 de 2013 - 16:06:29

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCA S.A.

NI 830.121.797

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	198581880	29/11/2013	19.641.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	613554841	02/12/2013	50.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00

=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-297917- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:23:13
Tra. 11 PATENTE/II
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 3 de 2013 - 16:06:33

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 124421

Bogotá D.C., Diciembre 03 de 2013 - 16:06:29

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.

NI 830.121.797

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	198581880	29/11/2013	19.641.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	613554841	02/12/2013	50.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
8 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	240.000.00
			\$240.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-297917-00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:23:13
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 3 de 2013 - 16:06:33

2

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
Dependencia: <i>2020</i>	Fecha: <i>13 / 12 / 20</i> AAAA MM DD		Recorrido: <i>3</i>
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:			Planilla:

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA

RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:

Fecha: 13 / 12 / 20
AAAA MM DD

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Salida: ☐

Traslado: ☐

Convenio: ☐

Radicador:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-297917	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Observaciones:

El CD Anexo contiene un total de 2 Archivos,
2 en formato pdf, las cuales fueron procesadas

graciela

El CD Anexo contiene un total de 2 Archivos,
2 en formato pdf, las cuales fueron procesadas

gravel



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-297917- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:23:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO D

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

Título de la invención:

MOLÉCULAS QUE SE UNEN A CD3 CAPACES DE UNIRSE A
CD3 HUMANO Y NO HUMANO

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas:

[0001] Esta Solicitud reivindica prioridad de las Solicitudes de Patentes de EE UU Nros. 61/488,716 (presentada el 21 de mayo de 2011; pendiente) y 61/530,353 (presentada el 1 de septiembre de 2011; pendiente), cada una de cuyas solicitudes se incorpora en este documento en su totalidad a modo de referencia.

Referencia al Listado de Secuencias:

[0002] Esta Solicitud incluye uno o más Listados de Secuencias conforme a lo dispuesto en el 37 C.F.R. 1,821 *et seq.*, que se divulgan tanto en papel como en medios susceptibles de leerse por computadora, y cuyas divulgaciones en papel y en medios susceptibles de leerse por computadora se incorporan en este documento a modo de referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención:**Campo de la invención:**

[0003] La presente invención 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 alteraciones.

Descripción de la técnica relacionada:

[0004] El sistema inmunológico corporal sirve como a defense contra una variedad de conditions, 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).

[0005] Una célula T naive, *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 naive 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 (ICAMs) present sobre la superficie of 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 naive. Se requiere una segunda señal co-estimulante. La célula T naive sólo puede ser activada por una célula que presenta un antígeno que transporta ambos un complejo MHC de péptido específico y una molécula co-estimulante sobre su superficie. El reconocimiento de los antígenos por una célula T naive en ausencia de co-estimulación 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 auto-antígenos 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 sobre una célula que presenta el antígeno produce la generación de solamente una de dos señales requeridas, la célula T no se activa y una respuesta inmunológica adaptativa no ocurre.

[0006] 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 re-activación 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 (APCs) 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 CFR 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 T Cells 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 inmuno receptora (ITAMs).

[0007] 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 efectores. Estos procesos incluyen la fosforilación de los motivos de activación basada en tirosina del inmuno-receptor (ITAMs) 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 encastre 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).

[0008] 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 por el co-receptor y moléculas co-estimulantes 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/Nonself 1(3):231-240). Aunque la estimulación de TCR es un requisito previo para activación de la célula T, se reconoce muy bien que el compromiso de las moléculas co-estimulantes, 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).

[0009] 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. Por cierto, los anticuerpos anti-CD3 fueron el primer anticuerpo aprobado para 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 transplantes 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; Vigeral, 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).

[0010] 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 transplante 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. Se han observado 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 T Cell Activation,*” *J. Immunol.* 142:737-743). El uso de anti-CD3 anticuerpos se divulga en las Patentes de EE UU Nro. 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.

[0011] Una limitación particular de los anticuerpos 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 humana enfermedades. Con el fin de obtener aprobación del mercado cualquier nueva medicación candidata debe pasar a través de evaluación rigurosa. Esta evaluación puede sub-dividirse en fases clínicas y preclínicas. Mientras que la última – dividida 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 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 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 anticuerpo 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 PCTWO2008/119567.

[0012] 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 de lograr productos terapéuticos para tratar el cáncer, autoinmunidad y enfermedades inflamatorias.

Breve descripción de la invención:

[0013] La presente invención 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 alteraciones.

[0014] En detalle, la invención proporciona una molécula que se une a CD3 que comprende un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo, en donde el fragmento que se une al antígeno comprende un dominio VL específico de CD3 del anticuerpo y un dominio VH específico de CD3 del anticuerpo, en donde el dominio VL específico de CD3 y el dominio VH específico de CD3 forman un dominio de unión al antígeno capaces de lograr la unión en forma inmuno-específica a ambos un epítipo de CD3 humano y a un epítipo del CD3 de un mamífero no humano, en donde:

- (I) el dominio VL específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab2 VL-1 (**SEC ID NRO.:16**), h-mab2 VL-2 (**SEC ID NRO.:18**), h-mab2 VL-3 (**SEC ID NRO.:20**), h-mab2 VL-4 (**SEC ID NRO.:22**), h-mab2 VL-5 (**SEC ID NRO.:24**), h-mab2 VL-6 (**SEC ID NRO.:26**), h-mab2 VL-7 (**SEC ID NRO.:28**), h-mab2 VL-8 (**SEC ID NRO.:30**), h-mab2 VL-9 (**SEC ID NRO.:32**), y h-mab2 VL-10 (**SEC ID NRO.:34**), y dicho dominio VH específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab2 VH-1 (**SEC ID NRO.:36**), h-mab2 VH-2 (**SEC ID NRO.:38**), h-mab2 VH-3 (**SEC ID NRO.:40**), h-mab2 VH-4 (**SEC ID NRO.:42**), h-mab2 VH-5 (**SEC ID NRO.:44**), h-mab2 VH-6 (**SEC ID NRO.:46**), h-mab2 VH-6L (**SEC ID NRO.:54**), h-mab2 VH-7 (**SEC ID NRO.:48**), h-mab2 VH-8 (**SEC ID NRO.:50**), h-mab2 VH-8L (**SEC ID NRO.:55**), h-mab2VH-8 di-1 (**SEC ID NRO.:56**), h-mab2 VH-8 di-2 (**SEC ID NRO.:57**), h-mab2 VH-6M (**SEC ID NRO.:72**), h-mab2 VH-8M (**SEC ID NRO.:74**), h-mab2 VH-2k (**SEC ID NRO.:87**), y h-mab2 VH-5k (**SEC ID NRO.:88**); o

(II) el dominio VL específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab1 VL-1 (SEC ID NRO.:10) y h-mab1 VL-2 (SEC ID NRO.:12), y el dominio VH específico de CD3 es h-mab1 VH (SEC ID NRO.:14).

[0015] La invención 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).

[0016] La invención 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), o h-mab2 VH-2k (SEC ID NRO.:87).

[0017] La invención 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.

[0018] 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);

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

y

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

(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 the CD3-specific Dominio VH; 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 epítipo; y

en donde:

- (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 epítipo, el segundo epítipo es diferente del epítipo CD3 unido por el dominio de unión al antígeno formado a partir de la asociación de los dominios (A) y (E); y
- (3) los dominios (C) y (F) se asocian entre sí en forma covalente.

[0019] La invención se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 en donde el segundo epítipo no es un epítipo de CD3.

[0020] La invención se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3 en donde el segundo epítipo es un epítipo de CD3 que es diferente del epítipo de CD3 unido por el dominio de unión al antígeno formado a partir de la asociación de los dominios (A) y (E).

[0021] La invención 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.

[0022] La invención 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.

[0023] La invención 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.

[0024] La invención 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 diabody es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y to un antígeno del tumor expressed 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.

[0025] La invención 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 una célula T o activación de células B en una respuesta inmunológica adaptativa.

[0026] La invención 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.

[0027] La invención se refiere en forma adicional a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las moléculas descritas con anterioridad que se unen a CD3, anticuerpos o diacuerpos, y un vehículo, excipiente o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0028] La invención se refiere en forma adicional a la composición farmacéutica descrita con anterioridad para usar en el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

[0029] La invención se refiere en forma adicional a la composición farmacéutica descrita con anterioridad para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionado 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 soriática, asma, allergic rhinitis, efectos del transplante de órganos, o enfermedad de huésped vs. injerto (GVHD). La invención 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:

[0030] Las **Figuras 1A-1B** muestran los resultados de un ELISA de captura en la 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").

[0031] Las **Figuras 2A-2B** muestran los resultados de un ELISA de captura en la 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").

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] **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.

[0035] 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.

[0036] 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.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] Las **Figuras 10A-10D** muestran los resultados de ELISAs de captura realizados sobre diacuerpos DART™ que tienen un primer sitio de unión al epítipo y segundo sitio de unión al epítipo que se unen en forma indistinta a Her2/neu, CD19, EGFR, o B7-H3.

[0040] Las **Figuras 11A-11B** muestran la capacidad de B7H3 x Diacuerpos CD3 DART™ para mediar la matanza redirigida a células de tumor que expresan B7H3.

[0041] Las **Figuras 12A-12E** muestran la capacidad de A33 x Diacuerpos CD3 DART™ para mediar la matanza redirigida a células de tumor que expresan A33.

[0042] Las **Figuras 13A and 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 matanza 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:** matanza redirigida de Células de células de linfoma de células B humanas Raji; **Figura 13B:** matanza redirigida de células de linfoma de células de manto humano JeKo-1

[0043] Las **Figuras 14A y 14B** muestran que el diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ de la presente invención fue capaz de mediar la citólisis en la presencia de células efectoras de células T tanto humanas como no humanas.

[0044] Las **Figuras 15A y 15B** muestran la capacidad del diacuerpo ERBITUX™-h-mAb2 DART™ de la presente invención 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.

[0045] 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 matanza redirigida de dichas células (Figura 16B y 16D, respectivamente).

Descripción detallada de la invención:

[0046] 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 alteraciones.

I. Definiciones

[0047] 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 CD3 moléculas, sino más bien que dicho dominio de unión al antígeno exhibe reactividad cruzada de manera tal que se unirá inmunológicamente en forma específica a human CD3 cuando se incubaba en la presencia de human CD3 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.

[0048] Como se usa en este documento, el término “Molécula que se une a CD3” abarca no sólo anticuerpos monoclonales o policlonales inactos, 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 útil de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida. El término “BiTEs” (encastradores de células T bi-específicos) se refiere a una cadena simple de molécula de polipéptido que tiene dos dominios que se unen al antígeno, uno del antígeno se une a una célula T y el segundo que 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).

[0049] El término diacuerpo “DART™” (reactivo **D**ual **A**ffinity **R**e**T**argeting) se refiere a una inmunoglobulina molecula 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 inmunoglobulina cadena pesada región variable, 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 de (*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, bio-específicos, tri-específicos, etc., y de este modo son capaces de unirse 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 sin capaces de unirse simultáneamente a una, dos, tres, four, 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 bio-específicos (*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.

[0050] Las moléculas bio-específicas (o tri-específicas 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 epítope(s). El segundo antígeno o epítope 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 GD3, gangliosida GM2, gangliosida GM3, GICA 19-9, gp IIb/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 globulo 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 transplante de tipo de célula específico del tumor, factor de crecimiento endotelial vascular, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, y $\alpha\text{v}\beta 3$). 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, viral encefalitis, dengue, viruela; *micobacteria rickettsia*, *micoplasma*, *neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococo*, *Estafilococo*, *Micobacteria*, tétano, pertusis, cólera, plaga, difteria, *clamidia*, y *legionella*; leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria; clamidia and rickettsia.

[0051] 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 and 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.”

[0052] 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 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 pueden comprender cualquiera de los dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes o sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) injertadas sobre regiones de marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios que se unen a los antígenos pueden ser 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 una respuesta inmunológica por 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 modificando las regiones variables así como también con el fin 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 (CDRs) que varían como respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, rodeada por cuatro regiones de marco (FRs) que se conservan relativamente en una especie dada y que proveen putativamente escalones para los CDRs. Cuando los anticuerpos no humanos se preparan con respecto a un antígeno particular, las regiones variables pueden “reformarse” o “humanizarse” por injerto de CDRs derivados de un anticuerpo no humano en los FRs 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 An Antilysozyme Activity*,” *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) “*Humanization of a monoclonal mouse antibody By CDR Graft: The Importance Of Frame Residue On Loop Conformation*,” *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) “*Construction of de Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*,” *Human Antibody Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) “*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*,” *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.

[0053] En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de ratón que contiene los seis CDRs de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen uno o más CDRs (uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que se denominan además uno o más CDRs “derivados de” uno o más CDRs del anticuerpo original. Como se divulga a continuación, los anticuerpos preferidos de la presente invención tienen CDRs identificadas específicas. La presente invención, sin embargo, contempla anticuerpos equivalentes que tienen CDRs alterados.

[0054] 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 epítipos 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 epítipos de CD3 o epítipos 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 necesariamente requiere (aunque puede incluir) unión “exclusiva”. En general, aunque no necesariamente, la referencia a la unión significa unión “inmunospecífica”.

[0055] 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 ha 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 tornado inmunológicamente inactivo.

[0056] Diferentes funciones biológicas están asociadas con los anticuerpos anti-CD3 de la presente invención, y dichos anticuerpos pueden exhibir cualquiera o la totalidad de los siguientes atributos, o pueden carecer de, uno, dos, tres o más 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 (*either* 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 invención pueden tener una o más de estas características.

[0057] Como se usa en este documento, el término “agenet” 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. Varios compuestos pueden ser, por ejemplo, moléculas pequeñas y oligómeros sintéticos (*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.

[0058] 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 a radioactive agent o a fluorophore (por ej. phycoerythrin (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.

[0059] 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.

[0060] El término “muestra biológica” abarca una variedad de tipos de muestra obtained 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, por ejemplo, células obtenidas de una muestra de tejido recolectada de un individuo sospechado de tener 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 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.

[0061] 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 un polinucleótido de esta invención.

[0062] 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 limitation, 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 alteración clínica observable.

[0063] 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 otros agentes, puede lograrse o se logra un resultado deseable. Mientras que el individuo necesita variar, la determinación de los rangos óptimos y 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 invención puede reducirse o alterarse potenciando la captación y penetración al tejido de las moléculas de la invención por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

[0064] Como se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico o agente, anticuerpo, composición o célula, *etc.*, se dice que se “aísla” 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.

[0065] 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.

[0066] 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, pueden comprenderse 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.

[0067] 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.

[0068] 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, ^{90}Y ; ^{131}I , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , etc.).

[0069] 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 sobrevida de los individuos.

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

[0070] 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.

[0071] En una realización, los anticuerpos monoclonales que se unen a CD3 se obtienen por medio del uso de células huésped que sobre-expresan CD3 como un inmunógeno. Dichas células incluyen, por medio de ejemplo y no como limitación, células T humanas.

[0072] Para monitorear la respuesta del anticuerpo, una pequeña muestra biológica (*por ej.*, blood) 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 la 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 de bazo disociadas, pueden fusionarse luego con células de mieloma (*por ej.*, X63- Ag8,653 y aquellas del SaIk 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).

[0073] 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 sub-clonen, si se desea, y los sobrenadantes se evalúan for anti-immunogen activity by conventional assay procedures (por ej., FACS, IHC, radioinmunoensayo, inmunoensayo por fluorescencia, etc.).

[0074] 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.

[0075] 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, o y 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 monoclal. Estos son: (1) determinar la secuencia de aminoácidos anticipada 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 inmunizado. Véase, por ejemplo, Patentes de EE UU Nro. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; y 6,331,415.

[0076] Una cantidad de moléculas de anticuerpo “humanizado” que comprenden un sitio que se une al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana se han descrito, que incluyen anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedores modificadas o de roedores y sus regiones determinantes de complementariedad asociadas (CDRs) fusionadas a dominios constantes humanos (véase, por ejemplo, Winter *et al.* (1991) “*Man-made Anticuerpos*,” Nature 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Respuesta*,” 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 Cáncer 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 an Antibody Assay With Those From A Mouse*,” Nature 321:522-525). Otra referencia describe CDRs de roedores soportadas por regiones de marco de roedores diseñadas en forma recombinante. Véase, por ejemplo, Publicación de la Patente Europea Nro. 519,596. Estas moléculas “humanizadas” se diseñaron para minimizar la respuesta biológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo anti-humano 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) “*Polimerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR Graft, 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 Nro. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; y 5,866,692.

[0077] La invención abarca, además, fragmentos variables de la región de cadena simple (“scFv”) de los anticuerpos de esta invención, tales como mu-anti-CD3. Los fragmentos variables de la región 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 polinucleótido que codifica el scFv puede introducirse en una célula huésped apropiada, ya sea eucariótica, tales como células de levadura, plant, 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.

[0078] La invención 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 which que no cambian significativamente en forma perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogo 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 poliglicosilados y no glicosilados, así como también polipéptidos con otras modificaciones post-translacionales, 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 re-diseño de una región, tales 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, tales como la unión de restos radiactivos. 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.

[0079] El hecho de que una sola alteración en la cadena de aminoácidos de un residuo de CDR puede 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 las secuencias de CDR funcionales. En un método preferido para obtener dichos CDRs variantes, un polinucleótido que codifica la CDR se mutageniza (por ejemplo por medio de mutagénesis aleatoria o por el método dirigido al sitio (*por ej.*, amplificación de la reacción de la 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) “*Matriz Amino Acido Substitution 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 Using General Scoring Schemes*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) “*Matrix Amino Acid Substitution 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 afectará la función). Si un fragmento que se une al antígeno que comprende la CDR resultante no logra unirse a a CD3, entonces el puntaje de sustitución simple BLOSUM62.iiij se considera insuficientemente conservador, y se selecciona un nuevo candidato y se produce tal que tenga un mayor puntaje de sustitución. De este modo, por ejemplo, si el residuo original era glutamato (E), y el residuo sustituto no funcional fuera histidina (H), entonces el puntaje de sustitución por BLOSUM62.iiij será 0, y se prefieren cambios más conservadoras (tales como a aspartato, asparagina, glutamina, o lisina).

Tabla 1																				
	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

[0080] La invención de este modo contempla el uso de mutagénesis aleatoria para identificar CDRs 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 CDRs que se unen con mayor (o menor) afinidad cuando se compara con el anticuerpo inicial o de origen (Véase, por ej. Glaser *et al.* (1992) J. Immunology 149:3903). La mutagénesis entre codones en lugar de nucleótidos individuales produce un repertorio aleatorizado de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un pool de clones variantes cada uno de los cuales difiere por una sola alteración en la cadena 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 movimiento de CDR que radomiza la cadena liviana puede hacerse posible (Véase Schier *et al.*, 1996, J. Mol. Bio. 263:551).

[0081] Los métodos 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 Naïve Human AntibodyLibrary And Directed Contra The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs Con 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 CD2 seleccionado (*por ej.*, 100 ng/pocillo en buffer de carbonato a temperatura ambiente durante 2 hrs) y posteriormente incubated con CD3 soluble agregado a una dilción de 1/10 e incubado a temperatura ambiente durante 16 hrs o diluido hasta una concentración e 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 cmenzando con 0,5 µg/ml en PBS-T-BSA se agregan a continuación y se incuban durante 1 hr 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).

[0082] La invención incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de esta invención. Los polipéptidos de esta invención 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 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.

[0083] La invención abarca, además, proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los polipéptidos y los anticuerpos de esta invención. 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 invención, 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.

[0084] 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 MÉTODOS, 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).

[0085] Los polipéptidos de la invención 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).

[0086] 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 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).

[0087] 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., tobacco) 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 La producción of Recombinant Antibodies*,” J. Immunol Métodos 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 Visualization Technology*,” Annu. Rev. Immunol. 12,433-455).

[0088] 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.

[0089] 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 cDNA de tejidos o células que expresan CD3, sobre-expresando los cDNAs en un segundo tipo de célula, y seleccionando las células transfectadas del segundo Tipo de Célula para una unión específica a CD3. Las descripciones de los métodos usados en la

clonación de genes de mamífero para 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).

[0090] Los cDNAs que codifican anticuerpos anti-CD3, y otros agonistas de péptidos CD3, antagonistas y modulares pueden obtenerse por transcripción inversa de los mRNAs de un tipo de célula particular de acuerdo con métodos estándar en la materia. Específicamente, el mRNA 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 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 cDNAs 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, vectores virales, que incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, y cósmidos.

[0091] Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse into 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 tales como virus de vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos con frecuencia dependerá de las características de la célula huésped.

[0092] Cualquier célula huésped capaz de sobre-expresar ADNs 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 cDNAs en un nivel de alrededor de 5 veces más alto, con mayor preferencia 10 veces 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 sobre-expresa el anticuerpo o proteína de interés pueden identificarse.

III. Métodos para Selección de Polipéptidos y Anticuerpos monoclonales

[0093] 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 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 monoclonal anti-CD3. Los hibridomas preferidos de la presente invención 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 un CD3 de primate.

[0094] 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 diaminobenzidina (DAB)). Un método alternativo que puede usarse es la imagen espejo policlonal 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 alternativa, el anticuerpo primario puede marcarse directamente con el marcador detectable.

IV. Métodos de caracterización de anticuerpos anti-CD3

[0095] 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, The Netherlands). El mapeo de epítipo puede usarse para determinar la secuencia a la cual se une 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.

[0096] 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 epítipo al cual el anticuerpo anti-CD3 se une pueden 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.

[0097] Incluso otro método que pueden usarse para caracterizar un anticuerpo anti-CD3 es el uso de ensayos de competición conocidos por unirse al mismo antígeno, es decir, CD3 para determinar si los anticuerpos anti-CD3 se unen al mismo epítipo 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 invención

[0098] La presente invención abarca composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos anti-CD3, polipéptidos derivados de anticuerpos anti-CD3, polinucleótidos que comprenden secuencia que codifica el anticuerpos anti-CD3, y otros agentes como se describió con anterioridad. La invención 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 tales como cualquier matriz de soporte sólida, insoluble usada en los procedimientos de diagnóstico, selección o purificación discutidos en este documento. Los materiales y métodos 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 métodos 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-Holly (1979); Porath *et al.*, “Biospecific Affinity Chromatography”, en Neurath, H. *et al.* (eds), THE PROTEINS, 3rd ed., Vol. 1, pp. 95-178 (1975); y Schott, H. AFFINITY CHROMATOGRAPHY, Macel Dekker, Inc. NY (1984).

[0099] 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 (*either* 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 incluyen la capacidad de unirse preferencialmente al mismo epítipo 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.

[00100] Un anticuerpo preferido de la invención exhibirá manchado diferencial con IHC de tejido de tumor con relación a normal, tejido no canceroso, 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 invención exhibirán en forma adicional niveles deseables

de afinidad y especificación por el antígeno. Los anticuerpos preferidos de la presente invención exhibirán en forma adicional niveles deseables de actividad inmunomoduladora e internalización celular.

[00101] En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención 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 invención 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 invención 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.

[00102] De acuerdo con lo anterior, la invención 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 CDRs 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(s) que son en forma sustancial homólogas a por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs 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 invención, 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). La invención también proporciona métodos para producir cualquiera de estos anticuerpos. Los métodos para producir anticuerpos se conocen en la materia y se describen en este documento.

[00103] La invención también proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la invención. 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 CDRs del anticuerpo. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende tres CDRs 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 of the original anticuerpo. 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.

[00104] En algunas realizaciones de esta invención, las células de esta invención que expresan CD3, una porción of CD3, anticuerpos anti-CD3 u otros polipéptidos que se unen a CD3 de esta invención se administran directamente a un individuo para modular la actividad biológica de CD3*in vivo*.

[00105] Los anticuerpos preferidos anti-CD3 de la presente invención son mAb1 y mAb2, y derivados humanizados o quiméricos de fragmentos que se unen al antígeno de los anteriores que son reactivos hacia la molécula CD3 humana y de macaco. Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que codifican de la cadena variable liviana y cadena variable pesada de anticuerpos mAb1 y mAb2 murinos se muestran a continuación. Las secuencias de los CDRs de los anticuerpos (mAb1 y mAb2) ejemplificativos se muestran en negrita y subrayados.

**A. Secuencias de regiones variables anticuerpo monoclonal murino
mAb1**

[00106] Secuencia de aminoácidos de Anticuerpo monoclonal murino mAb1 Cadena variable liviana (**SEC ID NRO.:1**):

QVLTQSPAI MSAFPGEKVT MTC**SASSSVSYMN**WYQKSG TSPKRWIY**DS**
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMETE DAATYYC**QQWSRNPPT**FGGG TKLQITR

[00107] Secuencia de polinucleósido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb1
Cadena variable liviana (**SEC ID NRO.:2**):

cagggtggtgc tgacccagtc ccccgccatc atgtccgcct tccccggcga
gaaagtgaca atgacctgct ccgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact
ggtatcagca gaagtccggc acctcccca agcgggtggat ctacgactcc
tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga ttctctggct cgggtccgg
caccagctac tccctgacca tctcctccat ggaaaccgag gacgccgcca
cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc cccctacctt cggcgagggc
accaagctgc agatcaccag a

[00108] Secuencia de aminoácidos de Anticuerpo monoclonal murino mAb1 Cadena variable
pesada (**SEC ID NRO.:3**):

QVQLQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RSTMHWVKQR PGQGLEWIGY
INPSSAYTNYNQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCASPQ
VHYDYNGFPY WGQGTTLTVS S

[00109] Secuencia de polinucleósido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb1
Cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:4**):

cagggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgccctc
cgtgaagatg tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cgggtccacca
tgactgggt gaaacagcgg cctggacagg gcctggaatg gatcggctac
atcaaccct ccagcgccta caccaactac aaccagaagt tcaaggacaa
ggccaccctg accgccgaca agtcctccag caccgcctac atgcagctgt
cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcgc ctccccccag
gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc
tcc

**B. Secuencias de regiones variables anticuerpo monoclonal murino
mAb2**

[00110] Secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal murino mAb2 Cadena variable
liviana (**SEC ID NRO.:5**):

QAVVTQESAL TTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQE KPDHLFTGLI
GGTNKRAPGV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF
GGGTLTLVLG

[00111] Secuencia de polinucleósido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb2
Cadena variable liviana (**SEC ID NRO.:6**):

caggccgtgg tgacacagga gtcagctctg accacatccc caggcgaaac
agtgactctg acctgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact
acgctaattg ggtgcaggag aagcccgacc acctgttcac tgggctgac
ggcggaacca acaaaagggc acccgggtgtg cctgcccgtt tttctggcag
tctgatcgga gacaaggccg ctctgacaat tactggcgcc cagacagagg
atgaagctat ttacttctgt gcactgtggt atagcaatct gtgggtgttt
gggggtggca ccaaactgac agtgctggga

[00112] Secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal murino mAb2 Cadena variable
pesada (**SEC ID NRO.:7**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSA

[00113] Secuencia de polinucleósido que codifica el anticuerpo monoclonal murino mAb2
 Cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:8**):

gaggtgaagc tgctggaaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc
 actgaaactg tcttgcgccc cctccggctt cacctttaac acatacgcta
 tgaattgggt gcgacaggca cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg
 atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa
 ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt ctgtatctgc
 agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg
 cacggttaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
 ggggacactg gtgactgtgt cttcc

[00114] 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

[00115] 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 de generador de respuesta tales como citotoxicidad que depende de los anticuerpos, desgranulación de mastocitos, y fagocitosis a las señales inmuno moduladoras 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, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), expresamente incorporadas en este documento a modo de referencia, y 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
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
EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
380 390 400 410 420
EALHNHYTQK SLSLSPGK
430 440

[00116] Dado que el receptor de anticuerpos específicos de CD3 de Fc que no se unen a (FcR) son mínimamente desprovistos 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 en el tratamiento de enfermedades autoinmunes and rechazo del tejido huésped vs. injerto. Los anticuerpos específicos de CD3 que o se unen a FcR también se han postulado para inducir remisión en la tolerancia a la diabetes 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 Typo 1 Diabetes*,” Expert Opin. Biol. Ther. 10(3):459-465).

[00117] La presente invención 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 CDRs pero una región Fc de tipo salvaje).

[00118] En una realización, dichos anticuerpos serán incapaces de unirse a cualquier receptor de Fc. En forma alternativa, la región Fc del anticuerpo se notificará con el fin de permit que se una a los receptores de Fc tales como FcγRIIB que son inhibidores, pero no receptores de Fcs tales como FcγRIIA, FcγRIIA o FcγRIIB que promueven la activación del sistema inmunológico.

[00119] Con preferencia, las propiedades de unión de las moléculas de la invención 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 invención 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-antigen 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 un ensayo ELISA, ensayo por resonancia plasmónica de superficie, ensayos de inmunoprecipitación. En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención 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 invención no excluye moléculas de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos de base *in vitro* pero no exhiben el fenotipo deseado en *vivo*.

[00120] En algunas realizaciones, las moléculas de la invención 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 las 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 invención 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 las 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 invención comprenden por lo menos dos las modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, possessing 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más las 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 invención abarca, además, la modificación de aminoácidos en the región de bisagra. En una realización particular, la invención 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.

[00121] En realizaciones particularmente preferidas, la invención 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 realizados usados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser dependientes de NK o dependientes de macrófago.

[00122] En realizaciones particularmente preferidas, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o tiene a una reducción en la actividad de ADCC y/o una reducida unión a FcγRIIIA (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 realizados usados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser dependientes de NK o dependientes de macrófago.

[00123] Las variantes de Fc de la presente invención 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 in 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 FcγRIII 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 γRI, Fc γRII, Fc γRIII, y FcRn and design de IgG1 variants with improved binding go the Fc γRI*,” *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-6604). La invención abarca combinar una variante Fc de la invención con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas al anticuerpo modificado.

[00124] En otras realizaciones, la invención abarca el uso de cualquier variante de Fc conocidas en la materia, tales como aquellas divulgados en Jefferis, B.J. *et al.* (2002) “*Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγRIII: 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 γRI, Fc γRII, Fc γRIII, y FcRn And Design De IgG1 Variants With Improved Binding to The Fc γRI*,” *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Idusogie, E.E. *et al.* (2000) “*Mapping Of The Binding to C1q Site On Rituxan, A Chimeric Antibody with A Human IgG Fc*,” *J. Immunol.* 164:4178-84; Reddy, M.P. *et al.* (2000) “*Elimination Of receptor de Fc-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 de of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies*,” *Cell. Immunol.* 200:16-26; Armour, K.L. *et al.* (1999) “*Recombinant human IgG Molecules Lacking FcγRI Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities*,” *Eur. J. Immunol.* 29:2613-24; Jefferis, R. *et al.* (1996) “*Modulation of Fc(γ)RI And Human Activation of Complements 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 Humun Fc γRI 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 γRI 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 γRI Receptors*,” *FASEB J.* 9:115-

19; Alegre, M.L. *et al.* (1994) "A Non-Activating "Humanized" Monoclonal anti-CD3 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 Gamma R11," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund *et al.* (1991) "Humun Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interac 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.

[00125] En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una región Fc variante (que incluyen 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, y 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 invención 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 la sustituciones mencionadas con anterioridad. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la invención 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 invención comprende un dominio Fc que tiene una modificación (*por ej.*, sustitución, inserción, eliminación) en la posición 234 and position 235 de la región Fc. In a specific ejemplo de acuerdo con esta realización, el anticuerpo de la invención comprende un dominio Fc que tiene una sustitución en la posición 234 con alanina

and una sustitución en la posición 235 con ácido glutámico. Incluso en otra realización más preferida, el anticuerpo de la invención comprende un Fc que tiene una sustitución con alanina en la posición 234 y una sustitución con alanina en la posición 235.

[00126] En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende a Fc region, 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 invención tiene una región Fc que exhibe unión reducida o nula a uno o más ligandos efectores, cuya región Fc comprende a 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; a 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 la sustituciones mencionadas con anterioridad. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende un dominio Fc que tiene una alanina en la posición 265 y en la posición 297; una alanina en la posición 265 and a 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 invención comprende un dominio Fc que tiene una alanina at 234 y unun ácido glutámico en la posición 235. En realizaciones preferidas, el anticuerpo de la invención comprende un Fc que tiene una alanina en la posición 234 y una alanina en la posición 235.

[00127] Los anticuerpos de la invención que comprenden un dominio Fc que tiene una alanina en la 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 término 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.

[00128] En ciertas realizaciones, la una o más modificaciones de aminoácidos que abole la unión a todos los FcγRs o reduce o abrogata 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 invención 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 auto-inmunes.

[00129] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y fragmentos que se unen al antígeno de la invención, 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 invención, 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, tales 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).

[00130] Los anticuerpos de la invención 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, TNF-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; cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

D. Diacuerpos CD3 DART™

[00131] Como se discutió con anterioridad, la presente invención en forma adicional abarca anticuerpos biespecíficos, específicos y multiespecíficos. Un ejemplo particularmente preferido de dichos anticuerpos comprenden 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.

[00132] 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 epítotope (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:

- (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).

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 epítotope (1); dichos dominios del diacuerpo DART™ (B) y (D) se asocian para formar un sitio de unión que se une dicho epítotope (2). Los dominios (C) y (F) se asocian entre sí en forma covalente.

[00133] 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 auto-montarse. La interacción de dos de las cadenas de polipéptidos producirán 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 funcional los diacuerpos DART™. 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 a VL_A-VH_A interaction), cada polipéptido comprenderá a VH_A y una 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. Donde los

dominios VL y VH derivan de anticuerpos específicos para diferentes antígenos, formación de un diacuerpo funcional biespecífico DART™ requiere la interacción de dos cadenas de polipéptidos diferentes, *es decir*, formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico DART™, una cadena de polipéptido comprenderá a VL_A y una 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 a VL_A y un VH_B y el otro que comprende un VL_B y un VH_A, dos sitios de unión diferentes se 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 VL-VL o VH-VH dominios; sin embargo, 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 el método conocido en la técnica o ejemplificado en este documento, *por ej.*, cromatografía por afinidad.

[00134] Una o más de las cadenas de polipéptidos del diacuerpo DART™ may en forma opcional comprenden un dominio 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 invención 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)).

[00135] Los dominios Fc en las cadenas de polipéptidos del 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.*, Fc-FcγR, interacciones. 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 a bivalent diacuerpo DART™ que

comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la de un anticuerpo bivalente no modificado. Such Las moléculas de 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. Such tetramers comprenden dos cadenas de polipéptidos “más pesadas”, *es decir*, una cadena de polipéptido que comprende a VL, a VH y un dominio Fc, y dos cadenas de polipéptidos “más livianas”, *es decir*, cadena de polipéptido que comprende un VL y un VH. The más liviana and más pesada chains 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. Such an con estructura de Ig diacuerpo DART™ es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

VI. Métodos terapéuticos con el uso de los anticuerpos anti-CD3 de la presente invención

[00136] Los anticuerpos anti-CD3 de la presente invención y sus fragmentos que se unen al antígeno tienen utilidad particular en el tratamiento de los cánceres asociados con CD3 expresión y en el tratamiento de enfermedad autoinmune y otros trastornos inflamatorios.

[00137] Estos usos pueden incluir la formación de a complex 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

[00138] Los anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno de la presente invención se unen a CD3 presente sobre la superficie de las células T. El fragmento que se une al antígeno de la presente invención puede usarse en el contexto de una molécula biéspecífica (o triespecífica 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 triespecíficas o multiespecíficas) de la presente invención 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 vesícula, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, glioblastoma, cáncer de tiroides, linfoma, mieloma y leucemia. Dichos 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 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 globulo de grasa de leche humana, IgE, Antígeno del carcinoma pan KS 1/4, LEA, adenocarcinoma de pulmón F3 antigen, 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 transplante 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 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, viral encefalitis, dengue, viruela; micobacteria rickettsia, micoplasma, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococo*, *Estafilococo*, *Micobacteria*, tétano, pertusis, cólera, plaga, difteria, clamidia, y legionella; leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria; clamidia y rickettsia.

[00139] Los anticuerpos y fragmentos que se unen al antígeno de la presente invención se unen a CD3 presente sobre la superficie de las células T. con el uso de conventional métodos, dichos anticuerpos pueden marcarse con fluoresceína, como se describió con anterioridad. Cuando dichas moléculas marcadas se incuban en la presencia de una molécula biespecífica (tales como por ejemplo, un diacuerpo UDART™ que tiene un dominio de unión al epítope que se une al receptor de células T y un dominio de unión al epítope 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 matanza redirigida de dichas células.

[00140] En una realización alternativa, CD19 puede usarse como el “segundo” epítipo, de manera tal 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 co-encastre 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 co-encastre 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 el DART CD19xCD3 se observó en todas las células B de destino que expresan CD19 evaluadas con el uso de PBMC en reposo y pre-estimulada humana o poblacones 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 aplicaciones de células T/B para aplicaciones de matanza de células T. Es importante observar que el nivel potenciado de matanza 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 matanza de células blanco. Finalmente, la capacidad del DART CD19xTCR de inhibir el linfoma de células B en ratones NOD/SCID cuando se co-administra 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 invención podrían emplearse del mismo modo que los anticuerpos CD3 de Moore, P.A. *et al.* De este modo, la invención proporciona un tratamiento para cánceres (en especial linfomas y Leucemias) que implica células con cáncer que expresan CD3.

[00141] Las moléculas biespecífica (o triespecíficas o multiespecíficas) de la presente invención se administran con preferencia a un paciente en una o más dosis 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

[00142] La invención también proporciona 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, autoinmune pancreatitis, enfermedad inflamatoria intestinal (*por ej.*, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad celíaca, glomerulonefritis, escleroderma, 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 invención 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 tratamiento (*por ej.*, en el tratamiento o profilaxis de Diabetes Tipo I, los métodos de la invención pueden reducir la necesidad de administración de insulina exógena en el sujeto). Además, los métodos de la invención 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).

[00143] En ciertas realizaciones, the course de tratamiento con un anticuerpo anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno de acuerdo con los métodos de la invención 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 invención 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 posterior al tratamiento previo.

[00144] 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 $\mu\text{g/kg}$ o aproximadamente 25-26 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$, 178 $\mu\text{g/kg}$, 180 $\mu\text{g/kg}$, 128 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$, 95 $\mu\text{g/kg}$, 90 $\mu\text{g/kg}$, 85 $\mu\text{g/kg}$, 80 $\mu\text{g/kg}$, 75 $\mu\text{g/kg}$, 70 $\mu\text{g/kg}$, 65 $\mu\text{g/kg}$, 60 $\mu\text{g/kg}$, 55 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 45 $\mu\text{g/kg}$, 40 $\mu\text{g/kg}$, 35 $\mu\text{g/kg}$, 30 $\mu\text{g/kg}$, 25 $\mu\text{g/kg}$, 20 $\mu\text{g/kg}$, 15 $\mu\text{g/kg}$, 13 $\mu\text{g/kg}$, 10 $\mu\text{g/kg}$, 6,5 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$, 3,2 $\mu\text{g/kg}$, 3 $\mu\text{g/kg}$, 2,5 $\mu\text{g/kg}$, 2 $\mu\text{g/kg}$, 1,5 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$, 0,5 $\mu\text{g/kg}$, 0,25 $\mu\text{g/kg}$, 0,1 $\mu\text{g/kg}$, o 0,05 $\mu\text{g/kg}$ 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.

[00145] En una realización, se administra a un sujeto una o más dosis de 200 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 175 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 150 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 128 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 100 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 95 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 90 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 85 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 80 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 75 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 70 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 65 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 60 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 55 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 50 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 45 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 40 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 35 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 30 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 25 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 20 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 15 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 10 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 5 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 2,5 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 2 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 1,5 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 1 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 0,5 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 0,25 $\mu\text{g/kg}$ o menos, 0,1 $\mu\text{g/kg}$ o menos, o 0,05 $\mu\text{g/kg}$ o menos de uno o más anticuerpos anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno de la invención para prevenir, tratar o aliviar uno o más síntomas de un trastorno autoinmune o enfermedad de las células T.

[00146] En realizaciones particulares, se administra a un sujeto una o más dosis de alrededor de 5 - 1200 $\mu\text{g/m}^2$, con preferencia, 51 - 826 $\mu\text{g/m}^2$. En otra realización, se administra a un sujeto una o más dosis unitarias de 1200 $\mu\text{g/m}^2$, 1150 $\mu\text{g/m}^2$, 1100 $\mu\text{g/m}^2$, 1050 $\mu\text{g/m}^2$, 1000 $\mu\text{g/m}^2$, 950 $\mu\text{g/m}^2$, 900 $\mu\text{g/m}^2$, 850 $\mu\text{g/m}^2$, 800 $\mu\text{g/m}^2$, 750 $\mu\text{g/m}^2$, 700 $\mu\text{g/m}^2$, 650 $\mu\text{g/m}^2$, 600 $\mu\text{g/m}^2$, 550 $\mu\text{g/m}^2$, 500 $\mu\text{g/m}^2$, 450 $\mu\text{g/m}^2$, 400 $\mu\text{g/m}^2$, 350 $\mu\text{g/m}^2$, 300 $\mu\text{g/m}^2$, 250 $\mu\text{g/m}^2$, 200 $\mu\text{g/m}^2$, 150 $\mu\text{g/m}^2$, 100 $\mu\text{g/m}^2$, 50 $\mu\text{g/m}^2$, 40 $\mu\text{g/m}^2$, 30 $\mu\text{g/m}^2$, 20 $\mu\text{g/m}^2$, 15 $\mu\text{g/m}^2$, 10 $\mu\text{g/m}^2$, o 5 $\mu\text{g/m}^2$ 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.

[00147] 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, o 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 $\mu\text{g/kg/día}$, 175 $\mu\text{g/kg/día}$, 150 $\mu\text{g/kg/día}$, 125 $\mu\text{g/kg/día}$, 100 $\mu\text{g/kg/día}$, 95 $\mu\text{g/kg/día}$, 90 $\mu\text{g/kg/día}$, 85 $\mu\text{g/kg/día}$, 80 $\mu\text{g/kg/día}$, 75 $\mu\text{g/kg/día}$, 70 $\mu\text{g/kg/día}$, 65 $\mu\text{g/kg/día}$, 60 $\mu\text{g/kg/día}$, 55 $\mu\text{g/kg/día}$, 50 $\mu\text{g/kg/día}$, 45 $\mu\text{g/kg/día}$, 40 $\mu\text{g/kg/día}$, 35 $\mu\text{g/kg/día}$, 30 $\mu\text{g/kg/día}$, 26 $\mu\text{g/kg/día}$, 25 $\mu\text{g/kg/día}$, 20 $\mu\text{g/kg/día}$, 15 $\mu\text{g/kg/día}$, 13 $\mu\text{g/kg/día}$, 10 $\mu\text{g/kg/día}$, 6,5 $\mu\text{g/kg/día}$, 5 $\mu\text{g/kg/día}$, 3,2 $\mu\text{g/kg/día}$, 3 $\mu\text{g/kg/día}$, 2,5 $\mu\text{g/kg/día}$, 2 $\mu\text{g/kg/día}$, 1,6 $\mu\text{g/kg/día}$, 1,5 $\mu\text{g/kg/día}$, 1 $\mu\text{g/kg/día}$, 0,5 $\mu\text{g/kg/día}$, 0,25 $\mu\text{g/kg/día}$, 0,1 $\mu\text{g/kg/día}$, o 0,05 $\mu\text{g/kg/día}$; y/o en donde la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva es 1200 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 1150 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 1100 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 1050 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 1000 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 950 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 900 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 850 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 800 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 750 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 700 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 650 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 600 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 550 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 500 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 450 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 400 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 350 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 300 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 250 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 200 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 150 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 100 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 50 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 40 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 30 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 20 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 15 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, 10 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$, o 5 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$. En otra realización, la dosis intravenosa de 1200 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 1150 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 1100 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 1050 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 1000 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 950 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 900 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 850 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 800 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 750 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 700 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 650 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 600 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 550 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 500 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 450 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 400 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 350 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 300 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 250 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 200 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 150 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 100 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 50 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 40 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 30 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 20 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 15 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, 10 $\mu\text{g/m}^2$ o menos, o 5 $\mu\text{g/m}^2$ 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 $\mu\text{g/m}^2$, 8000 $\mu\text{g/m}^2$, 7000 $\mu\text{g/m}^2$, 6000 $\mu\text{g/m}^2$, y puede ser de menos de 5000 $\mu\text{g/m}^2$,

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 $\mu\text{g}/\text{m}^2$.

[00148] 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 95 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ each day; o aumenta en, *por ej.*, 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 40 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 70 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 80 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 90 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 350 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 450 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 550 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, o 650 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 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.

[00149] En una realización específica, se administra a un sujeto por vía intramuscular una o más dosis de a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, con preferencia 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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, o 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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.

[00150] En otra realización, se administra a un sujeto por vía subcutánea una o más dosis de a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, con preferencia 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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.

[00151] En otra realización, se administra a un sujeto por vía intravenosa una o más dosis de a 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.

[00152] 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 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.

[00153] 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 $\mu\text{g/kg/día}$ se administra en cuatro dosis de 3-4 $\mu\text{g/kg}$ en intervalos de 6 horas para reducir el nivel de liberación de citoquinas causado por la administración del anticuerpo.

[00154] 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 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$ 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 período 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.

[00155] En otras realizaciones, la fracción del conjunto del régimen puede administrarse en dosis crecientes. Por ejemplo, para el régimen de 51 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$ hasta 826 $\mu\text{g/m}^2/\text{día}$ 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 $\mu\text{g/m}^2$ el día 1, 10,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 2, 20,7 $\mu\text{g/m}^2$ el día 3, 41,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 4 y 82,6 $\mu\text{g/m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 1/4, la dosis será de 12,75 $\mu\text{g/m}^2$ el día 1, 25,5 $\mu\text{g/m}^2$ el día 2, 51 $\mu\text{g/m}^2$ el día 3, 103 $\mu\text{g/m}^2$ el día 4, y 207 $\mu\text{g/m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 1/3, la dosis será de 17 $\mu\text{g/m}^2$ el día 1, 34,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 2, 69 $\mu\text{g/m}^2$ el día 3, 137,6 $\mu\text{g/m}^2$ el día 4, y 275,3 $\mu\text{g/m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 1/2, la dosis será de 25,5 $\mu\text{g/m}^2$ el día 1, 51 $\mu\text{g/m}^2$ el día 2, 103 $\mu\text{g/m}^2$ el día 3, 207 $\mu\text{g/m}^2$ el día 4, y 413 $\mu\text{g/m}^2$ los días 5 a 14. Cuando la fracción es 2/3, la dosis será de 34 $\mu\text{g/m}^2$ el día 1, 69 $\mu\text{g/m}^2$ el día 2, 137,6 $\mu\text{g/m}^2$ el día 3, 275,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 4, y 550,1 $\mu\text{g/m}^2$ los días 5 to 14. Cuando la fracción es 3/4, la dosis será de 38,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 1, 77,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 2, 155,3 $\mu\text{g/m}^2$ el día 3, 309,8 $\mu\text{g/m}^2$ el día 4, y 620 $\mu\text{g/m}^2$ los días 5 a 14.

[00156] 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, o 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 $\mu\text{g/m}^2$, 200 $\mu\text{g/m}^2$, 250 $\mu\text{g/m}^2$, 500 $\mu\text{g/m}^2$, 750 $\mu\text{g/m}^2$, 1000 $\mu\text{g/m}^2$, 1500 $\mu\text{g/m}^2$, 2000 $\mu\text{g/m}^2$, 3000 $\mu\text{g/m}^2$, 4000 $\mu\text{g/m}^2$, 5000 $\mu\text{g/m}^2$, 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 libre anti-CD3 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%.

[00157] 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, que se incorpora en este acto a modo de referencia en su totalidad. 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 libre anti-CD3 o fragmentos que se unen al antígeno detectado (por ejemplo, menos de 200 ng/ml del fármaco se detecta en la sangre del paciente).

[00158] 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.

[00159] 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: anormalidades 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: anormalidades 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.

[00160] De acuerdo con la invención, 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 may be repeated at 1 meses, 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 el trastorno autoinmune recurren después de la mejora posterior a la dosis o régimen de dosificación inicial o anterior, o cuando los síntomas asociados con el 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 invención. Por ejemplo, con respecto a diabetes, a repeat dose 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 puede administrarse a un sujeto when, 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, a repeat dose 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 puede administrarse a un sujeto cuando, por ejemplo, la respuesta al C-péptido 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.

[00161] 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.

[00162] 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 primarily al manejo de las consecuencias 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 auto-antígeno 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.

[00163] 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 anti-linfocíticas, 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 lograrse por efectos indeseables tóxicos y una reducción en los niveles de mastocitos hematopoyéticos. Además, los pacientes que reciben terapias con frecuencia desarrollan niveles significativos de anticuerpos anti-ratón humano (HAMA), anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA) y respuestas anti-idiotípicos, lo que puede limitar los tratamientos reiterados cuando termina la remisión.

[00164] 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 la células T maduras.

[00165] Debido en parte a su reactividad cruzada con non-human CD3 (lo que permite una dosificación más exacta y sensible), los anticuerpos anti-CD3 de la presente invención are considered to tienen utilidad particular en el tratamiento de enfermedad autoinmune no obstante las falas aparentes del arte previo.

[00166] Dichos anticuerpos and sus fragmentos de unión al antígeno pueden usarse solos o en conjunción con otros agentes farmacológicos. En particular, la presente invención contempla 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). Los anticuerpos anti-celulas 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.

[00167] Con preferencia el anticuerpo anti célula B empleado o fragmento que se une al antígeno se orientarán a un marcador de superficie de células B, tales 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, otra molécula accesoria involucrada en la asociación de células T y células B que conduce una célula T y activación de células B en una respuesta inmunológica adaptativa. En una realización adicional preferida, el anticuerpo anti célula B puede ser un anticuerpo que desprovee la célula B, tales 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.

[00168] En forma alternativa, dicho tratamiento combinado pueden 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 HLC 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.

[00169] 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 célula T se activa. El anticuerpo no mitogénico o mitogénico reducido puede ser útil para prevenir los “efectos colaterales a la primera dosis” observados cuando el anticuerpo anti-linfocítico se administra a un. El anticuerpo no mitogénico o reducido puede ser un anticuerpo diseñado que tiene un fragmento de Fc modificado que previene o inhibe la unión células efectoras.

C. Métodos de administración

[00170] En un aspecto, las realizaciones de la presente invención proveen 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 invención 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 para proporcionar una remisión completa que no recaiga, en particular donde el tratamiento comienza apenas después de diagnosticar la enfermedad autoinmune.

[00171] La remisión clínica lograda con el tratamiento combinado puede ser una remisión completa o puede ser una remisión parcial en la cual las significativas reducciones en los síntomas de la enfermedad se mantienen durante un período prolongado. Por ejemplo, un sujeto que recibe el tratamiento de la presente invención 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 céfaloorraquídeo (CSF), suero, orina y 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 (PBMCs) o células T purificadas cuando se compara con sujetos tratados con el tratamiento convencional.

[00172] Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por cualquier medio apropiado, que incluyen 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) subcutáneas. 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.

[00173] 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 invención 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 después del comienzo de una infusión.

[00174] La terapia provista por la combinación de composiciones de la presente invención (que incluyen diacuerpos DART™) puede administrarse a un sujeto con el uso de una dosis inicial de primer anticuerpo que es menor que la cantidad de such 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 anticuerpo anti célula T terapéutico que es menor que menos de 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.

[00175] El segundo anticuerpo de un tratamiento combinado también puede administrarse a un sujeto que necesita de 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 depleción anti célula B que logra menos de 100% de depleción de células B, menos de 50% de depleción de células B, menos de 30% de depleción o incluso ninguna depleción 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 depleción de células B que proporciona 100% de depleción de células B en el sujeto cuando se administra sola.

[00176] En algunos casos, la respuesta clínica puede ser una respuesta de que ninguno ni el primero ni el 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 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

[00177] Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados en las realizaciones de la presente invención se preparan para almacenamiento, envío y administración, mezclando una composición de la presente invención 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.

[00178] El término “aceptables desde el punto de vista farmacéutico” signific aprobado por 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, adjuvante (*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.

[00179] Las composiciones de la invención 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 patient) 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 invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de anticuerpos humanizados de la invención y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00180] En general, los ingredientes de las composiciones de la invención 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 sachét 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 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.

[00181] Las composiciones de la invención 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

[00182] La invención proporciona un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con anticuerpos humanizados de la invención. En forma adicional, uno o

más otros agentes terapéuticos o profilácticos useful para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el pack o kit farmacéutico. La invención también proporciona un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. En forma opcional asociados con dicho(s) recipiente(s) puede(n) ser 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 regulatoria de la fabricación, el uso o la venta para administración a los humanos.

[00183] La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende one o más anticuerpos humanizados de la invención. En otra realización, un kit comprende, en forma adicional, uno o más otros agentes terapéuticos o profilácticos 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 cancer. 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.

[00184] En una realización, la presente invención proporciona un artículo de fabricación que contiene anticuerpos que se usarán para el tratamiento combinado de la enfermedad autoinmune. El artículo de fabricación comprende un envase que comprende un primer anticuerpo que se une 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 de tratamiento para enfermedad autoinmune. Donde el primero 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.

[00185] Los envases del artículo de fabricación pueden ser de cualquier material apropiado que no reaccionará con o afectará de otro modo la. El artículo de fabricación pueden comprender en forma adicional un segundo o un tercer recipiente que comprende un buffer diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tales como agua bacteriostática para inyección, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación también incluye otro material que puede desearse desde el punto de vista comercial y del usuario que incluyen otros buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

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

[00186] 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.*, CD3soluble). 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.

[00187] En una realización preferida de los métodos de diagnóstico de esta invención, 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 isotiocianato de fluoresceína (se conoce también como fluoroisotiocianato o FITC).

[00188] Un método de uso de los anticuerpos para diagnóstico es la toma de imágenes in vivo del tumor relacionando el anticuerpo con un radiactivo u agente 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.

[00189] Las técnicas in vitro para detección de CD3 son de rutina en la materia e incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISAs), inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), y Análisis por transferencia Western.

[00190] La invención también proporciona 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 pueden 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 the step of 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 recognizing the antigen o una porción thereof 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 pueden usarse para distinguir tejidos cancerosos de tejidos normales.

[00191] 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 metastática, y progresión de la enfermedad o respuesta al tratamiento.

[00192] Las composiciones de esta invención 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 producen de inflamación and trastornos autoinmunes que pueden estar sujetos a diagnóstico y/o tratamiento con el uso de las composiciones y métodos de la invención incluyen, por medio de illustration y no como limitación, esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis, ACV, 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, ischemia de miocardio y lesión pulmonar mediada por leucocitos, aguda.

[00193] Incluso otras indicaciones para diagnóstico y/o uso terapéutico de los anticuerpos y otros agentes terapéuticos de la invención 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 transplante 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 y las células alogénicos 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.

[00194] Los anticuerpos monoclonales para CD3 hechos por los métodos divulgados en este documento puede 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 (CSCs) cumplen una función en el crecimiento y metástasis tumoral (Ghotra, V.P. *et al.* (2009) “*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 o 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) “*Pacreatic 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 Cáncer* 9:202; Scopelliti, A. *et al.* (2009) “*Therapeutic Implications Of Cancer Initiating Cells*,” *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(8):1005-1016; Publicación por PCTWO 2008/091908). Bajo esta hipótesis, los CSCs proveen un subgrupo pequeño distinto de células dentro de cada tumor que son capaces de auto-renovarse indefinidamente y de desarrollarse en 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 o u otras afecciones 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 CSCs pueden surgir de mastocitos de tejido ‘normal’ o de células progenitoras de tejidos más diferenciadas.

[00195] 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 del mastocitos con cáncer. En dichas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 y otros agonistas de CD3, antagonistas y moduladores se usan para identificación, diagnóstico o el 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.

[00196] Luego de haber descrito en general la invención, la misma se comprenderá más ampliamente a través de referencia a los siguientes ejemplos, que se a modo ilustrativo y no pretenden limitar la presente invención salvo que se indique de otro modo.

Ejemplo 1

mAb1 unido a CD3 tanto de humano como de mono macaco

[00197] 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 **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 el 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 CD3 y hCD3 que fue similar al mAb1 quimérico.

Ejemplo 2

Humanización de mAb1

[00198] 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 CDRs se muestran en negrita y subrayados.

[00199] Secuencia de aminoácidos de Variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 1 (SEC ID NRO.:10):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT **ITCSASSSVSYMNWYQKPG** KAPKRLIY**DS**
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYC**QQWSRNPPT**FGGG
TKVEIK

[00200] 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 atcacctgtt ccgccagctc ctccgtgtcc tacatgaact
ggtatcagca gaagcccggc aaggccccca agcggctgat ctacgactcc
tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga ttctccggct ctggctccgg
caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccag gacttcgcc
cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc cccctacctt cggcggaggc accaaggtgg
aatcaag

[00201] Secuencia de aminoácidos de variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 2 (mAb1 LC-2) (SEC ID NRO.:12):

DVVMTQSPAI MSAFPGEKVT **ITCSASSSVSYMNWYQKPG** KAPKRWIY**DS**
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYC**QQWSRNPPT**FGGG

TKVEIK

[00202] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de mAb1 humanizado de cadena variable liviana 2 (SEC ID NRO.:13):

gacgtggtga tgacccagtc tcctgccatc atgagtgctt tcccaggcga
gaaagtgacc attacatgct ctgcttccag ctctgtgtcc tacatgaact
ggatcagca gaagccaggg aaagcaccca agaggtggat ctacgactcc
tccaagctgg cctccggcgt gccaagccgg ttctctggta gtggctcagg
aaccgagttt actctgacca tttccagcct gcagcctgaa gatttcgcaa
catactattg tcagcagtgg tccagaaatc cccctacatt tggcggaggg actaaagtgg
aatcaag

[00203] Secuencia de aminoácidos de la cadena variable pesada de mAb1 humanizada (SEC ID NRO.:14):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RSTMHWVRQA PGQGLEWIGY
INPSSAYTNYNQKFKDRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCASPQ
VHYDYNGFY WGQGLTVTS S

[00204] Secuencia de polinucleósido que codifica la cadena variable pesada de mAb1 humanizada (SEC ID NRO.:15):

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgctc
cgtgaaggtg tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cgtccacca
tgactgggt ggcacaggcc ccaggccagg gactggaatg gatcggtac
atcaaccct ccagcgcta caccaactac aaccagaaat tcaaggaccg
cgtgaccatcacccgacaaagtccaccagcaccgcctacatggaactgt
ctagcctgcgagcgaggacaccgctgtactactgcgcctccccccag
gtgcactacgactacaacggcttcccctactggggccagggcaccctggt
gacagtgtcctcc

Ejemplo 3

Humanización de mAb2

[00205] 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 CDRs se muestran en negrita y subrayados.

[00206] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 1 (h-mAb2 VL-1) (SEC ID NRO.:16):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWFQQ KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTLKTVLG

[00207] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 1 (h-mAb2 VL-1) (SEC ID NRO.:17):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgacctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg gttccagcag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag

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

[00208] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 2 (h-mAb2 VL-2) (**SEC ID NRO.:18**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRTL
IGTNKRAPWTPARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[00209] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 2 (h-mAb2 VL-2) (**SEC ID NRO.:19**):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaa
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaatg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
gggggtacaa aaaaaggccg tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

[00210] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 3 (h-mAb2 VL-3) (**SEC ID NRO.:20**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWFQE KPGQAPRTL
IGTNKRAPWTPARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[00211] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 3 (h-mAb2 VL-3) (**SEC ID NRO.:21**):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaa
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaatg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
gggggtacaa aaaaaggccg tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

[00212] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 4 (h-mAb2 VL-4) (**SEC ID NRO.:22**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRGLI
IGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[00213] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 4 (h-mAb2 VL-4) (**SEC ID NRO.:23**):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaa
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaatg gttccagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc

gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

[00214] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 5 (h-mAb2 VL-5) (**SEC ID NRO.:24**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTLTVLG

[00215] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 5 (h-mAb2 VL-5) (**SEC ID NRO.:25**):

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

[00216] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 6 (h-mAb2 VL-6) (**SEC ID NRO.:26**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTLTVLG

[00217] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 6 (h-mAb2 VL-6) (**SEC ID NRO.:27**):

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

[00218] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 7 (h-mAb2 VL-7) (**SEC ID NRO.:28**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWFQE KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTLTVLG

[00219] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 7 (h-mAb2 VL-7) (**SEC ID NRO.:29**):

caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact

acgccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgac
gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

[00220] 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
GGTTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[00221] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 8 (h-mAb2 VL-8) (**SEC ID NRO.:31**):

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

[00222] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 9 (h-mAb2 VL-9) (**SEC ID NRO.:32**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAFRGLI
GGTTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[00223] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 9 (h-mAb2 VL-9) (**SEC ID NRO.:33**):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcattcag gggcctgac
gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

[00224] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 10 (h-mAb2 VL-10) (**SEC ID NRO.:34**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWFQQ KPDHLFTGLI
GGTTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

[00225] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable liviana de mAb2 humanizado 10 (h-mAb2 VL-10) (**SEC ID NRO.:35**):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac

tgtgaccctg acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact
acgctaattg gttccagcag aagcccgacc acctgttcac tgggctgac
ggcggaacca acaaaagggc tccctggacc cctgcacggc tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

[00226] Secuencia de aminoácidos de Humanized mAb2 Cadena pesada Variant 1 (h-mAb2 VH-1) (**SEC ID NRO.:36**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS

[00227] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 1 (h-mAb2 VH-1) (**SEC ID NRO.:37**):

gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagt ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00228] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 2 (h-mAb2 VH-2) (**SEC ID NRO.:38**):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTTYAMNWVRQAPGKGLEWVGR
IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS

[00229] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 2 (h-mAb2 VH-2) (**SEC ID NRO.:39**):

gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagt ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00230] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 3 (h-mAb2 VH-3) (**SEC ID NRO.:40**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS

[00231] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 3 (h-mAb2 VH-3) (**SEC ID NRO.:41**):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagt ggtggccagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaattttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00232] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 4 (h-mAb2 VH-4) (**SEC ID NRO.:42**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS

[00233] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 4 (h-mAb2 VH-4) (**SEC ID NRO.:43**):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagt ggtggccagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaattttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00234] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 5 (h-mAb2 VH-5) (**SEC ID NRO.:44**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS

[00235] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 5 (h-mAb2 VH-5) (**SEC ID NRO.:45**):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagt ggtggccagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaattttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00236] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 6 (h-mAb2 VH-6) (**SEC ID NRO.:46**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQTL VTVSS

[00237] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 6 (h-mAb2 VH-6) (**SEC ID NRO.:47**):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00238] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 7 (h-mAb2 VH-7) (**SEC ID NRO.:48**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQTL VTVSS

[00239] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 7 (h-mAb2 VH-7) (**SEC ID NRO.:49**):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

[00240] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena pesada de mAb2 humanizada 8 (h-mAb2 VH-8) (**SEC ID NRO.:50**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQTL VTVSS

[00241] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada 8 (h-mAb2 VH-8) (**SEC ID NRO.:51**):

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta
tgaattgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggttgcaagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa

ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactggtgactgtgtcttcc

[00242] Secuencia de aminoácidos de la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada QV (h-mAb2 VL-QV) (SEC ID NRO.:52):

EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSA

[00243] Secuencia de polinucleósido que codifica la variante de cadena variable pesada de mAb2 humanizada QV (h-mAb2 VL-QV) (SEC ID NRO.:53):

gaggtgcagctggtggaaagcggcggaggactggtgcagccaaagggatc
actgaaactgtcctgcgccgcctccggcttcacctttaacacatacgcta
tgaattgggtgcgacaggcacctggcaagggcctggagtgggtggcaagg
atcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaa
ggatagattcacaatcagtcgcgacgattcccagagcattctgtatctgc
agatgaacaatctgaaaactgaagacaccgccatgtactattgtgtgcgg
cacggtaacttcggcaattcttacgtgtcttggtttgcttattggggaca
ggggacactggtgactgtgtcttcc

Ejemplo 4

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

[00244] 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 de 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.

Ejemplo5

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

[00245] 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				
Variant	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

[00246] 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 (CDRs 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 indican que una sustitución de T en la posición de Kabat 46 eliminó la habilidad del anticuerpo de unirse a shCD3.

[00247] 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 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.

[00248] 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 la placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de shCD3 en solución salina con buffer de fosfato) para determinar el impacto de las sustituciones adicionales en la posiciones 36, 38 y 46. Los resultados de este experimento se muestran en **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.

[00249] 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. Dichos anticuerpos were evaluated for binding con el uso del ELISA de captura descrito con anterioridad. Los resultados de estas investigaciones se muestran en la **Figura 7**.

[00250] 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 inferiorpor 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 desinmunizado 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:

[00251] Secuencia de aminoácidos de hVH-6L (**SEC ID NRO.:54**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00252] Secuencia de aminoácidos de hVH-8L (**SEC ID NRO.:55**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00253] 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:

[00254] Secuencia de aminoácidos de hVH-6M (**SEC ID NRO.:72**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00255] Secuencia de polinucleósido que codifica hVH-6M de cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:73**):

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta
tgaattgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggttggaagg
atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa
ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactg gtgactgtgt cttcc

[00256] Secuencia de aminoácidos de hVH-8M (**SEC ID NRO.:74**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRNKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00257] Secuencia de polinucleósido que codifica hVH-8M de cadena variable pesada (**SEC ID NRO.:75**):

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

[00258] Las cadenas pesadas de hVH -8 di-1 y hVH-8 di-2 son particularmente preferidas para para producir anticuerpos que son menos inmunogénicos 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 desinmunizados estarán compuestos con preferencia por cualquiera de cadena pesada hVH-8 di-1 o cadena pesada de 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 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.

[00259] Secuencia de aminoácidos de hXR32VH-8 di-1 (**SEC ID NRO.:56**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00260] Secuencia de aminoácidos de hXR32VH-8 di-2 (**SEC ID NRO.:57**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00261] 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.

[00262] 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:

[00263] La secuencia de aminoácidos de la variante “**a**” (I51T Y52cA) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:76**):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TASKANNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

[00264] La secuencia de aminoácidos de la variante “**b**” (I51T N54S) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:77**):

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

[00265] La secuencia de aminoácidos de la variante “**c**” (I51T A56T) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (**SEC ID NRO.:78**):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYTT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00266] La secuencia de aminoácidos de la variante “**d**” (I51T Y52cA N54S) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:79):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANS^YAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00267] La secuencia de aminoácidos de la variante “**e**” (I51T N54S A56T) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:80):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNS^YTT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00268] La secuencia de aminoácidos de la variante “**f**” (I51T Y52cA N54S A56T) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:81):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANS^YTT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00269] La secuencia de aminoácidos de la variante “**g**” (I51T D61A) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:82):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYAT YYAASVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00270] La secuencia de aminoácidos de la variante “**h**” (I51T D65G) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:83):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00271] La secuencia de aminoácidos de la variante “**i**” (I51T Y52cA N54S D61A) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:84):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANS^YAT YYAASVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00272] La secuencia de aminoácidos de la variante “**j**” (I51T Y52cA N54S D65G) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:85):

EVKLLES^{GGG} LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
TRSKANS^YAT YYADSVKGRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT^L VTVSA

[00273] La secuencia de aminoácidos de la variante “**k**” (I51T Y52cA N54S D61A D65G) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:86):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGGLEWVAR
TRSKANSYAT YYAASVKGRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

[00274] La secuencia de aminoácidos de la variante “**2k**” (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-A49G V93A)) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:87):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGGLEWGR
TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00275] La secuencia de aminoácidos de la variante “**5k**” (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal humanizado mAb2 (SEC ID NRO.:88):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGGLEWAR
TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

[00276] Todas dichas variantes humanizadas adicionales del anticuerpo monoclonal murino mAb2 de cadena variable pesada puede emplearse para formar los anticuerpos desinmunizados de la presente invención. Dichos anticuerpos humanizados y desinmunizados adicionales estarán compuestos 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 diacuerpos) 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 reducida inmunogenicidad con relación a sus respectivos polipéptidos progenitores.

[00277] La invención en particular se refiere a anticuerpos humanizados y desinmunizados compuestos por cadena pesada de hVH-8 y cadena liviana de VL-6. La invención 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 invención 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

[00278] 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 (CD3soluble) (either human o mono macaco)y se incubaron en la presencia de varias concentraciones of anticuerpo. Los resultados de este experimento se muestran en **Figuras 8A y 8B**, y revelan que mAb2 y su variante inmunizada exhibió unión equivalente a CD3 soluble humano y a CD3 soluble de mono macaco.

Ejemplo 7

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

[00279] Con el fin de cuantificar el grado de unión entre mAb2 y CD3 de humano o mono macaco, se condujeron análisis BIACORE™. El análisis BIACORE™ mide la desviación de disociación, k_d . La afinidad de unión (K_D) entre un anticuerpo y su blanco es una función de constantes cinéticas para asociación (índice on, k_a) y disociación (índice off, 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 disociaciónse midió y una curva bivalente de los datos se condujo. 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

Ejemplo 8

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

[00280] Los CDRs de mAb2 humanizados (h-mAb2) se usaron para producir una serie de diacuerpos DART™ que tienen un primer sitio de unión al epítipo y un segundo sitio de unión al epítipo 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

[00281] 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 coi están subrayadas) (**SEC ID NRO.:58**):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI
GGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVF
GGGTKLTVLGGGGSGGGGQVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDT
YIHVWKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQ
VSRLTSEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSSGGCGGGKVAALK
EKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[00282] Secuencia de aminoácidos de Her2VL-hXR32VH-Kcoil 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 sequence están subrayadas) (**SEC ID NRO.:59**):

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS
ASFRYTGVDPD RFTGNRSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYTTPPTFGG
GTKLEIKRAGGGSGGGGEVQ LVESGGGLVQ PGGSLRLSCA ASGFTFNTYA
MNWVRQAPGK GLEWVARIRS KYNNYATYYA DSVKDRFTIS RDDSKNSLYL
QMNSLKTEDT AVYYCVRHGN FGNSYVSWFA YWGQGTLLTV SSGGCGGGEV
AALEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEK

diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2

[00283] Secuencia de aminoácidos de theCD19VL-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
LIYDASNLSV GIPPRFSGSG SGTDFTLNIH PVEKVDAATY HCQQSTEDPW
TFGGGTKLEI KGGSGGGGE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFNT
YAMNWRQAP GKGLEWVARI RSKYNNYATY YADSVKDRFT ISRDDSKNSL
YLQMNSLKTE DTAVYYCVRH GNFGNSYVSW FAYWGQGTLLV TVSSGGCGGG
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEK

[00284] 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
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQQSGAELV RPSGVKISC KASGYAFSSY
WMNVWKQRPQ QGLEWIGQIW PGDGDNTYNG KFKGKATLTA DESSTAYMQ
LSSLASEDSA VYFCARRETT TVGRYYYAMD YWGQGTTVTV SSGGCGGGKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE VAALKE

ERBITUX™-h-mAb2 diacuerpo DART™

[00285] 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 EGRFVH y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:62**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLKQSGPGLV QPSQSLSITC TVSGFSLTNY
GVHWVRQSPG KGLEWLGVIW SGGNTDYNTF FTSRLSINKD NSKSQVFFKM
NSLQSNDAI YYCARALTYD DYEFAWVGQ TLVTVSSGGCGGGEVAALEK
EVAALEKEVA ALEKEVALE K

[00286] 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
GTKLELKGGGSGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN
WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

[00287] Dichos diacuerpos DART™ se encontraron que son capaces de unirse a CD3 un mono macaco (**Figuras 10A-10C**).

[00288] Los CDRs de mAb2 humanizados (h-mAb2) se usaron para producir una serie adicional de diacuerpos DART™ que tienen un primer sitio de unión al epítipo y un segundo sitio de unión al epítipo 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

[00289] 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 LSASVGDRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIKGGGSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFNTYAM
NWRQAPGKG LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ
MNSLKTEDTA VYYCVRHGNF GNSYVSWFAY WQGTLVTVS SGCGGGEVA
ALEKEVALE KEVAALEKEV AALEK

[00290] Secuencia de aminoácidos de hXR32VL-hBRCA69DVH-K coil del diacuerpo DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (las ligaduras entre la secuencia hXR32VL and la secuencia hBRCA69DVH entre la secuencia hBRCA69DVH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:65**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI

GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTT~~TVSSGGCGGGKVAALK~~
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

diacuerpo DART™ B7-H3-2-h-mAb2

[00291] 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 hXR32VH sequence y la secuencia de E coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:66**):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVIT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYS~~GVPS~~ RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKGGGSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLRLSCAA SGFTFNTYAM
NWRQAPGKG LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ
MNSLKTEDTA VYYCVRHGNF GNSYVSWFAY WGQGT~~LVTVS~~ SGGCGGGEVA
ALEKEVAALKE KEVAALKEKV AALEK

[00292] 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 la secuencia hBRCA84DVH y la secuencia K coil están subrayadas) (**SEC ID NRO.:67**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF
GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTT~~TVTVSS~~ GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

[00293] 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)

Los Diacuerpos Específicos para HER2/neu y CD3 Median potente matanza de células T dirigida

[00294] 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 al antígeno 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 matanza de la célula tumoral en un proceso denominado en este documento matanza “redirigida”.

[00295] El diacuerpo reactivo de redireccionamiento por afinidad dual (DART™) específico para HER2/neu y CD3 se construye que tiene 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 NRO.s: 58-59**).

[00296] Con el fin de demostrar la capacidad de los diacuerpos DART™ de mediar dicha matanza 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 (LDH Assay). Los resultados de estas investigaciones demuestran la capacidad del diacuerpo DART™ HER2/neu x CD3 para mediar la matanza redirigida de células tumorales.

Ejemplo 10

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

[00297] 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.

[00298] Los pacientes elegibles se asignan en forma aleatoria a un grupo de control y un anticuerpo anti-CD3 humanizado (N297Q) como grupos de tratamiento (que comprende h-mab2 VH-8 y h-mab2 VL-6). 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 pre-tratamiento a IGTT. Los pacientes en ambos grupos se hospitalizan para recibir o bien un tratamiento de 6 días de anticuerpo monoclonal anti-CD3 humanizado (N297Q) o placebo. El anticuerpo se administra por vía intravenosa en la siguiente dosificación: 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 y 6. En forma alternativa, el anticuerpo puede administrarse vía intravenosa en la siguiente dosificación: 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 1; 3,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 2; 6,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 3; 13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 4; y 26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ los días 5 through 14. En los estudios de aumento de la dosis, el tratamiento puede ser, *por ej.*, 1,42 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 1; 5,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 2; 11 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 3; 26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 4; y 45,4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ los días 5 through 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 1; 13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 2, y 26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ los días 3 y 4.; durante los estudios adicionales de aumento de la dosis, el tratamiento puede ser 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 1; 16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ el día 2; y 32 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ los días 3 y 4.

[00299] 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 disminuyen el tiempo de administración y/o separan la dosificación en 2 a 4 partes iguales que se administrarán como inyección en bolos distribuida en forma pareja con 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).

[00300] 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 permitió que los pacientes tengan una dieta normal, y permanezcan bajo el cuidado de su médico personal mientras duraba 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.

[00301] 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 el 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 glicosiladas se miden por el test de inhibición por aglutinación de látex.

[00302] Monitoreo inmunológico: El nivel de autoanticuerpos contra GAD65, IA2/ICA512, e insulina se miden con ensayos de radio unión como se conoce en la materia (*por ej.*, Woo et al., 2000, J. Immunol Métodos 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 unión de anti-CD3-FITC a la cadena CD3 de TCR.

[00303] Análisis estadísticos: 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 glicosinada. 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 Matanza potente promedio de células T dirigida

[00304] 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 y 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 4Ig-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 a 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).

[00305] 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™ se comparó con hBRCA84D-2 de Cadena liviana y hBRCA84D-2 de Cadena pesada (**SEC ID NRO.s. 64-65**).

[00306] Dichos diacuerpos DART™ tienen la capacidad de localizar una célula T (al unir dicha célula T a la porción que se une al antígeno de un diacuerpo DART™ que se une a CD3) en la ubicación de una célula tumoral (al unir dicha célula con el B7H3 binding portion del diacuerpo DART™). La célula T localizada puede mediar entonces la matanza de la célula tumoral por medio del proceso de matanza “redirigida”.

[00307] Con el fin de demostrar la capacidad de dichos diacuerpos DART™ de mediar dicha matanza 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 (LDH Assay). 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

[00308] 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**):

DVVMQTPTFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRFS GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN
TYAMNWRQA PGKGLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS
LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSSGGCGG
GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEK

[00309] 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**):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV KLDDETGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY
WMNWRQSPE KGLEWVAQIR NKPYNYETYY SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY
LQMNNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCGGKVAALKEK
VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[00310] Los resultados de estas investigaciones (**Figuras 11A-11B**) demuestran la capacidad de los the Diacuerpos CD3 DART™ B7H3 x para mediar la matanza redirigida a células de tumor que expresan B7H3.

Ejemplo 12

**Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s) Diacuerpos Específicos para A33 y CD3
Median la potente matanza de células T dirigida**

[00311] Los reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™), Diacuerpos Específicos 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).

[00312] Dichos diacuerpos DART™ tienen la capacidad de localizar una célula T (al unir dicha célula T a la porción que se une al antígeno 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 matanza de la célula tumoral por medio de the process of matanza “redirigida”.

[00313] La porción que se une a CD3 de dichos diacuerpos DART™ se comparó con 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™ se comparó con el anticuerpo RECA47.

Diacuerpo DART™A33-h-mAb2

[00314] 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 MSASPGERV MTCSARSSIS FMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
SNLASGVPVR FSGSGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYCQQW SSYPLTFGSG
TKLELKRGGGGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN
WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

[00315] 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 ALWYSNLWFW
GGGTLKTLVLG GGGSGGGGQV QLQQSGPELV KPGASVKISC KASGYTFSGS
WMNWVKQRPQ QGLEWIGRIY PGDGETNYNG KFKDKATLTA DKSSTTAYME
LSSLTSVDSA VYFCARIYGN NVYFDVWGAG TTVTVSSGGCGGGGEVAALEK
EVAALEKEVA ALEKEVALE K

[00316] Con el fin de demostrar la capacidad de dichos diacuerpos DART™ de mediar dicha matanza redirigida decélulas cancerosas, el diacuerpo DART™ se incubó aent 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 (Ensy LDH). Los resultados de estas investigaciones (**Figuras 12A-12E**) demuestran la capacidad de A33 x Diacuerpos DART™ CD3 para mediar la matanza redirigida a células de tumor que expresan A33.

Ejemplo 13

Reactivos de reorientación de afinidad dual (DART™s) Diacuerpos Específicos para CD3 hacen que la matanza mediada por células T redirigidas sea equivalente a la de otros diacuerpos de CD3 específicos de los humanos

[00317] Con el fin de evaluar en forma adicional los diacuerpos reactivos específicos de CD3 de reorientación de afinidad dual (DART™) de la presente invención, la capacidad del antes mencionado diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 para producir la matanza mediada por las células T redirigidas wcomo cuando se compara con el del diacuerpo CD19 x CD3 DART deof 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 of Moore, P.A. *et al.* (2011)) exhibe especificidad sólo por CD3 humano.

[00318] De acuerdo con lo anterior, Células de 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) “*Demostración de 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 Caracterización de 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 and 13B**) reveló que el diacuerpo CD19-h-mAb2 DART™ de la presente invención causan matanza 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 habilidad del diacuerpo DART™ para mediar la matanza redirigida.

Ejemplo 14

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

[00319] La capacidad del antes mencionado diacuerpo DART™ CD19-h-mAb2 para producir la matanza mediada por las células T redirigidas en la presencia de humano o mono macaco se investigó.

[00320] Células de cáncer de folon 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 de humanos o 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

[00321] Con el fin de demostrar que el material dirigido observado mediado por los Diacuerpos DART™ CD3 de la presente invención fue específico, se determinó el grado de matanza en presencia y ausencia células de destino.

[00322] Se incubaron PMBCs humanas en la 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 Tumores*,” J. Natl. Cáncer Inst. 51:1417-1423; Fogh, J. (1978) “*Cultivation, Characterization, and Identification Of Human Tumor Cells Con Emphasis On Kidney, Testis And Bladder Tumores*,” Natl. Cáncer Inst. Monogr. 49:5-9).

[00323] 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 hepatopoyéticos, que incluyen neutrófilos después de la estimulación (Atzenia, F. *et al.* (2002) “*Induction Of CD69 Activation Molecule On Human Neutrófilos by GM-CSF, IFN-γ, y 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) como medio para evaluar a means for assessing immune system activation (véase, *por ej.*, Ampel, N.M. *et al.* (2002) “*In Vitro Whole-Blood Analysis of Cellular Immunity In Patients With Active Coccidioidomycosis Using de the Antigen Preparation T27K*,” Clinical Diagnostic Laboratory Immunology 9(5):1039-1043).

[00324] 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 invención 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

Matanza re dirigida por diacuerpos DART™ de Mono macaco humanos / con reacción cruzada

[00325] Para demostrar en forma adicional habilidad del diacuerpos DART™ de la presente invención para mediar la matanza redirigida, células de destino 498 de cáncer de riñón o células de carcinoma epidermoide A431 (Lee, C.M. *et al.* (2010) “*The Distribution Of Monoclonal*

Therapeutic Antibodies Cetuximab And Trastuzumab Within Solid Tumors,” BMC Cancer10:255; pages 1-11; Bryant, J.A. *et al.* (2004) “EGFActivates Intracellular And Intercellular Calcium Signaling By Distinct Pathways In Tumor Cells,” Cáncer Biol. Ther. 3(12):1243-1249) y el grado de matanza dirigida mediada por varios diacuerpos DART™ en la presencia de células efectoras PMBC (E:T = 30:1) se determinó.

[00326] 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 matanza dirigida se evaluó midiendo el % de citotoxicidad.

[00327] Los resultados de esta investigación se muestran en las **Figuras 16A-16D**. Se encontró que los diacuerpos que tienen por CD3 y EGFR son capaces de unirse a células A498 o A431 (**Figura 16A** y **16C**, respectivamente), y mediar la matanza redirigida de estas células (**Figura 16B** y **16D**, respectivamente).

[00328] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta memoria descriptiva están incorporadas en este documento con referencia al mismo punto que si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente como incorporada a modo de referencia en su totalidad. Mientras que la invención se ha descrito en conexión con sus realizaciones específicas, se comprenderá que se pueden realizar modificaciones adicionales y esta Solicitud intenta cubrir muchas variaciones, usos, adaptaciones de la invención que sigue, en general, los principios de la invención y que incluyen dichas partidas de la presente divulgación como dentro de la práctica usual y conocida del arte al cual la invención pertenece y como puede aplicarse a las características esenciales en este documento mencionado con anterioridad.

REIVINDICACIONES

Reivindicación 1. Una molécula que se une a CD3 que comprende un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo, en donde dicho fragmento que se une al antígeno comprende un dominio VL específico de CD3 del anticuerpo y un dominio VH específico de CD3 del anticuerpo, en donde dicho dominio VL específico de CD3 y dicho dominio VH específico de CD3 forman un dominio de unión al antígeno capaces de lograr la unión en forma inmuno-específica a ambos un epítipo de CD3 humano y a un epítipo del CD3 de un mamífero no humano, en donde:

- (I) dicho dominio VL específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab2 VL-1 (**SEC ID NRO.:16**), h-mab2 VL-2 (**SEC ID NRO.:18**), h-mab2 VL-3 (**SEC ID NRO.:20**), h-mab2 VL-4 (**SEC ID NRO.:22**), h-mab2 VL-5 (**SEC ID NRO.:24**), h-mab2 VL-6 (**SEC ID NRO.:26**), h-mab2 VL-7 (**SEC ID NRO.:28**), h-mab2 VL-8 (**SEC ID NRO.:30**), h-mab2 VL-9 (**SEC ID NRO.:32**), y h-mab2 VL-10 (**SEC ID NRO.:34**), y dicho dominio VH específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab2 VH-1 (**SEC ID NRO.:36**), h-mab2 VH-2 (**SEC ID NRO.:38**), h-mab2 VH-3 (**SEC ID NRO.:40**), h-mab2 VH-4 (**SEC ID NRO.:42**), h-mab2 VH-5 (**SEC ID NRO.:44**), h-mab2 VH-6 (**SEC ID NRO.:46**), h-mab2 VH-6L (**SEC ID NRO.:54**), h-mab2 VH-7 (**SEC ID NRO.:48**), h-mab2 VH-8 (**SEC ID NRO.:50**), h-mab2 VH-8L (**SEC ID NRO.:55**), h-mab2VH-8 di-1 (**SEC ID NRO.:56**), h-mab2 VH-8 di-2 (**SEC ID NRO.:57**), h-mab2 VH-6M (**SEC ID NRO.:72**), h-mab2 VH-8M (**SEC ID NRO.:74**), h-mab2 VH-2k (**SEC ID NRO.:87**), y h-mab2 VH-5k (**SEC ID NRO.:88**); o
- (II) dicho dominio VL específico de CD3 se selecciona del grupo que consiste en h-mab1 VL-1 (**SEC ID NRO.:10**) and h-mab1 VL-2 (**SEC ID NRO.:12**), y dicho dominio VH específico de CD3 es h-mab1 VH (**SEC ID NRO.:14**).

Reivindicación 2. La molécula que se une a CD3 de la reivindicación 1, en donde dicho dominio VL específico de CD3 es h-mab2 VL-6 (**SEC ID NRO.:26**).

Reivindicación 3. La molécula que se une a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho dominio VH específico de CD3 es h-mab2 VH-8 (**SEC ID NRO.:50**), h-mab2 VH-4 (**SEC ID NRO.:42**), o h-mab2 VH-2k (**SEC ID NRO.:87**).

Reivindicación 4. La molécula que se une a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha molécula es un anticuerpo.

Reivindicación 5 El anticuerpo que se une a CD3 de la reivindicación 4, en donde dicho 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 of dicho anticuerpo de unirse a un receptor de Fc;

en donde dicha reducción en la función efectora y dicho daño de la capacidad de unión es con relación a la de un receptor de Fc tipo salvaje.

Reivindicación 6. La molécula que se une a CD3 de 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:

I. dicha 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 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
- (iii) un dominio (C);

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

y

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

- (i) un dominio (D) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de dicha segunda inmunoglobulina (VL2);
- (ii) un dominio (E) que comprende dicho segundo 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 al epítotope; y

en donde:

- (1) dichos dominios (A) y (E) se asocian para formar dicho dominio que se une 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) dichos dominios (B) y (D) se asocian para formar un sitio de unión que se une en forma inmuno-específica a un segundo epítotope, dicho segundo epítotope es diferente del epítotope CD3 unido por el dominio de unión al 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.

Reivindicación 7. El diacuerpo que se une a CD3 de la reivindicación 6, en donde dicho segundo epítotope no es un epítotope de CD3.

Reivindicación 8. El diacuerpo que se une a CD3 de la reivindicación 6, en donde dicho 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 dicha asociación de dichos dominios (A) y (E).

Reivindicación 9. La molécula que se une a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 4-5, o el diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-8 que está inmunizado.

Reivindicación 10. La molécula que se une a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 o el diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-9 que es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y a fluoresceína.

Reivindicación 11. La molécula que se une a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 o el diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que 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 una célula, receptor o ligando del receptor.

Reivindicación 12. La molécula que se une a CD3 o diacuerpo de la reivindicación 11, en donde dicha 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 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 vesícula, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, glioblastoma, cáncer de tiroides, linfoma, mieloma y leucemia.

Reivindicación 13. La molécula que se une a CD3 o diacuerpo de la reivindicación 11, en donde dicha molécula o diacuerpo es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y un antígeno de superficie de una célula, receptor o ligando del receptor, en donde dicho 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 una célula T o activación de células B en una respuesta inmunológica adaptativa.

Reivindicación 14. La molécula que se une a CD3 o diacuerpo de la reivindicación 13, en donde dicha molécula o diacuerpo es capaz de lograr la unión en forma inmuno-específica a CD3 y a una molécula involucrada en dicha asociación célula T – célula B y 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.

Reivindicación 15. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se une a CD3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9-14, el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 4-5 , o el diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-14 , y un vehículo, excipiente o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Reivindicación 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, para usar en el tratamiento del cáncer o una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

Reivindicación 17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionado 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 soriática, asma, rinitis alérgica, efectos del transplante de órganos, o enfermedad de huésped vs. injerto (GVHD).

Reivindicación 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, para usar en el tratamiento de diabetes dependiente de la insulina tipo I.

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE:

La presente invención 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 alteraciones.

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 version 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 tgacccagtc ccccgccatc atgtccgcct tccccggcga gaaagtgaca 60

atgacctgct ccgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagtccggc 120

acctccccca agcgggtggat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga 180

ttctctggct ccggctccgg caccagctac tccctgacca tctcctccat ggaaaccgag 240

gacgccgcca cctactactg ccagcagtgg tcccgggaacc cccctacctt 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

cagggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgccctc cgtgaagatg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cgggtccacca tgcactgggt gaaacagcgg 120
 cctggacagg gcctggaatg gatcggctac atcaaccctt ccagcgccta caccaactac 180
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccaccctg accgccgaca agtcctccag caccgcctac 240
 atgcagctgt cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcgc ctccccccag 300
 gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggg gacagtgtcc 360
 tcc 363

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

<400> 5

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 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 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 gccggaacca 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 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> 8
<211> 375
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 8
gaggtgaagc tgctggaaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc actgaaactg 60
tcctgcgccg cctccggctt cacctttaac acatacgcta 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> 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	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				85					90					95		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
			100					105					110			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
		115					120					125				
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
	130					135					140					
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
145					150					155					160	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
				165					170					175		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
			180					185					190			
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
		195					200					205				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
	210					215										

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de mAb1 variable humanizado de cadena liviana
 Variante 1

<400> 10

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 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 Leu 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> 11
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
 Variante 1

<400> 11
 gacatccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgcct ctgtgggcga cagagtgaca 60
 atcacctgtt ccgccagctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagcccggc 120
 aaggccccca agcggctgat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180
 ttctccggct ctggctccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccagag 240
 gacttcgcca cctactactg ccagcagtgg tcccgggaacc cccctacctt cggcggaggc 300
 accaaggtgg aaatcaag 318

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

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de mAb1 variable humanizado de cadena liviana
 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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
Variante 1

<400> 13
gacgtggtga tgaccagtc tcctgccatc atgagtgctt tcccaggcga gaaagtgacc 60
attacatgct ctgcttccag ctctgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagccaggg 120
aaagcaccca agaggtggat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gccaagccgg 180
ttctctggta gtggctcagg aaccgagttt actctgacca tttccagcct gcagcctgaa 240
gatttcgcaa catactattg tcagcagtgg tccagaaatc cccctacatt tggcggaggg 300
actaaagtgg aaatcaag 318

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

<220>
<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb1 Variable Heavy Chain

<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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
Cadena cadena

<400> 15
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cgggtccacca tgcactgggt gcgacaggcc 120
ccaggccagg gactggaatg gatcggctac atcaaccctt ccagcgccta caccaactac 180
aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc accgccgaca agtccaccag caccgcctac 240
atggaactgt ctagcctgcg 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 mAb2 humanizado variable Variante 1
(h-mAb2 VL-1)

<400> 16
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 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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
Variante 1 (h-mAb2 VL-1)

<400> 17
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccagcag 120

```

aagccaggac aggcaccaag gaccctgac gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc      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 mAb2 humanizado variable Variante 2
      (h-mAb2 VL-2)

```

```

<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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena
      variable liviana
      Variante 2 (h-mAb2 VL-2)

```

```

<400> 19
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gaccctgac gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc      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 mAb2 humanizado variable Variante 3
(h-mAb2 VL-3)

<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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena
variable liviana
Variante 3 (h-mAb2 VL-3)

<400> 21
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccaggag 120
aagccaggac aggcaccaag gaccctgata gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 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 mAb2 humanizado variable Variante 4
(h-mAb2 VL-4)

<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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
Variante 4 (h-mAb2 VL-4)

<400> 23
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggg atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado variable Variante 5
(h-mAb2 VL-5)

<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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
 Variante 5 (h-mAb2 VL-2)

 <400> 25
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120
 aagccaggac aggcaccaag gaccctgata ggggggtacaa acaaaaagggc tccctggacc 180
 cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggg atagcaatct gtgggtgttc 300
 ggggggtggc caaaactgac tgtgctggga 330

 <210> 26
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado variable Variante 6
 (h-mAb2 VL-6)

 <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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
 Variante 6 (h-mAb2 VL-6)

 <400> 27
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgata ggggggtacaa acaaaaagggc tccctggacc 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 mAb2 humanizado variable 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
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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena
variable liviana
Variante 7 (h-mAb2 VL-7)

<400> 29
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccaggag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 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 mAb2 humanizado variable 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
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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana

Variante 8 (h-mAb2 VL-8)

<400> 31

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgata ggggggtacaa 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 mAb2 humanizado variable 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

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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
Variante 9 (h-mAb2 VL-9)

<400> 33
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120
aagccaggac aggcattcag gggcctgata ggggggtacaa 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 mAb2 humanizado variable 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
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica mAb2 humanizado de cadena variable liviana
 Variante 10 (h-mAb2 VL-10)

<400> 35
 caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
 acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact acgctaattg gttccagcag 120
 aagccccgacc acctgttcac tgggctgata ggcggaacca acaaaagggc tccctggacc 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 mAb2 humanizado de cadena pesada1
 (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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable pesado
 Variante 1 (h-mAb2 VH-1)

<400> 37
 gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120

cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaattttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta 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 mAb2 humanizado de cadena pesada2
(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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
pesado Variante 2 (h-mAb2 VH-2)

<400> 39

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc cagggtggcag cctgcgactg 60
tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120
cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaattttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgcaaga 300
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360

gtgaccgtgt ccagc375

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado de cadena pesada3 (h-mAb2 VH-3)

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

202530

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

354045

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

505560

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65707580

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

859095

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100105110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115120125

<210> 41

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable pesado Variante 3 (h-mAb2 VH-3)

<400> 41

gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg

60

tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct

120

cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc

180

tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt

240

ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgttacta ttgtgcaaga

300

cacggaaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg

360

gtgaccgtgt ccagc

375

<210> 42

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado de cadena pesada4

117

(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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
pesado

Variante 4 (h-mAb2 VH-4)

<400> 43

gagggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctgggtgcagc cagggtggcag cctgcgactg 60
tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120
cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
tactatgccg actcagtga gtagatgattc acaattttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga 300
cacggaaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 44

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado de cadena pesada5
(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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
pesado
Variante 5 (h-mAb2 VH-5)

<400> 45
gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120
cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgttacta ttgtgcaaga 300
cacggaaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
gtgaccgtgt ccagc 375

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

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado de cadena pesada6
(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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
pesado
Variante 6 (h-mAb2 VH-6)

<400> 47
gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120
cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
tactatgccg actcagtga gtagatgattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240
ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga 300
cacggaaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360
gtgaccgtgt ccagc 375

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

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado de cadena pesada7
(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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
 pesado
 Variante 7 (h-mAb2 VH-7)

 <400> 49
 gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60
 tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120
 cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180
 tactatgccg actcagtgaa 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 mAb2 humanizado de cadena pesada8
 (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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
 pesado

Variante 8 (h-mAb2 VH-8)

```
<400> 51
gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctggaggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta tgaattgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcaagg atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc      180
tactatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca      240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga      300
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attgggggaca ggggacactg      360
gtgactgtgt cttcc      375
```

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

```
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de mAb2 humanizado variable Heavy Chain
      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 polinucleótido que codifica mAb2 humanizado variable
pesado
      Variante QV (h-mAb2 VL-QV)
```

```
<400> 53
gagggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctgggtgcagc caaagggatc actgaaactg      60
tcctgcgccg cctccggctt cacctttaac acatacgcta tgaattgggt gcgacaggca      120
cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg atcagggtcca 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> Amino acid sequence of 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> Amino acid sequence of hVH-8L

<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> Amino acid sequence of 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

<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 de 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

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 de Her2VL-hXR32VH-K coil

 <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 de CD19VL-hXR32VH-E coil

<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 de hXR32VL-CD19VH-K coil

<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 de hXR32VL-EGFRVH-E coil

<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 de EGFRVL-hXR32VH-K coil															
<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	

[illegible]

```
<210> 64
<211> 275
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

```
<220>
<223>  Secuencia de aminoácidos de  hBRCA69DVL-hXR32VH-E coil
<400>  64
```

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

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 de hXR32VL-hBRCA69DVH-K coil
 <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
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 de hBRCA84DVL-hXR32VH-E coil

 <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 de hXR32VL-hBRCA84DVH-K coil
 <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 de 4420VL-hXR32VH-E coil
 <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 de hXR32VL-4420VH-K coil															
<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 de 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

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 de hXR32VL-RECA47VH-E coil

 <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

 <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> Polynucleotide Sequence Encoding hVH-6M Variable Heavy Chain

<400> 73	
gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctggaggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta tgaattgggt ccgccaggct	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggttgggaagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc	180
gagtatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca	240
ctgtatctgc aaatgaacag 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

<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> Polynucleotide Sequence Encoding hVH-8M Variable Heavy Chain

<400> 75
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggaggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta tgaattgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcaagg atcaggaaca agtacaacaa ttatgcaacc 180
gagtatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga 300
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360
gtgactgtgt cttcc 375

<210> 76
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de Variante "a" (I51T Y52cA) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<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 Variante "b" (I51T N54S) de mAb2 humanizado		
	cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino		
<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		
<220>			
<223>	Secuencia de aminoácidos de Variante "c" (I51T A56T) de mAb2 humanizado		
	cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino		
<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 Variante "d" (I51T Y52CA N54S)de mAb2 cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino 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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de Variante "e" (I51T N54S A56T) mAb2 cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino 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 Variante "f" (I51T Y52cA N54S A56T)
de mAb2 de cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino
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

<210> 82
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de Variante "g" (I51T D61A) de mAb2
humanizado
cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino

<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 Variante "h" (I51T D65G) de mAb2
humanizado
cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino

<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 Variante "i" (I51T Y52cA N54S D61A) de
mAb2 cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino 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

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Variante "j" (I51T Y52cA N54S D65G) de mAb2 cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino 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 Variante "k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G) de mAb2 cadena pesada variable de anticuerpo monoclonal de murino 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		
<212> PRT		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> Secuencia de aminoácidos de Variante "2k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-A49G V93A)) de anticuerpo mAb2 humanizado murino monoclonal variable de cadena pesada		
<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 Variante "5k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) de mAb2 humanizado de murino, anticuerpo moclonal de cadena pesada variable		
<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			

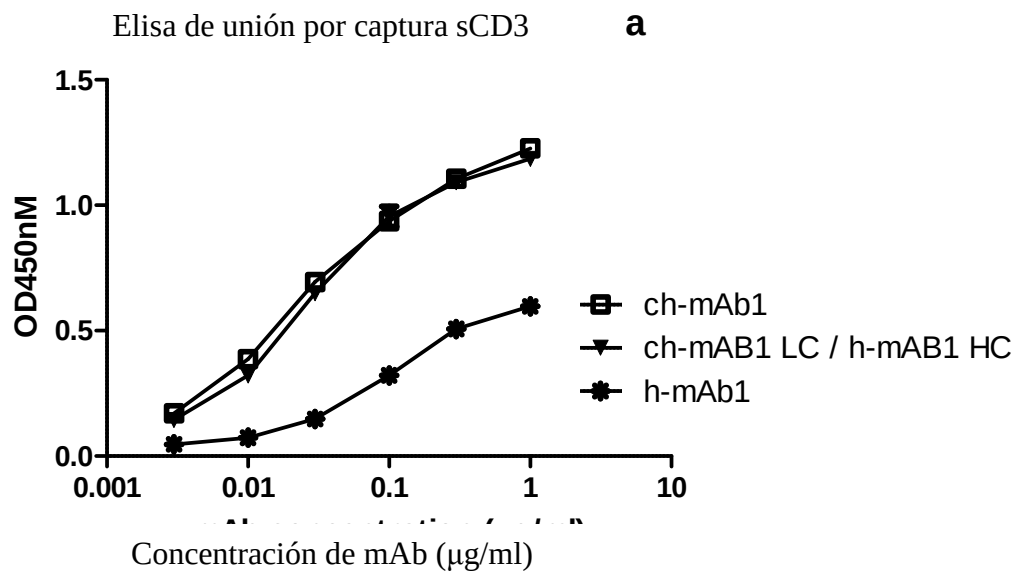


Figura 1A

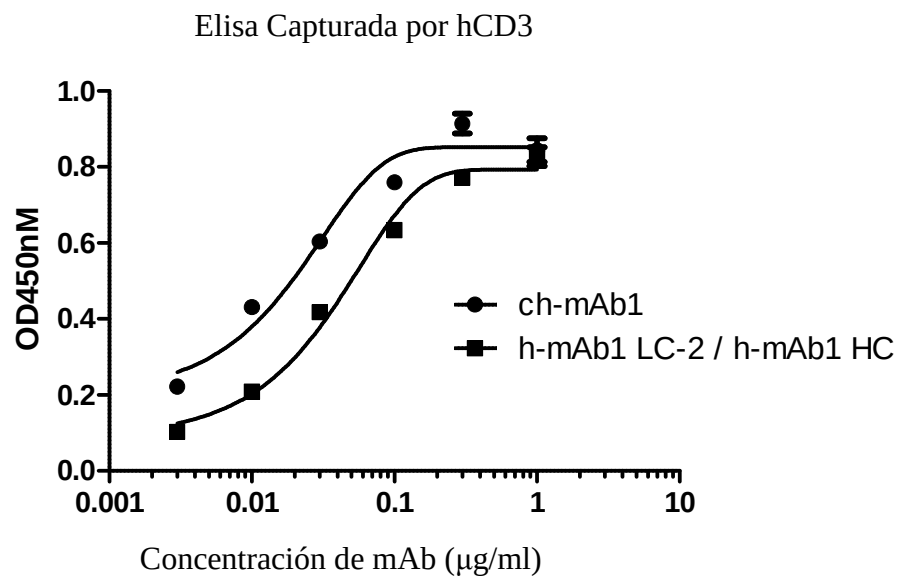


Figura 1B

Elisa Capturada con cynoCD3

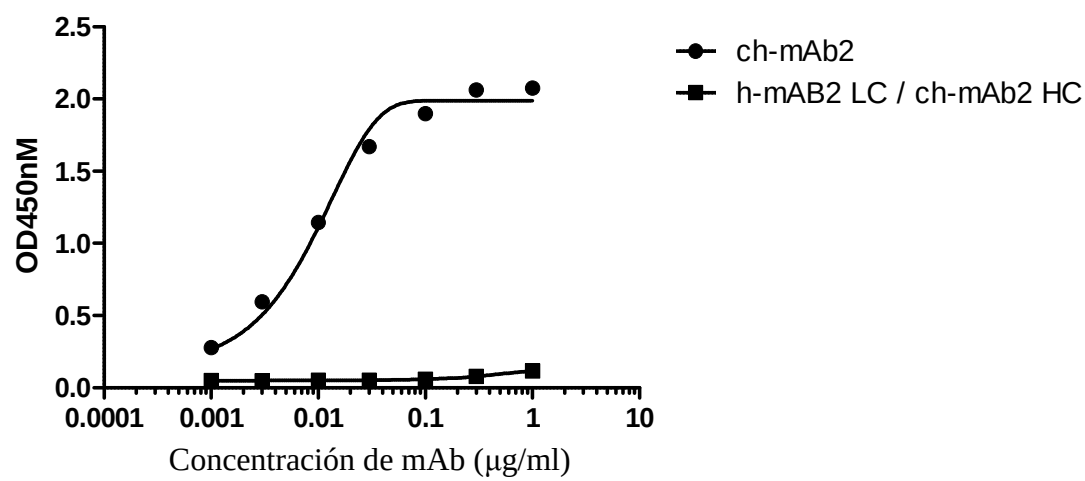


Figura 2A

Elisa Capturada con cynoCD3

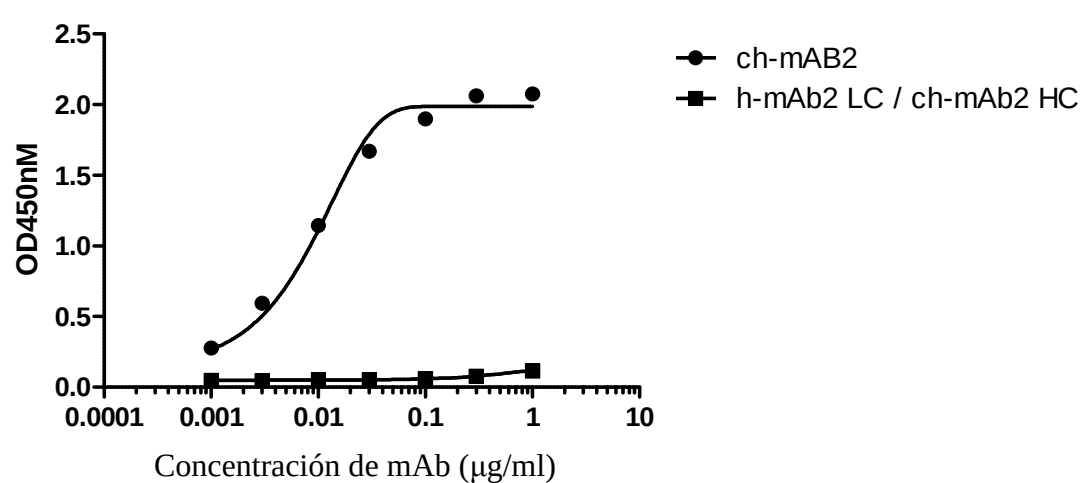


Figura 2B

Elisa capturada con hCD3

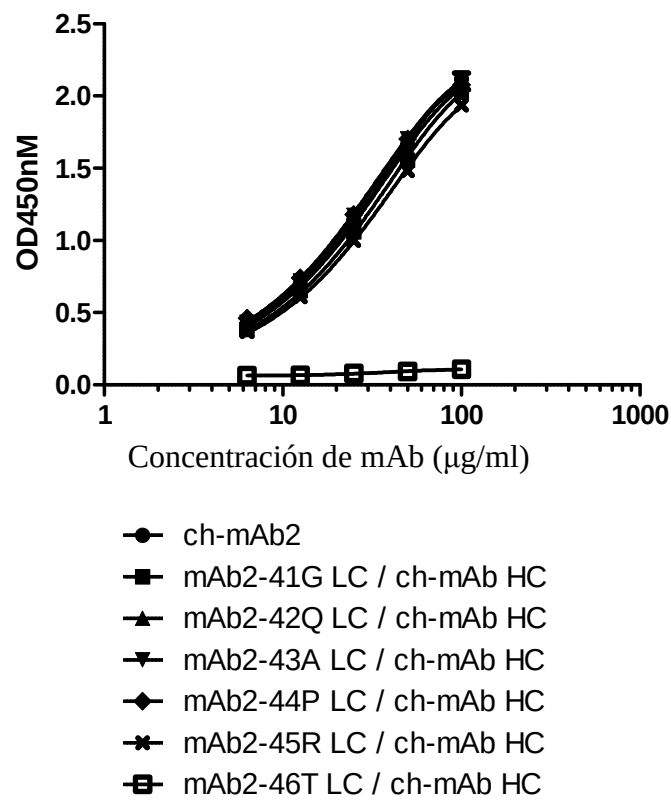


Figura 3

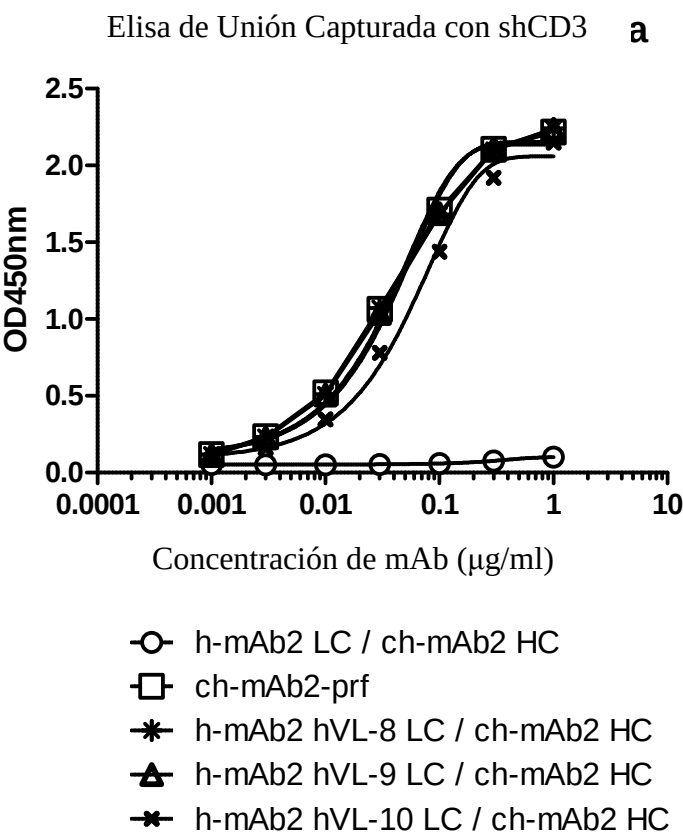


Figura 4

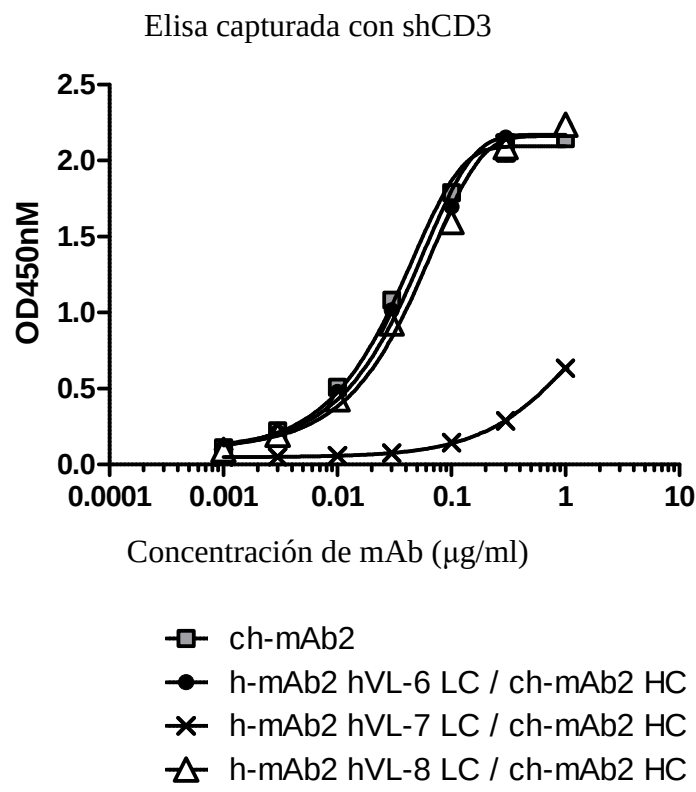


Figura 5

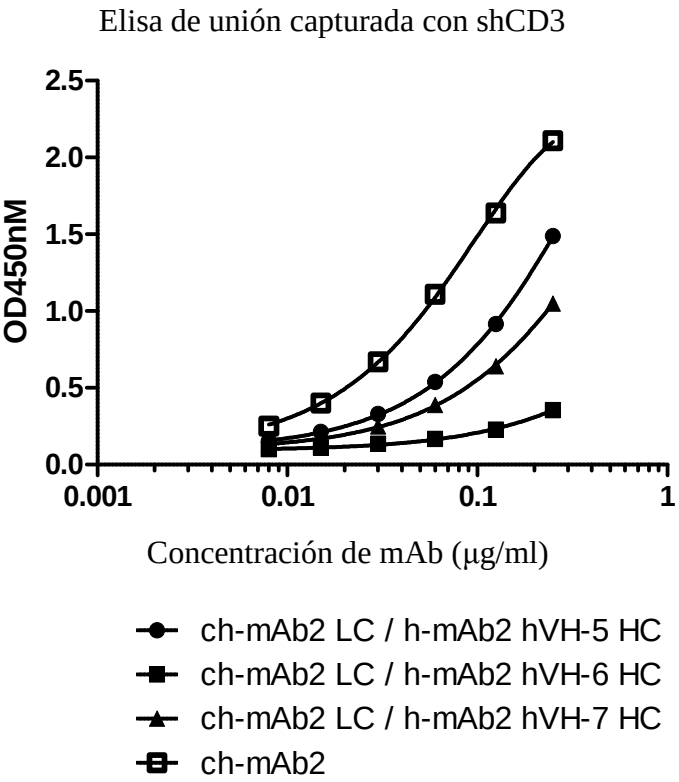


Figura 6

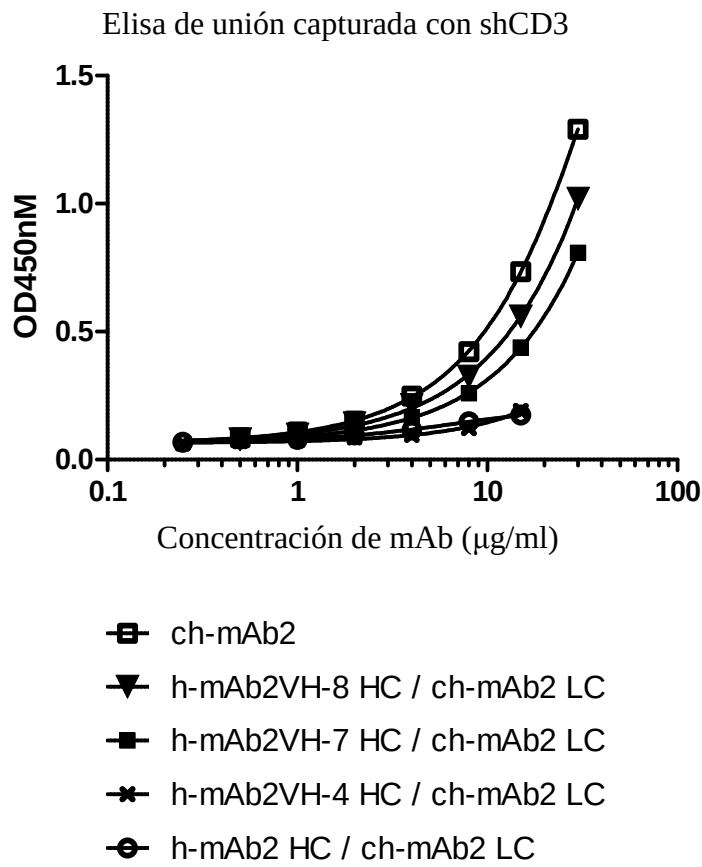


Figura 7

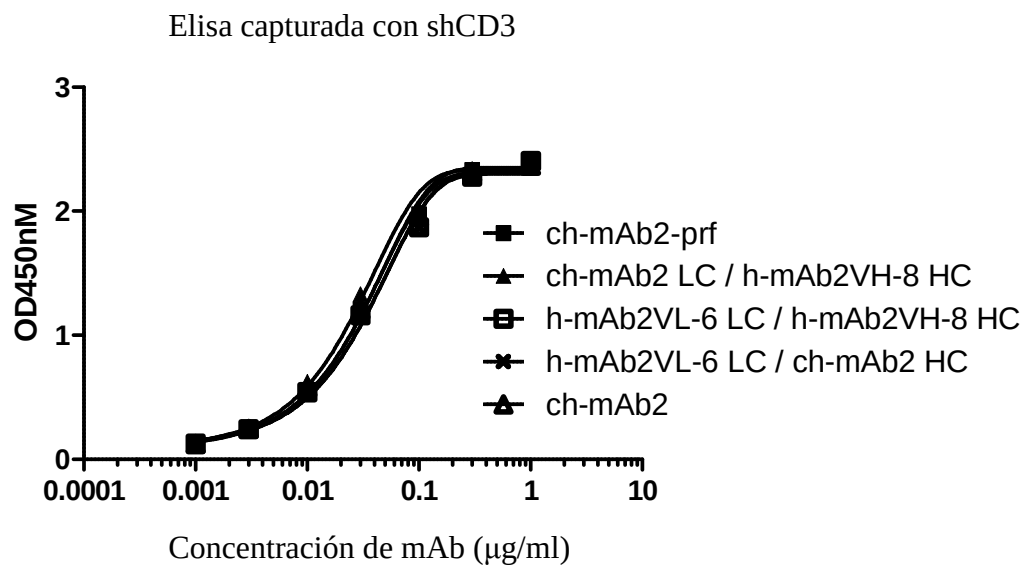


Figura 8A

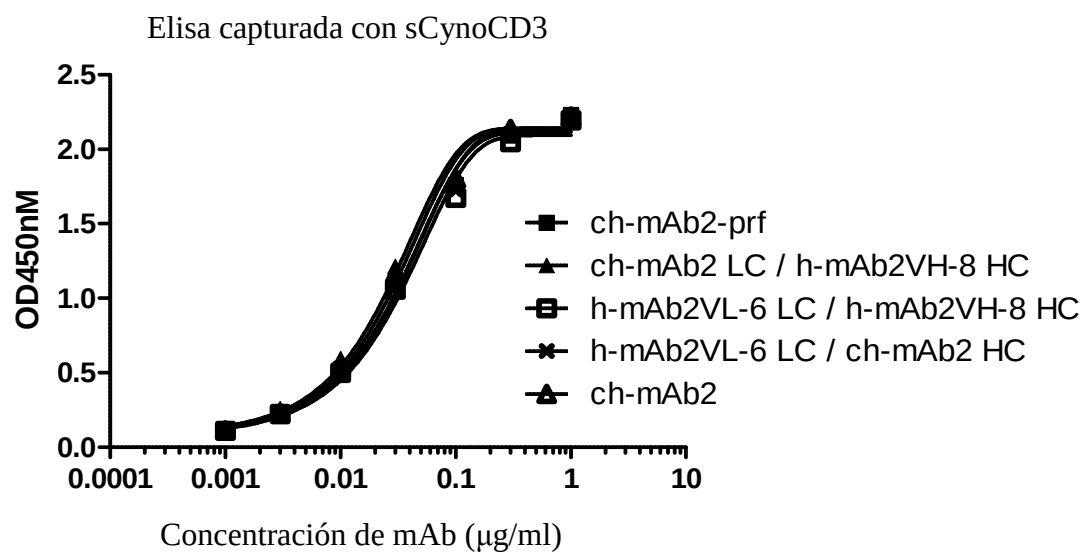


Figura 8B

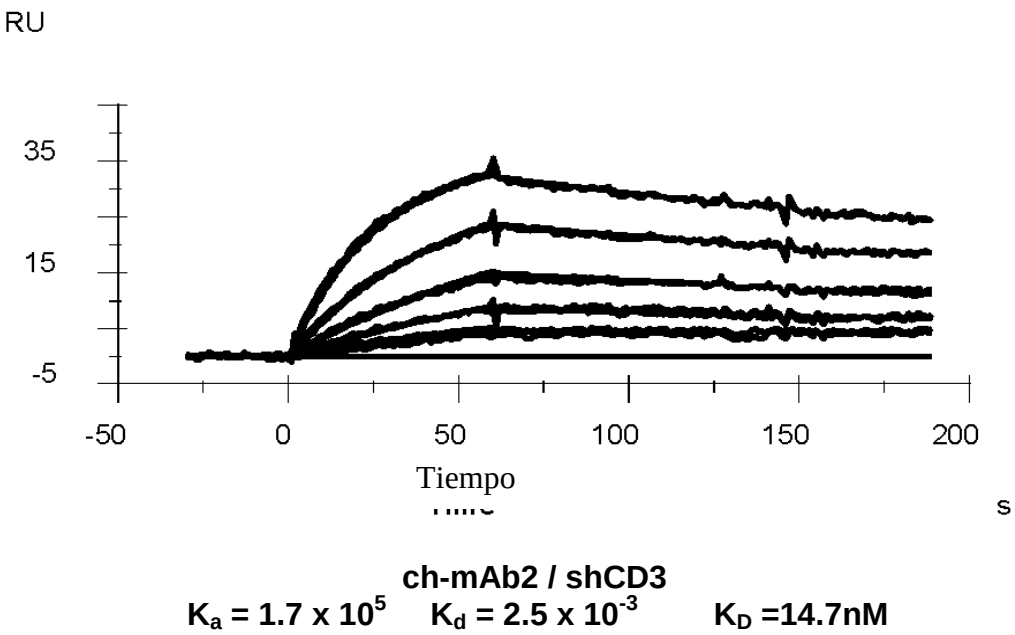


Figura 9A

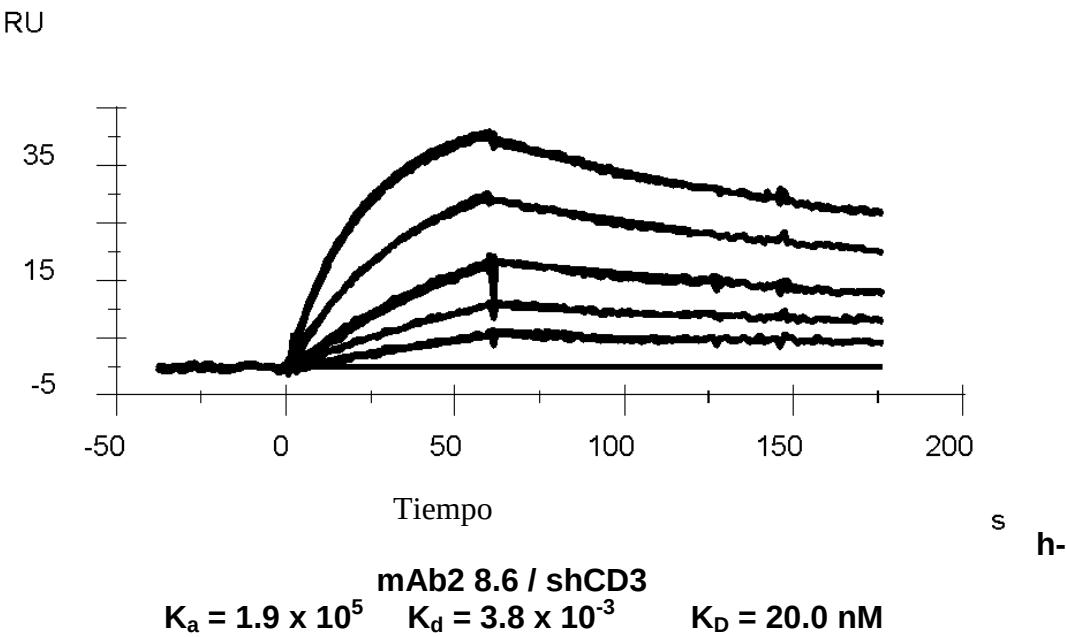


Figura 9B

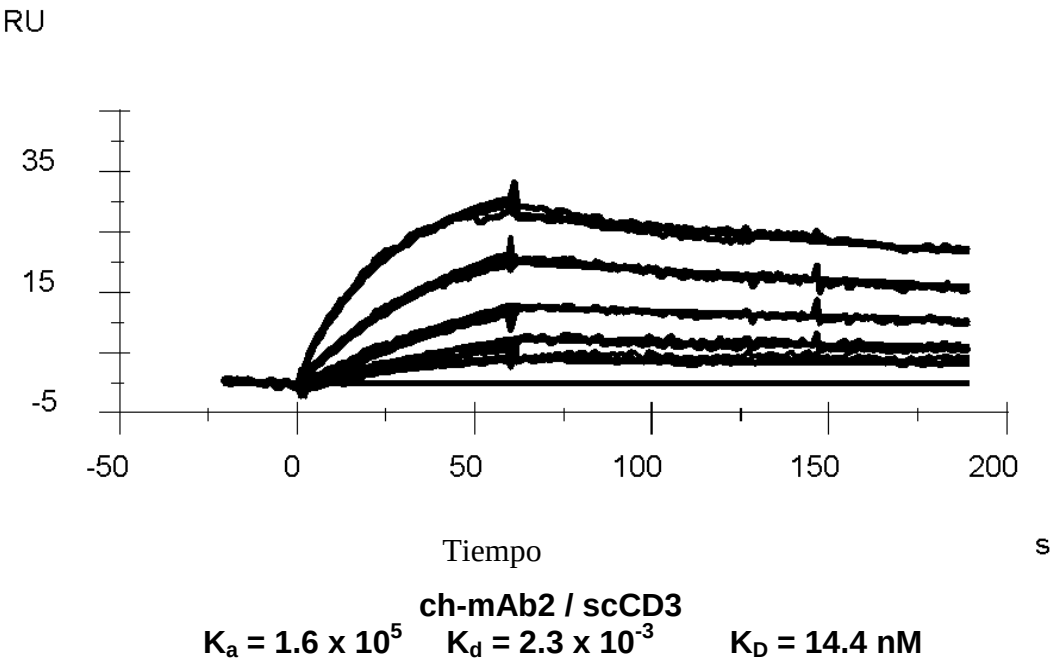


Figura 9C

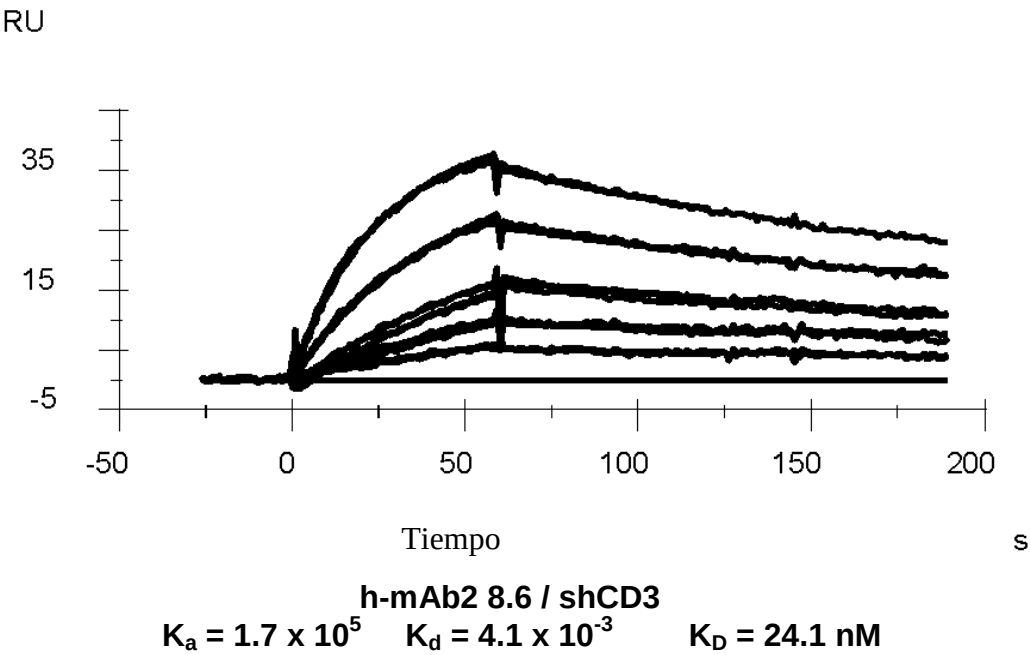


Figura 9D

Elisa de unión biespecífica capturada con cynoCD3

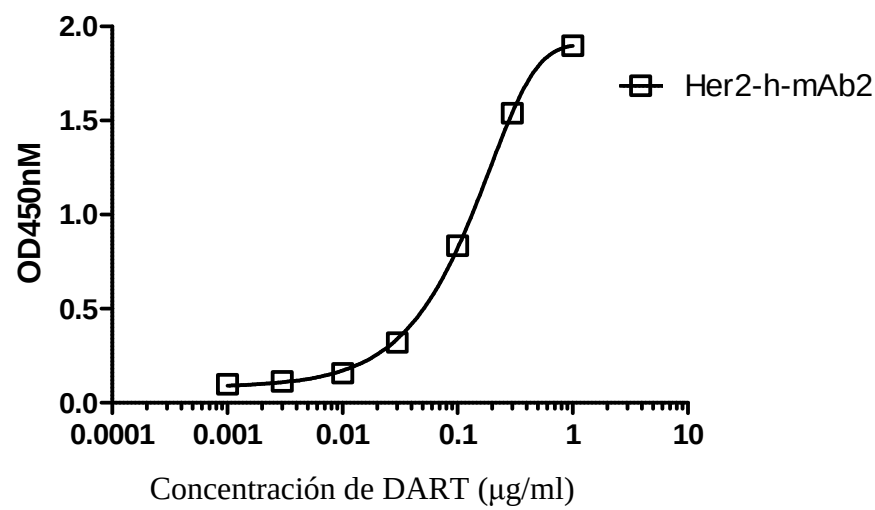


Figura 10A

Elisa de unión biespecífica capturada con cynoCD3

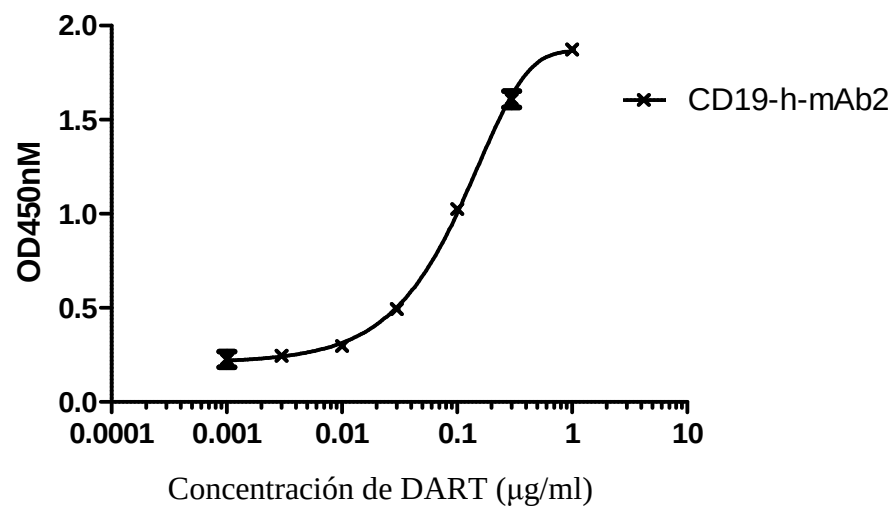


Figura 10B

Elisa de unión biespecífica capturada con cynoCD3

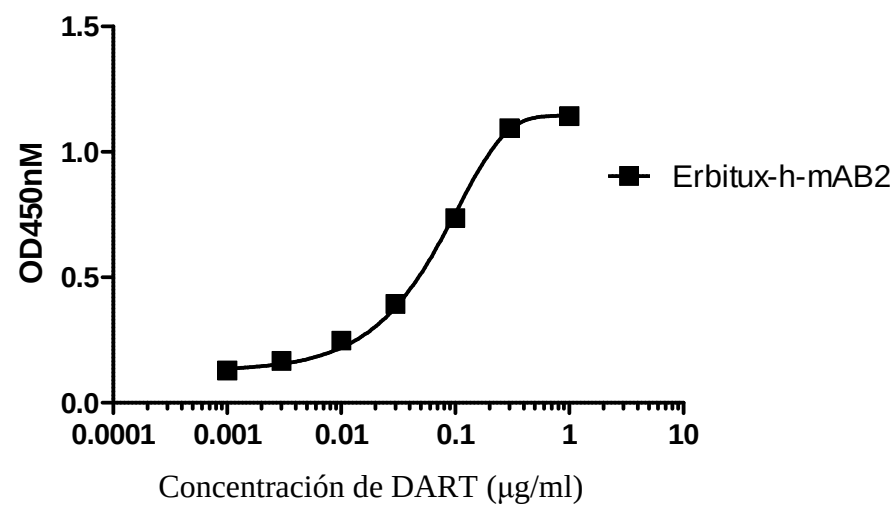


Figura 10C

Elisa de unión biespecífica con sCynCD3-shB7H3

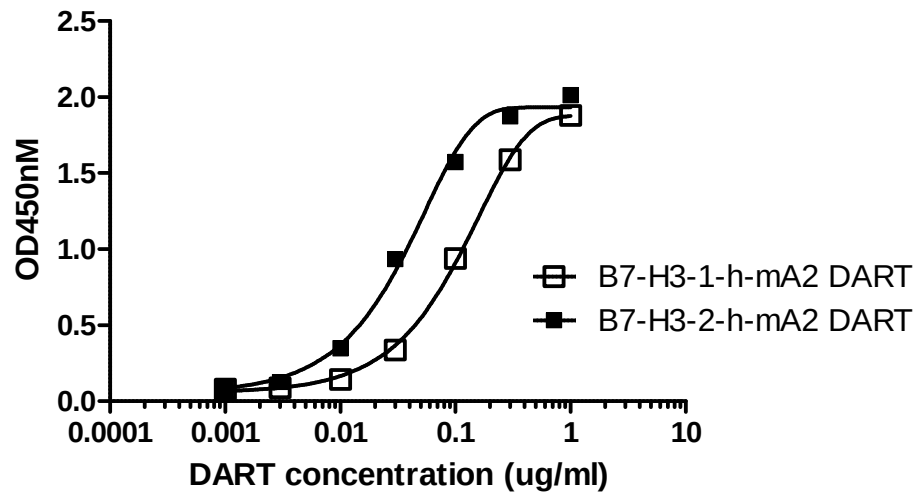


Figura 10D

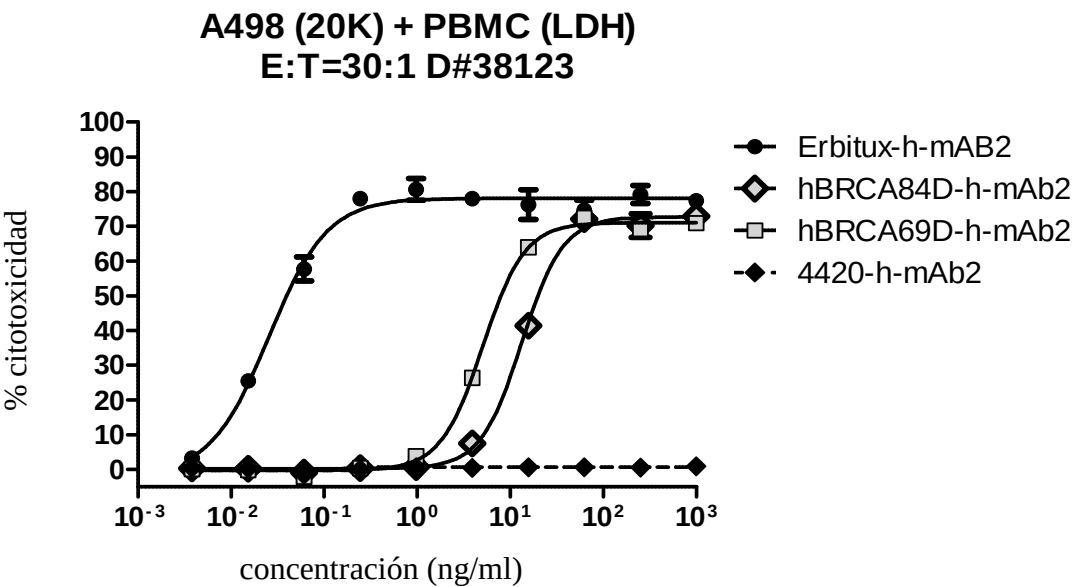
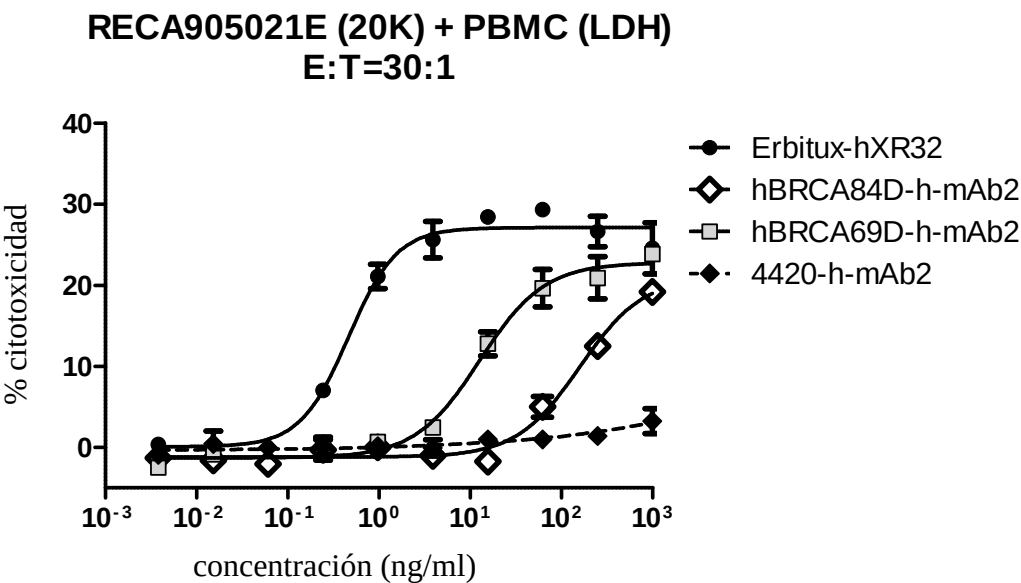


Figura 11A



ura 11B

Fig

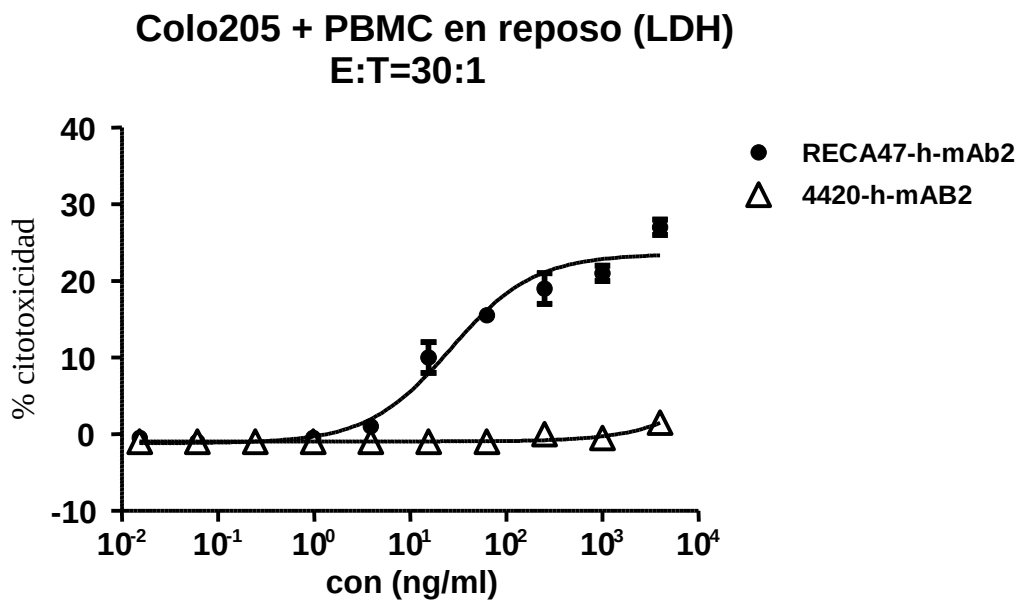


Figura 12A

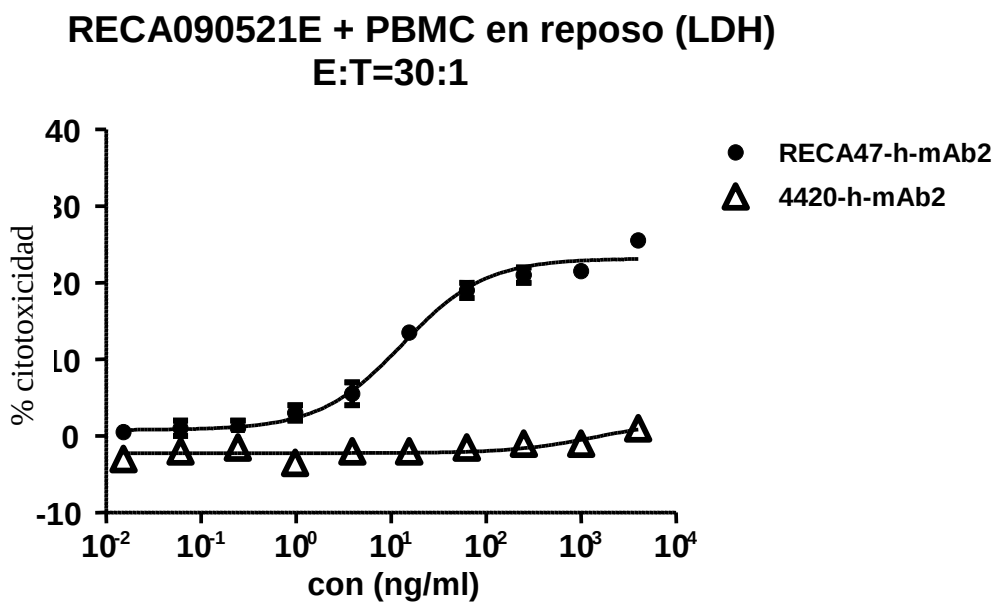


Figura 12B

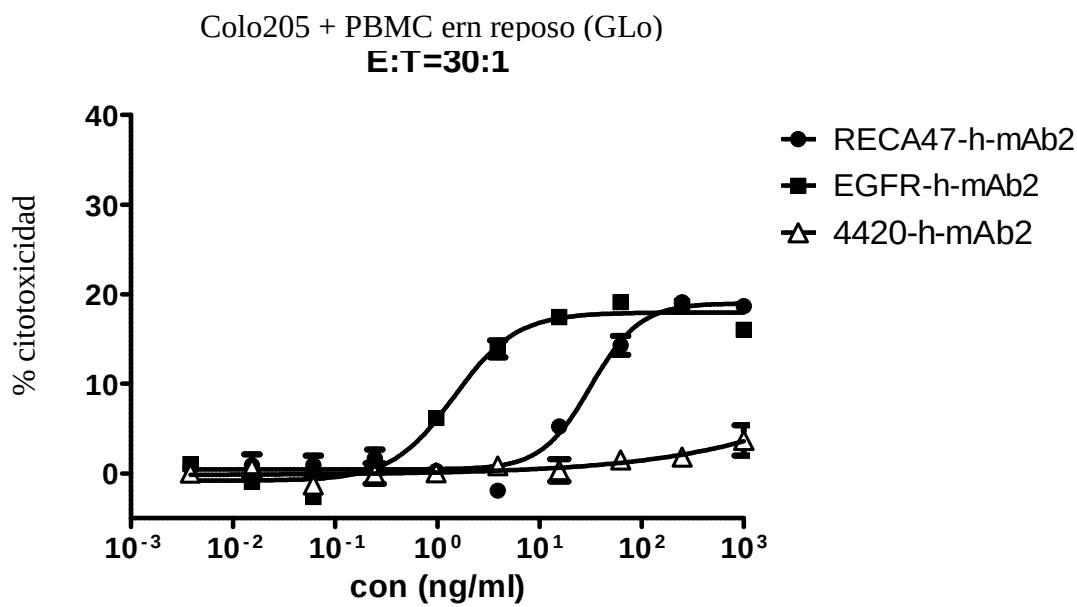


Figura 12C

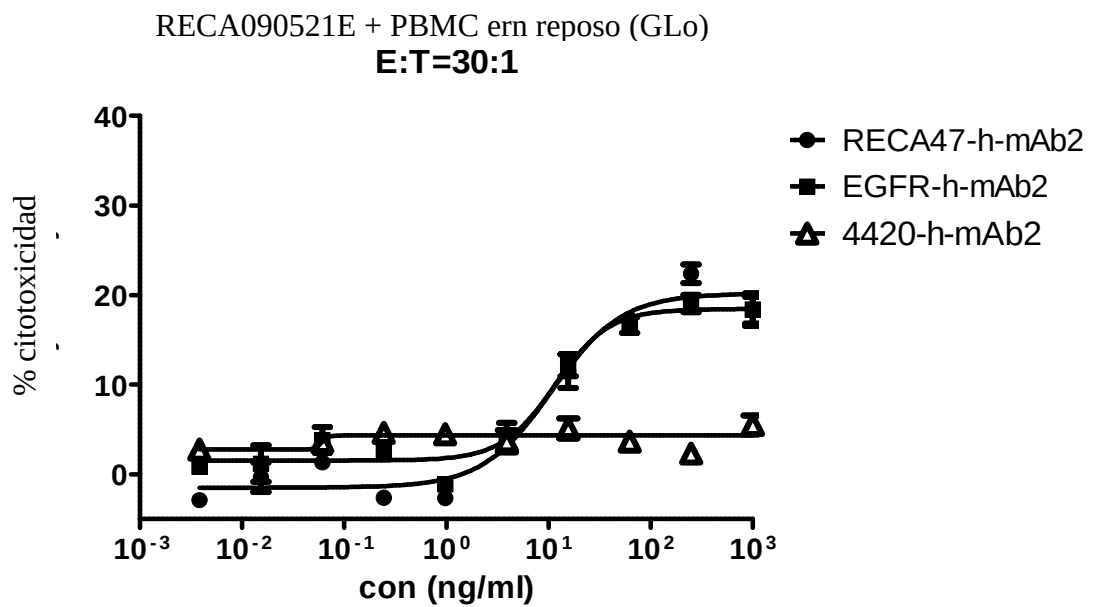


Figura 12D

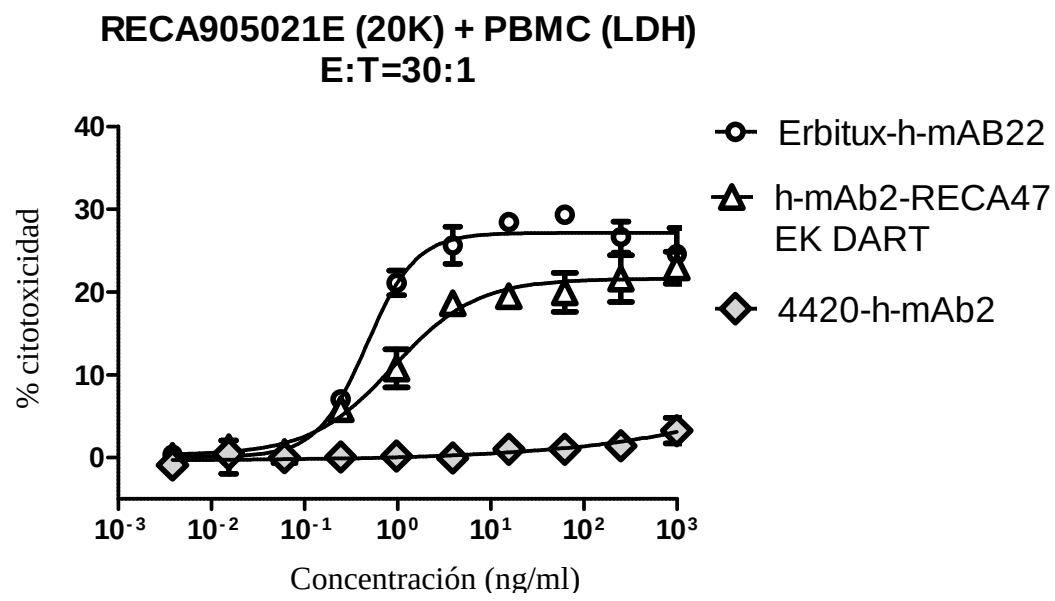


Figura 12E

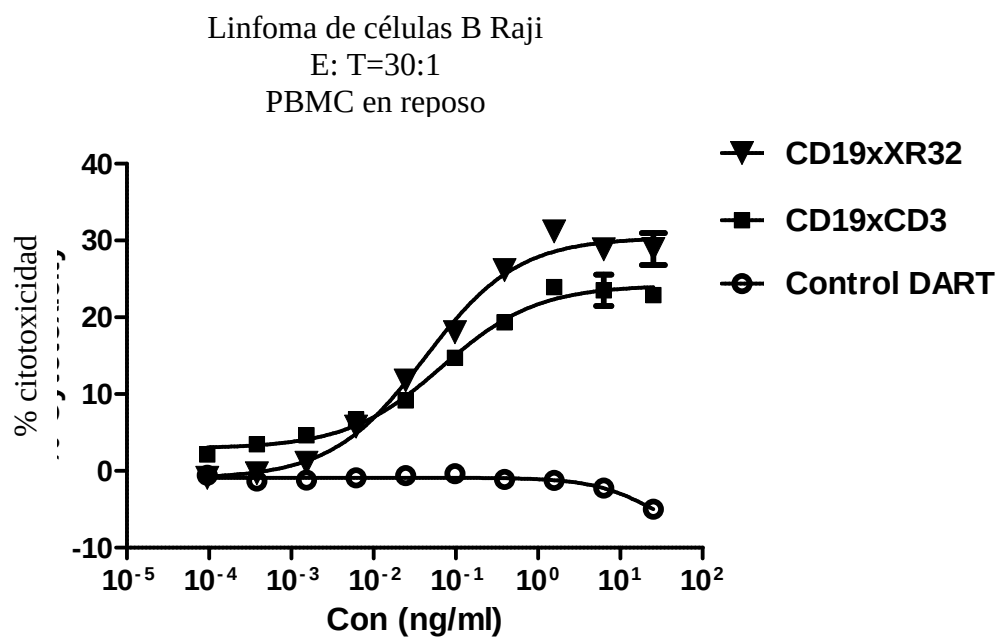


Figura 13A

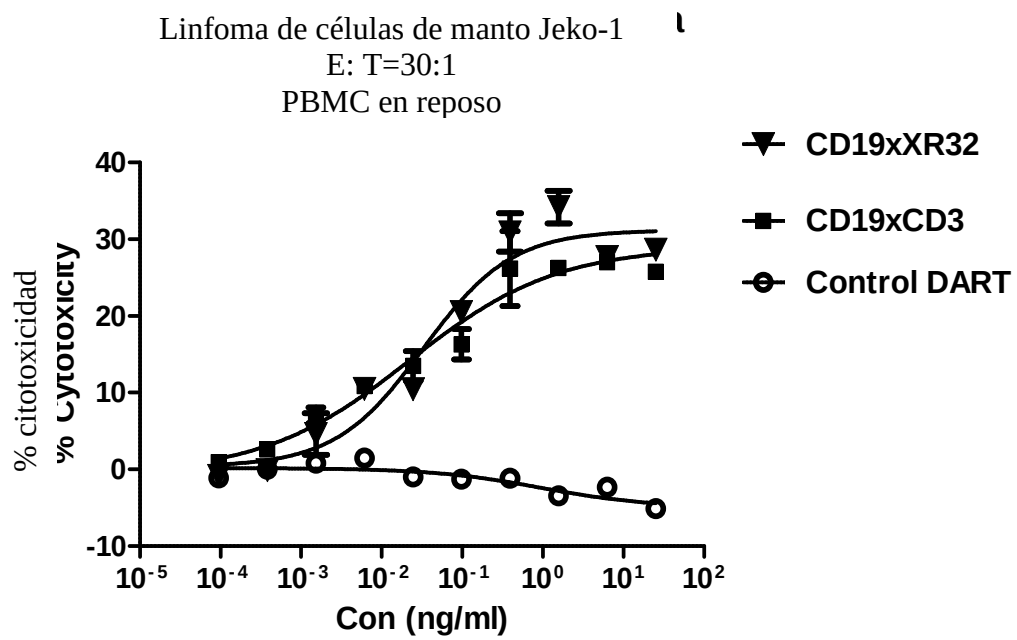


Figura 13B

Células blanco de cáncer de colon HT-29
Efectoras PBMC Humanas

S

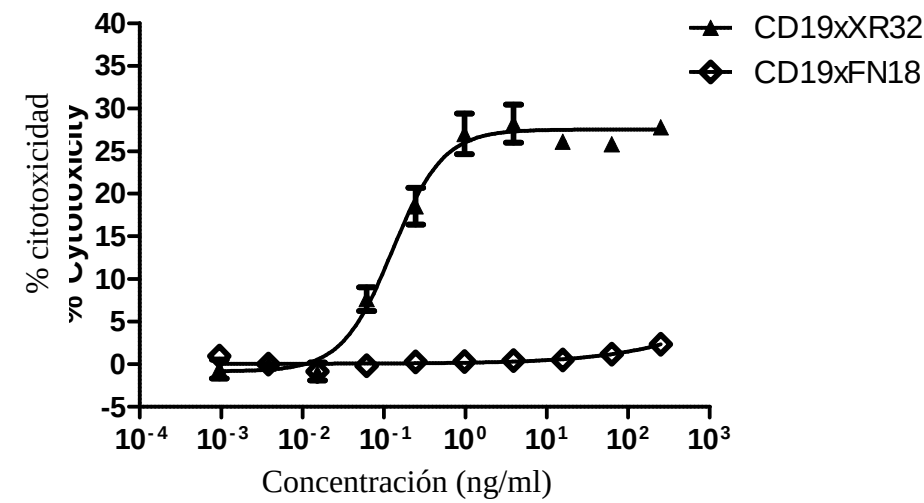


Figura 14A

Células blanco de cáncer de colon HT-29
Efectoras línea de células T de Macaco

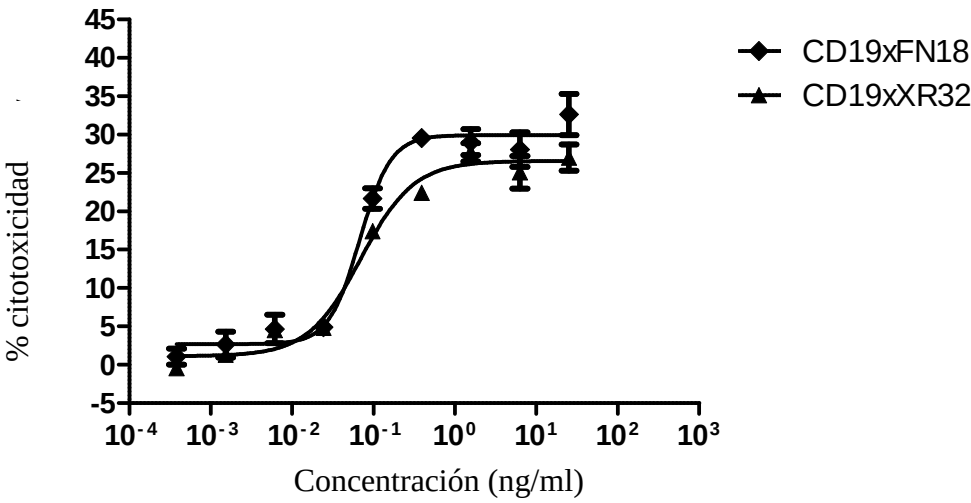


Figura 14B

Activación de células T CD4⁺

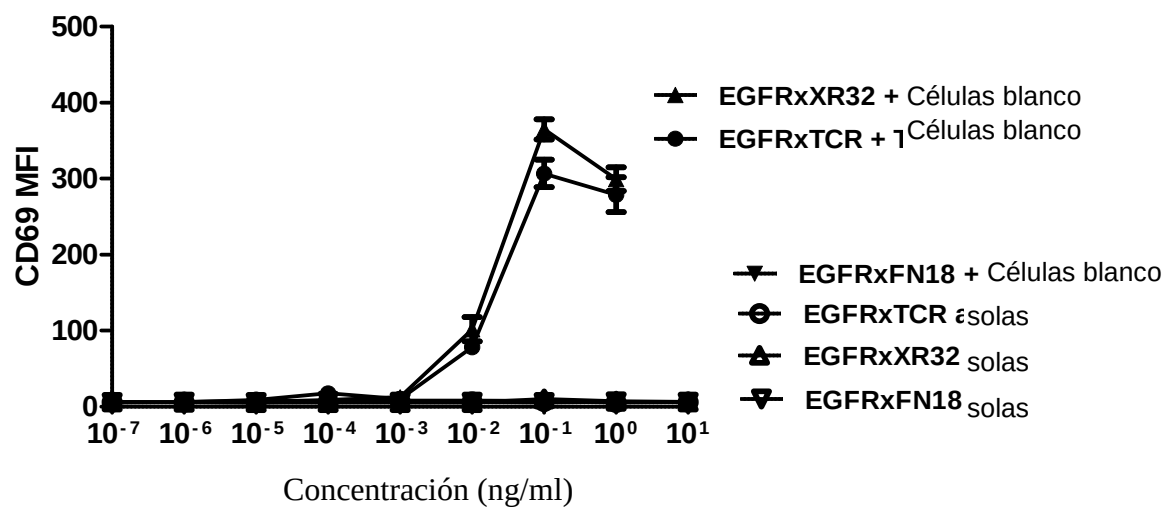


Figura 15A

Activación de células T CD8⁺

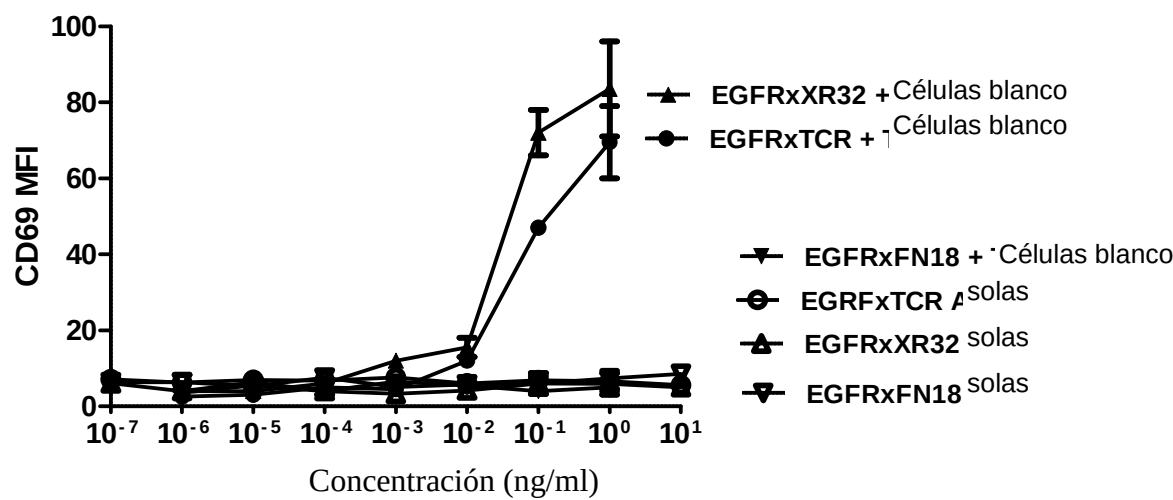


Figura 15B

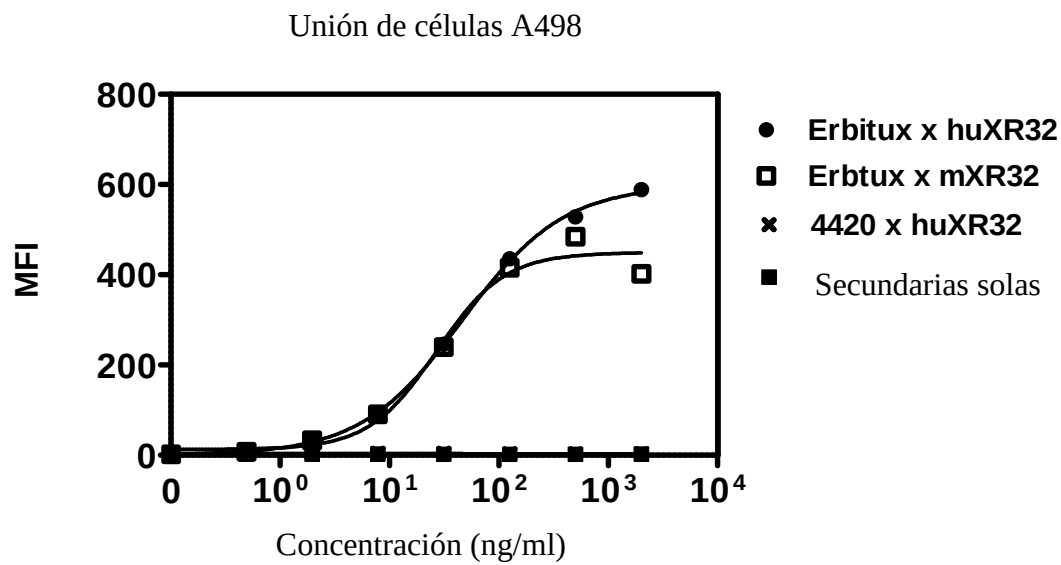


Figura 16A

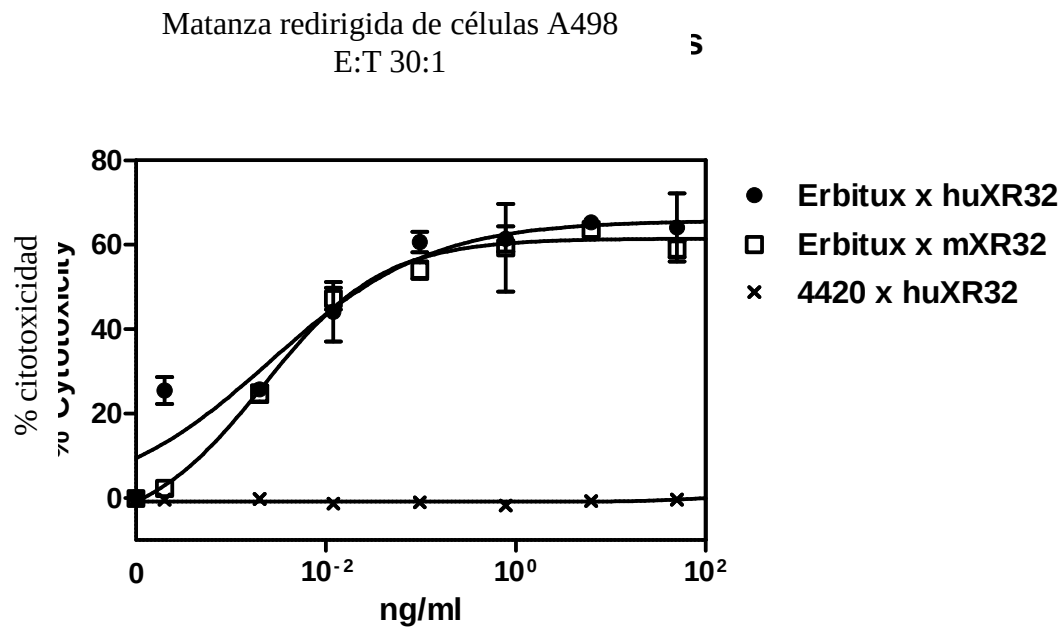


Figura 16B

Unión de Células A431

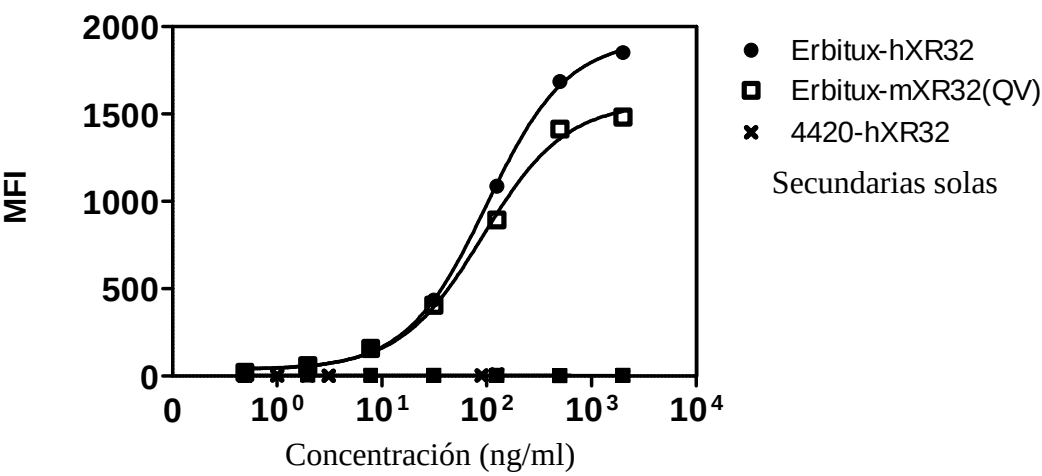


Figura 16C

Matanza redirigida de células A431
E:T 30:1

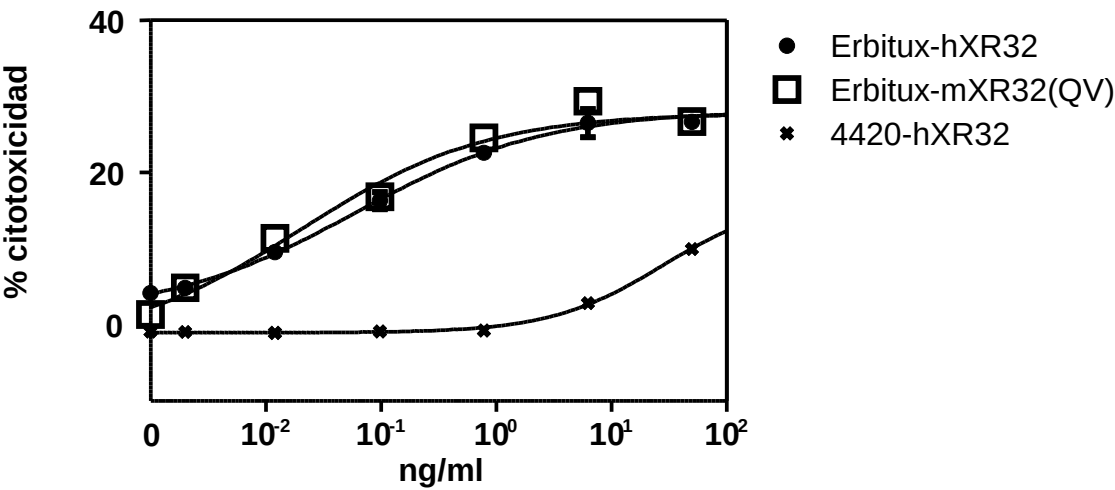


Figura 16D