



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0713426-6 A2



(22) Data de Depósito: 14/06/2007  
(43) Data da Publicação: 09/10/2012  
(RPI 2179)

(51) Int.CI.:  
A61K 39/395  
A61K 39/40  
A61K 39/21

**(54) Título:** MÉTODOS DE TRATAR, DIMINUIR A PROGRESSÃO, OU MELHORAR UM OU MAIS SINTOMAS DE UM DISTÚRBIO, E DE PREVENIR OU RETARDAR O INÍCIO DE UM DISTÚRBIO

**(30) Prioridade Unionista:** 14/06/2006 US 60/813903,  
21/12/2006 US 60/871361

**(73) Titular(es):** Macrogenics, Inc

**(72) Inventor(es):** Ezio Bonvini, Leslie S. Johnson, Ronald Wilder,  
Scott Koenig, Stanley Pillemer

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2007071275 de  
14/06/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2007/147090de  
21/12/2007

**(57) Resumo:** USO DE UM ANTICORPO HUMANO ANTI-CD3. A presente invenção fornece métodos de tratar, prevenir, diminuir a progressão, ou melhorar os sintomas de doenças imunológicas mediadas pela célula T, particularmente doenças autoimunes (por exemplo, diabetes autoimune (isto é, diabetes tipo 1 ou diabetes melito dependente de insulina (IDDM)) e esclerose múltipla) através do uso de anticorpos humanos anti-CD3. Os anticorpos da invenção são preferivelmente usados em regimes de dosagem de dose baixa, regimes de dosagem crônica ou regimes que envolvem a redosagem depois de um certo período de tempo. Os métodos da invenção fornecem a administração de anticorpos que especificamente se ligam à subunidade epsilon dentro do complexo CD3 humano. Tais anticorpos modulam a interação de aloantígeno/receptor de célula T e, assim, regulam a citotoxicidade mediada pela célula T associada com distúrbios autoimunes. Adicionalmente, os métodos da invenção fornecem o uso de anticorpos humanos anti-CD3 modificados tal que eles exibem função efetora reduzida ou eliminada e ativação de célula T quando comparado com anticorpos humanos anti-CD3 não modificados.

**“USO DE UM ANTICORPO HUMANO ANTI-CD3”**

**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

Este pedido reivindica benefício de Pedido Provisório US de No. Serial 60/813.903, depositado em 14 de junho de 2006 e Pedido Provisório US de No. Serial 60/871.361, depositado em 21 de dezembro de 2006, os conteúdos dos quais são incorporados aqui como referência para todos os fins.

**1. INTRODUÇÃO**

A presente invenção fornece métodos para tratar, prevenir, diminuir a progressão de, ou melhorar os sintomas de doenças imunológicas mediadas pela célula T, particularmente doenças autoimunes (p. ex., diabetes autoimune (isto é, diabetes tipo 1 ou diabetes melito dependente de insulina (IDDM)) e esclerose múltipla) através do uso de anticorpos anti-CD3 humano. Os anticorpos da invenção são de preferência usados em regimes de dosagem de dose baixa, regimes de dosagem crônica ou regimes que envolvem a redosagem depois de certo período de tempo. Os métodos da invenção fornecem a administração de anticorpos que se ligam especificamente à subunidade épsilon dentro do complexo CD3 humano. Tais anticorpos modulam a interação de aloantígeno/receptor de célula T e assim, regulam a citotoxicidade mediada pela célula T associada com distúrbios autoimunes. Adicionalmente, os métodos da invenção fornecem o uso de anticorpos anti-CD3 humano modificados tal que eles exibem função efetora reduzida ou eliminada e ativação de célula T quando comparado com anticorpos anti-CD3 humano não modificados.

**2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

**2.1 Doenças Autoimunes**

Doenças autoimunes são causadas quando o sistema imune do

corpo, que normalmente defende o corpo contra bactérias, vírus e outros agentes infecciosos, ataca tecido, células e órgão “próprios”. A mobilização do sistema imune contra tais alvos próprios é denominada autoimunidade. Embora alguma autoimunidade esteja presente em todo indivíduo, rígidos sistemas de controle suprimem as células de reconhecimento próprio do sistema imune em uma extensão que a autoimunidade é normalmente assintomática. Estados de doença surgem quando há alguma interrupção no sistema de controle, permitindo que as células autoimunes escapem da supressão, ou quando há alguma alteração em um tecido alvo tal que ele não é mais reconhecido como próprio. Os mecanismos latentes dessas alterações não são bem entendidos, mas foram teorizados como sendo o resultado de estimulação imune aberrante em indivíduos geneticamente predispostos.

Doenças autoimunes podem ser específicas de órgão ou sistêmicas e são provocadas por mecanismos patogênicos que diferem. Autoimunização específica de órgão é caracterizada por tolerância e supressão no compartimento de célula T, expressão aberrante de抗ígenos de complexo de histocompatibilidade principal (MHC), mimetismo抗igenico e variações alélicas em genes de MHC. Doenças autoimunes sistêmicas geralmente envolvem ativação de célula B policlonal e anormalidade de células T imunorregulatórias, receptores de célula T e genes de MHC. Exemplos de doenças autoimunes específicas de órgão são diabetes, psoríase cutânea, colite ulcerativa, hipertiroidismo, insuficiência adrenal autoimune, anemia hemolítica, esclerose múltipla e cardite reumática. Doenças autoimunes sistêmicas representativas incluem lúpus sistêmico, eritematoso, artrite reumatóide, artrite psoriática, poliomiosite da síndrome de Sjogren, dermatomiosite e escleroderma.

Além disso, embora não tendo um distúrbio autoimune, receptores de transplante de órgãos frequentemente experimentam sintomas similares e requerem terapias similares a pacientes autoimunes. O ataque do

sistema imune no(s) órgão(s) transplantado(s) pode levar a falência de órgão ou complicações sistêmicas mais graves, p. ex., doença enxerto-contrahospedeiro (GVHD) em receptores de transplante de medula óssea.

Há uma clara necessidade por estratégias melhoradas para tratar distúrbios autoimunes e/ou modular resposta imune. Atualmente, distúrbios de sistema imune são tratados com agentes imunossupressores tal como cortisona, derivados de aspirina, hidroxicloroquina, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida e várias substâncias biológicas tal como anticorpos anti-TNF e/ou combinações dos precedentes. Os tratamentos variavelmente bem-sucedidos, dependendo do paciente individual e distúrbio. Entretanto, um dilema no uso de tais terapias imunossupressoras surge em que quanto maior a supressão imune e assim aumenta o potencial de tratamento bem-sucedido do distúrbio imune, maior o risco do paciente começar a desenvolver infecções oportunistas. Adicionalmente, devido à natureza comprometida do sistema imune do paciente, mesmo uma infecção menor pode rapidamente tornar-se de grave preocupação.

### **2.1.1 Diabetes**

Diabetes é tipicamente classificada como um de dois tipos: diabetes tipo 1 ou tipo 2. Diabetes tipo 2 é uma doença não autoimune que é tipicamente diagnosticada em adultos. É uma doença progressiva que se desenvolve quando o corpo não produz insulina suficiente ou falha em usar eficientemente a insulina que produz (um fenômeno conhecido como resistência a insulina). Pacientes diagnosticados com diabetes tipo 2 estão tipicamente na idade de 45, acima do peso (IMC de 25 ou mais alto) ou obesos (IMC de 30 ou mais alto), fisicamente inativos, têm hipertensão (pressão sanguínea de 140-90 mm de Hg ou mais alta em adultos) e têm colesterol HDL de 35 mg/dL ou mais baixo e/ou nível de triglicerídeo de 250 mg/dL.

Diabetes tipo 1, também conhecida como diabetes juvenil ou

diabetes melito dependente de insulina, é uma doença autoimune que é tipicamente diagnosticada em crianças (embora diabetes tipo 1 de Início Adulto possa estar presente em adultos). Diabetes melito dependente de insulina (IDDM) afeta 15 milhões de pessoas nos Estados Unidos com 12 milhões de pessoas adicionalmente estimadas como sendo assintomáticas no momento e assim, inconscientes de que elas têm essa doença. Fatores de risco para desenvolver diabetes tipo 1 incluem fatores genéticos presumíveis, exposição a vírus da infância ou outros fatores ambientais e/ou presença de outro distúrbio autoimune. Embora os fatores genéticos associados com diabetes tipo 1 não sejam plenamente entendidos, riscos para o desenvolvimento da doença foram ligados tanto à história familiar como à etinicidade. Por exemplo, uma criança que tem um parente ou irmãos com diabetes tipo 1 tem um risco maior de desenvolver diabetes tipo 1 que uma criança de pais não diabéticos ou com irmãos não diabéticos. Adicionalmente, os fatores genéticos associados ao risco de desenvolver diabetes tipo 1 parecem estar ligados a um tipo de HLA particular: HLA-DR3 e DR4 estão associados com um maior risco em caucasianos; HLA-DR7 está associado com um maior risco em pessoas de descendência africana e HLA-DR9 está associado com um maior risco em pessoas de descendência japonesa.

Fatores desconhecidos, incluindo vírus da infância ou exposição a algum outro fator ambiental (p. ex., exposição a certas comidas ou substâncias químicas), também são teorizadas como potencializando ou ativando um fator genético herdado e causando o início de diabetes tipo 1. Vírus que foram associados com diabetes tipo 1 incluem vírus coxsackie B, enterovírus, adenovírus, da rubéola, citomegalovírus e vírus Epstein-Barr. Por último, a presença de outros distúrbios autoimunes, tal como doença da tireóide e doenças celíaca, eleva o risco de desenvolver diabetes tipo 1.

A diabetes tipo 1 é causada por uma resposta autoimune em que as células  $\beta$  produtoras de insulina do pâncreas (também conhecidas

como células da ilhota) são gradualmente destruídas. O estágio inicial da doença, denominado insulite, é caracterizado por infiltração de leucócitos no pâncreas e está associado tanto com inflamação pancreática como com a liberação de anticorpos citotóxicos anti-célula-β. Conforme a doença progride, o tecido lesionado também pode atrair linfócitos, causando ainda lesão adicional às células β. Além disso, ativação geral subsequente de linfócitos, por exemplo, em resposta a uma infecção viral, alergia alimentar, substância química ou estresse, podem resultar em ainda mais células da ilhota sendo destruídas. Estágios iniciais da doença são frequentemente não vistos ou mal diagnosticados visto que sintomas clínicos de diabetes tipicamente se manifestam apenas após 80% das células β terem sido destruídas. Uma vez que os sintomas ocorram, o diabético tipo 1 é normalmente dependente de insulina por toda a vida. A desregulação de níveis de glicose sanguínea associados com diabetes pode levar à cegueira, insuficiência renal, lesão neural e é um fator contribuinte principal na etiologia de acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronária e outros distúrbios vasculares sanguíneos.

### **2.1.2 Esclerose Múltipla**

Esclerose múltipla (MS) é uma doença crônica, inflamatória incapacitante do sistema nervoso central (SNC). MS é tipificada patologicamente por focos inflamatórios múltiplos, placas de desmielinação, gliose e patologia axonal no cérebro e medula espinhal. Embora os eventos causais que precipitam a doença sejam desconhecidos, linhas convergentes de evidências sugerem que a doença é causada por uma perturbação na função imune. Esta perturbação permite que células do sistema imune ataquem a mielina, a bainha de isolamento que circunda os axônios localizados no SNC (isto é, o cérebro e medula espinhal). Quando observadas microscopicamente, as placas consistem em células inflamatórias, células astrogliais, edema e fragmentos de mielina destruída. Quando a mielina é danificada, impulsos

elétricos não podem viajar rapidamente ao longo das vias da fibra neural no cérebro e medula espinhal. O transtorno de condutividade elétrica resulta em fadiga e perturbações da visão, força, coordenação, equilíbrio, sensações e função da bexiga e intestinos. Assim, sintomas típicos incluem um ou mais de 5 fraqueza ou paralisia em uma ou mais extremidades, tremor em uma ou mais extremidades, espasticidade muscular, atrofia muscular, movimento disfuncional, dormência ou sensação anormal em qualquer área, formigamento, dor facial, dor em extremidade, perda de visão em um ou ambos os olhos, dupla visão, incômodo ocular, movimentos oculares rápidos 10 incontroláveis, coordenação diminuída, perda de equilíbrio, habilidade diminuída em controlar movimentos pequenos ou complexos, anormalidades na caminhada ou marcha, espasmos musculares, tonteira, vertigem, hesitação urinária, urgência urinária, frequência urinária aumentada, incontinência, memória diminuída, espontaneidade diminuída, julgamento diminuído, perda 15 de habilidade para pensar abstratamente, perda de habilidade para generalizar, depressão, tempo de atenção diminuído, fala ininteligível, dificuldade em discurso ou fala compreensiva, fadiga, constipação, perda de audição e/ou reflexo de Babinski positivo. Os sintomas recorrem periodicamente, duram dias a meses, então reduzem ou desaparecem. Em cada recorrência, os 20 sintomas podem variar ou ser completamente diferentes conforme novas áreas são afetadas.

Estudos da história natural de MS sugerem que há padrões diferentes de atividade de doença. Alguns pacientes têm ataques raros, alguns têm ataques frequentes e outros gradualmente, mas regularmente pioram sem 25 experimentar ataques. Pacientes que tem ataques raros e estão minimamente incapacitados dez anos após serem diagnosticados com MS são ditos com tendo MS benigna. Este grupo constitui apenas cerca de 10-15% da população de pacientes de MS total, embora haja alguma evidência sugerindo que este curso pode ser mais comum do que é atualmente apreciado. Paciente que tem

ataques com recuperação plena ou parcial e são de outro modo estáveis entre ataques são definidos como tendo MS reincidente-remitente. Aproximadamente 80-90% dos pacientes com MS experimentam inicialmente um curso reincidente-remitente. Desses, aproximadamente 50% terão 5 dificuldade em caminhar 15 anos após o início e 80% irão por fim (após cerca de 25 anos) experimentar progressão gradual de desabilidade com ou sem ataques. Pacientes que primeiro experimentam exacerbações e mais tarde experimentam progressão gradual de desabilidade têm MS progressiva secundária. Aproximadamente 10-15% de pacientes com MS não 10 experimentam um ataque inicial. Aqueles pacientes que gradualmente pioram após o aparecimento do primeiro sintoma têm MS progressiva primária. Poucos pacientes com MS progressiva primária têm irão experimentar mais tarde uma exacerbação. Esses pacientes têm MS progressivo-reincidente.

Não há até agora cura para MS. Muitos pacientes vão bem sem 15 terapia de modo algum, especialmente visto que muitas medicações têm graves efeitos colaterais e algumas portam riscos significativos. Entretanto, três formas de interferon beta (AVONEX® (interferon beta-1a), BETASERON® (interferon beta-1b) e REBIF® (interferon beta-1a)) foram aprovados no momento atual pela Administração de Alimento e Fármaco para 20 tratamento de MS reincidente-remitente. Demonstrou-se que interferon beta reduz o número de exacerbações e pode diminuir a progressão de desabilidade física. Quando o ataque ocorre, eles tendem a ser mais curtos e menos graves. O FDA também aprovou uma forma sintética de copolímero de proteína básica de mielina I, COPAXONE® (acetato de glatirêmico), para o 25 tratamento de MS reincidente-remitente. O copolímero I tem poucos efeitos colaterais e estudos indicam que o agente pode reduzir a taxa de reincidência em quase um terço. Um tratamento imunossupressor, NOVATRONE® (mitoxantrona), também está aprovada pelo FDA para o tratamento de MS avançada ou crônica.

## 2.2 Funcionalidade de células T em diabetes e outros distúrbios autoimunes

Atividade e capacidade de maturação de célula T na diabetes, de mielina na esclerose múltipla, ou da célula-alvo de outro distúrbio autoimune é mediada amplamente por linfocito-T citotóxico (CTL) também conhecido como célula T CD8+, que reconhecem e especificamente peptídeos antígenicos, derivados de célula-alvo (AA), ou, em caso de outro tipo de célula T, reconhecem o peptídeo antígenico gráve de seu receptor de célula T específico (TCR). Diferente de anticorpo, que reconhece proteinas e moléculas antigênicas, sólidas, como glicoproteínas ou LGR, que só interage com antígeno-peptídeo-peptídeo apresentado apena em complexo com proteína do complexo de ligação de compatibilidade de principal (MLC).

A maturação da célula do corpo expõe a molécula de MHC de variável e em um operador dependente da classe de MHC expõe a apresentação de novo(s) oligopeptídeos de parada na célula ou, em circulatório, com mutamento de sua proteína-capturadora. Molécula de MHC (chamada “antígeno de leucocito humano ou HLA em humano”) e TCR são extremamente polimórfica, cada variante clonal reconhecendo e se ligando a uma única espécie de peptídeo ou grupo de moléculas-peptídeos-similares. A parte da célula exposta do antígeno é feita de célula-B e célula-T. A célula do corpo expõe um variante múltipla da molécula de MHC, cada variante se ligando a uma espécie peptídica diferente. Em contraste, durante a maturação, célula-B e T perdem a habilidade de expressar a variante múltipla de MHC e TCR, respectivamente. Célula-T madura, portanto, expressa apenas uma das variantes possíveis do TCR e irá se imunoreconhecer a sua única espécie antígeno MHC única.

A interação de um TCR com complexo antígeno-MHC elicitá um efeito de indução na célula-alvo, denominado ativação, que

resulta em proliferação clonal da célula T e respostas de célula T específicas de classe. Por exemplo, em CTLs a resposta à ativação também inclui a liberação de enzimas citotóxicas que resultam em apoptose/destruição da célula alvo.

### 5    2.3 Modulação de ativação de células T por anticorpos monoclonais

A descoberta de que doenças autoimunes são pelo menos parcialmente causadas por ação de célula T aberrante levou à investigação de terapias que ou eliminam clones de célula T problemática (aqueles que expressam TcRs contra抗ígenos próprios) ou reduzem seletivamente atividade/ativação de célula T indesejada. A ativação de célula T devido à ligação de TcR é, entretanto, um fenômeno inesperadamente complexo devido à participação de uma variedade de moléculas de superfície celular expressas na população de célula T que responde (Billadeau *et al.*, 2002, J Clin Invest 109: 161-168; Weiss, 1990, J Clin Invest 86: 1015-1022; Leo *et al.*, 1987, PNAS 84: 1374-1378; Weiss *et al.*, 1984, PNAS 81: 4169-4173; Hoffman *et al.*, 1985, J Immunol 135: 5-8).

Terapias direcionadas contra ativação de célula T geral foram problemáticas em que o TcR é composto de um heterodímero ligado por dissulfeto, contendo duas glicoproteínas integrais de membrana, clonalmente distribuídas,  $\alpha$  e  $\beta$ , ou  $\gamma$  e  $\delta$ . A maior parte da pesquisa em modulação de ativação de célula T foi feita em conexão com melhoria de supressão imune em receptores de transplante de órgãos. Um dos primeiros métodos bem-sucedidos clinicamente para reduzir seletivamente ativação de célula T foi o uso de anticorpos monoclonais. A Pat. US No. 4.658.019 descreve um novo hibridoma (designado OKT3, No. de Acesso da ATCC CRL-8001) que produz um anticorpo monoclonal murino contra um antígeno encontrado em essencialmente todas as células T periféricas humanas normais. A ligação de OKT3 em célula T *in vivo* produz imunossupressão pronunciada, reversível. Descobriu-se que OKT3 reconhece um epítopo na subunidade  $\epsilon$  do complexo

CD3 humano (Salmeron *et al.*, 1991, J Immunol 147: 3047-3052; Transy *et al.*, 1989, Eur J Immunol 19: 947-950; veja também Pat. US No. 4.658.019). O complexo CD3 (também conhecido como T3) é compreendido por proteína invariantes de baixo peso molecular, que não se associam covalentemente 5 com o TcR (Samelson *et al.*, 1985, Cell 43: 223-231). Pensa-se que as estruturas de CD3 representam moléculas acessórias que podem ser os elementos transdutores de ativação de sinais iniciados na ligação do TcR α-β a seu ligante.

OKT3 possui propriedades ativadoras e supressoras de célula 10 T (Van Seventer, 1987, J Immunol 139: 2545-2550; Weiss, 1986, Ann Rev Immunol 4: 593-619). Ligação cruzada mediada por receptor de Fc de mAb anti-CD3 ligado a TcR resulta em expressão e proliferação de marcador de ativação de célula T (Weiss *et al.*, Ann Rev Immunol 4: 593-619). De modo similar, a administração *in vivo* de OKT3 resulta tanto da ativação de célula T 15 como supressão de respostas imunes (Ellenhorn *et al.*, 1990, Transplantation 50: 608-12; Chatenoud, 1990, Transplantation 49: 697). Administração diária repetida de OKT3 resulta em profunda imunossupressão e fornece tratamento eficaz de rejeição após transplante renal (Thistlethwaite, 1984, Transplantation 38: 695).

O uso de mAbs terapêuticos, incluindo, por exemplo, OKT3, é 20 limitado por problemas de efeitos colaterais de “primeira dose”, que variam de sintomas semelhantes à gripe suave até toxicidade severa. Acredita-se que os efeitos colaterais de primeira dose são causados por produção de citocina estimulada por ativação de célula T. Foi mostrado que as propriedades ativadoras de anticorpos monoclonais anti-CD3 resultam de ligação cruzada 25 de TcR mediada pelos anticorpos ligados ás célula T (através de seu domínio variável) e às células portadoras de FcγR (através de seu domínio Fc) (Palacios *et al.*, 1985, Eur J Immunol 15: 645-651. Ceuppens *et al.*, 1985; J Immunol 134: 1498-1502; Kan *et al.*, 1986, Cell Immunol. 98: 181-185). Por

exemplo, descobriu-se que o uso de OKT3 desencadeia a ativação de células T ligadas a mAb e células portadoras de Fc $\gamma$ R antes de concluir a supressão imune, resultando em uma massiva liberação sistêmica de citocinas (Abramowicz, 1989, Transplantation 47: P606; Chatenoud, 1989, N Eng J Med 25: 1420-1421). Efeitos colaterais relatados de terapia de OKT3 incluem sintomas semelhantes à gripe, dificuldade respiratória, sintomas neurológicos e necrose tubular aguda que pode seguir a primeira e às vezes a segunda injeção do mAb (Abramowicz, 1989, Transplantation 47: P606; Chatenoud, 1989, N Eng J Med 25: 1420-1421; Toussaint, 1989, Transplantation 48: 524; Thistlethwaite, 1988, Am J Kids Dis 11: 112; Goldman, 1990, Transplantation 50: 148).

Dados obtidos usando modelos experimentais em chimpanzés e camundongos sugeriram que prevenir ou neutralizar a ativação celular induzida por mAbs anti-CD3 reduz a toxicidade desses agentes (Parleviet, 1990, Transplantation 50: 889; Rao, 1991, Transplantation 52: 691; Alegre, 1990, Eur J Immunol 20: 707; Alegre, 1990, Transplant Proc 22: 1920; Alegre 1991, Transplantation 52: 674; Alegre, 1991, J Immunol 146: 1184-1191; Ferran, 1990, Transplantation 50: 642). Resultados prévios relatados em camundongos usando fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de 145-2C11, um anti-CD3 de camundongo de criceto que compartilha muitas propriedades com OKT3, sugeriram que, na ausência de ligação de Fc $\gamma$ R e ativação celular, mAbs anti-CD3 retêm pelo menos algumas propriedades imunossupressoras *in vivo* (Hirsch, 1991, Transplant Proc 23: 270; Hirsch, 1991, J Immunol 147: 2088). Além disso, a administração de anticorpos anti-CD3 com ligação reduzida a Fc $\gamma$ R a pacientes humanos resultou em geralmente apenas efeitos colaterais suaves e não os efeitos de primeira classe severos associados com a administração de OKT3 (Herold *et al.*, Diabetes 54: 1763).

## **2.4 Anticorpos monoclonais imunossupressores que exibem ativação de célula T reduzida**

A Pat. US No. 6.491.916, Pub. de Pedido de Pat. US No. 2005/0064514 e Pub. de Pedido de Pat. US No. 2005/0037000 descrevem a modificação das regiões Fc de imunoglobulinas tal que moléculas variantes exibem ligação acentuada ou reduzida a vários receptores de Fc quando comparadas a imunoglobulinas com domínios Fc selvagens. Em particular, as/os patentes/pedidos descrevem modificações às regiões Fc de anticorpos de IgG tal que a afinidade pelo Fc $\gamma$ R é acentuada ou reduzida seletivamente. Fazendo sob medida a afinidade para ativar ou suprimir receptores Fc, a resposta imune específica elicitada pelo mAb terapêutico pode ser mais seletivamente controlada. Por exemplo, foram identificadas mutações na porção CH<sub>2</sub> de um IgG4 de OKT3 humanizado (P234A e L235A) que reduzem significativamente a ligação do mAb a Fc $\gamma$ RI e II humano e murino e levam a um fenótipo de ativação marcadamente reduzido *in vitro* (Alegre *et al.*, 1992, 8º Congresso Internacional de Imunologia 23-28; Alegre *et al.*, 1994, Transplantation 57: 1537-1543; Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol 200: 16-26). De modo importante, este mAb variante reteve a capacidade de induzir modulação e imunossupressão de TcR (Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol 200: 16-26). Descobriu-se que outras modificações ao domínio Fc de anticorpos anti-CD3, tal como mutações para tornar o anticorpo aglicosilado ou outras mutações dos resíduos de domínio Fc, para reduzir a ligação a Fc $\gamma$ R reduzem a toxicidade enquanto mantêm atividade imunossupressora (veja, p. ex., Patente US 6.491.916; Patente US 5.834.597, Keymulen *et al.*, 2005, N Eng J Med 325: 2598, todos os quais são incorporados como referência aqui em suas totalidades).

### 25 3. RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos para tratar, prevenir, diminuir a progressão de e melhorar os sintomas de doenças imunológicas mediadas pela célula T, particularmente doenças autoimunes, em indivíduos diagnosticados com tais doenças (e/ou em indivíduos predispostos a

desenvolver tais doenças ou distúrbios), pela administração a um indivíduo em necessidade deste de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD3. Em particular, os métodos da invenção fornecem a administração de anticorpos que se ligam especificamente à subunidade épsilon do complexo CD3 humano. Por exemplo, tais anticorpos podem ser ou podem ser derivados de (p. ex., versões humanizadas ou quimerizadas de) um dos anticorpos Leu-4, 500A2, CLB-T3/3, M291, YTH 12,5 ou BMA030, ou competir com um de Leu-4, 500A2, CLB-T3/3, M291, YTH 12,5 ou BMA030 pela ligação (p. ex., em um ensaio de ELISA ou de imunoprecipitação). Em uma modalidade preferida, o anticorpo tem a especificidade de ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3 (veja, p. ex., Patente US Nos. 4.658.019 e 6.113.901, que são incorporadas como referência aqui em suas totalidades), p. ex., se liga ao mesmo epítopo conforme OKT3 e/ou compete pela ligação (isto é, em um ensaio de ELISA ou de imunoprecipitação) com OKT3, tal como uma versão humanizada do anticorpo OKT3, p. ex., OKT3-7 (veja os anticorpos divulgados em Patente US No. 6.491.916, que é incorporada aqui como referência em sua totalidade). Em modalidades preferidas, o anticorpo anti-CD3 da invenção tem ligação diminuída (tal como, mas não limitando a, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% ou menos de 1% quando comparado à ligação por um anticorpo que tem um domínio Fc selvagem, glicosilado) ou, de maior preferência, não detectável a um ou mais de qualquer Fc $\gamma$ R (p. ex., Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII ou Fc $\gamma$ RIII) através de seu domínio Fc como determinado por ensaios de rotina na técnica. Além disso, ou senão, o anticorpo anti-CD3 da invenção tem ligação diminuída (tal como, mas não limitando a, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% ou menos de 1% quando comparado à ligação por um anticorpo que tem um domínio Fc selvagem, glicosilado) ou, de maior preferência, não detectável a

quaisquer receptores de complemento, tal como, C1q, como determinado em ensaios usados rotineiramente. Em modalidades particulares, o anticorpo é aglicosilado. Em outras modalidades, o anticorpo não possui um domínio Fc (p. ex., é um fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub> ou anticorpo de cadeia única). Em outras 5 modalidades, o anticorpo tem um domínio Fc que tem uma ou mais modificações de aminoácidos que reduzem ou abolem a ligação do domínio Fc a um ou mais de um FcγR. Em certas modalidades, o domínio Fc tem uma modificação de aminoácido (isto é, inserção, substituição, deleção) em um ou mais dos resíduos 234, 235, 236 ou 237. Em modalidades preferidas, o 10 domínio Fc tem uma alanina na posição 234 da região Fc (CH2) e ou uma alanina na posição 235 da região Fc (CH2), em particular tendo alanina em 234 e 235, tal como OKT3γ1 (ala-ala). Em outras modalidades, o domínio Fc tem um glutamato na posição 235.

A invenção particularmente fornece métodos para tratar, 15 prevenir, diminuir a progressão de e/ou melhorar os sintomas de doenças autoimunes tal como diabetes tipo I, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide, lúpus (particularmente, cutâneo), doença do intestino inflamatória (IBD), doença de Crohn, colite ulcerativa, efeitos de transplante de órgãos, doença enxerto-contra-hospedeiro (GVHD), etc. Particularmente, os métodos 20 da invenção são vantajosos em indivíduos com doença em estágio inicial para diminuir ou reduzir a necessidade de outra terapia; por exemplo, no tratamento ou profilaxia de diabetes tipo I, os métodos da invenção podem reduzir a necessidade de administração de insulina exógena ao indivíduo. Além disso, os métodos da invenção reduzem vantajosamente a incidência de 25 ou resultam em nenhuma incidência de síndrome de liberação de citocina associada com administração de anticorpos terapêuticos e em particular, anticorpos anti-CD3. A síndrome de liberação de citocina é manifestada por, por exemplo, cefaléia, náusea, vômito, febre, mialgias, artralgias e tremor e pode ser causada por níveis séricos aumentados de, por exemplo, IL-2, IL-6,

IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Os métodos também reduzem a incidência e gravidade de outros efeitos adversos, tal como, mas não limitando a, ativação de EBV, imunogenicidade (produção de anticorpos anti-idiotípico, particularmente anticorpos anti-idiotípico de IgE), linfopenia, trombocitopenia e neutropenia.

5 Em modalidades preferidas, os anticorpos anti-CD3 humano são administrados em dosagens mais baixas ou por períodos mais curtos de tempo que regimes de dosagem anteriores. Em particular, a invenção contempla regimes de dosagem em que menos de 9.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  e de preferência, menos de 8.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , menos de 7.500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , menos de 7.000  
10  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou menos de 6.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de anticorpo anti-CD3 humano é administrado durante a duração da dosagem, particularmente de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala), ou de outro anticorpo anti-CD3 humano, tal como ChAglyCD3 (TRX4<sup>TM</sup>) ou HUM291 (visilizumab; NUVION<sup>TM</sup>). Em certas modalidades,  
15 os anticorpos da invenção são administrados ao indivíduo em necessidade destes usando um modo fora administração intravenosa que fornece o equivalente farmacológico para as quantidades antecedentes de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) como administrado intravenosamente. A invenção contempla adicionalmente métodos em que ao paciente são cronicamente administradas doses baixas do anticorpo anti-CD3 humano e métodos em que o paciente ao  
20 paciente é administrada uma ou mais rodadas adicionais do regime de tratamento de anticorpo anti-CD3 humano aproximadamente 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 2 anos, 3 anos ou 5 anos após o tratamento inicial, opcionalmente dependendo de parâmetros clínicos, ou é administrada outra rodada de tratamento com anticorpo anti-CD3 humano a cada  
25 aproximadamente 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 2 anos, 3 anos ou 5 anos, opcionalmente dependendo de parâmetros clínicos.

A invenção particularmente fornece métodos para tratar, prevenir, diminuir a progressão de, ou melhorar os sintomas de doenças e distúrbios autoimunes, p. ex., diabetes tipo 1, pela administração de

anticorpos anti-CD3 humano que têm toxicidade reduzida; p. ex., tendo ligação reduzida a Fc $\gamma$ Rs. Particularmente, os métodos da invenção são vantajosos em indivíduos com doença em estágio inicial a fim de diminuir ou reduzir o dano de autoimunidade e manter um alto nível de função. Em certas 5 modalidades, os métodos da invenção pode também reduzir a necessidade de terapia adicional para a doença ou distúrbio autoimune; por exemplo, no tratamento ou controle de diabetes tipo I, os métodos da invenção podem reduzir ou eliminar a necessidade de administração de insulina exógena no indivíduo. Além disso, os métodos da invenção reduzem vantajosamente a 10 incidência de ou resultam em nenhuma incidência de síndrome de liberação de citocina previamente associada com administração de anticorpos anti-CD3 humano tal como OKT3. A síndrome de liberação de citocina é manifestada por, por exemplo, cefaléia, náusea, vômito, febre, mialgias, artralgias e tremor e pode ser causada por níveis séricos aumentados de, por exemplo, IL-2, IL-6, 15 IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Os métodos também reduzem a incidência e gravidade de outros efeitos adversos, tal como, mas não limitando a, ativação de EBV, imunogenicidade (produção de anticorpos anti-idiotípico, particularmente anticorpos anti-idiotípico de IgE), linfopenia, trombocitopenia e neutropenia.

Em outras modalidades, a invenção fornece métodos para 20 prevenir ou retardar o início de um doença ou distúrbio autoimune em um indivíduo predisposto a desenvolver a citada doença ou distúrbio, mas tal indivíduo ainda tem a experimentar sintomas de ou ser diagnosticado com a citada doença ou distúrbio de acordo com critérios aceitos na técnica (p. ex., na diabetes tipo I, um diagnóstico de acordo com critérios estabelecidos pela 25 Associação de Diabetes Americana: veja, p. ex., Mayfield *et al.*, 2006, Am Fam Physician 58: 1355-1362, incorporados por meio deste como referência aqui em sua totalidade). Em outras modalidades, a administração de uma anticorpo da invenção previne o início e/ou desenvolvimento do distúrbio, previne início de sintomas do distúrbio e/ou retarda o diagnóstico positivo do

citado distúrbio por 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 21 meses, ou 24 meses em relação a um indivíduo com parâmetros clínicos similares que não recebeu tratamento.

De acordo com a invenção, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado para reduzir efeitos adversos, tal como a liberação de citocina associada com administração de anticorpo, ativação de EBV (como evidenciado por doenças linfoproliferativas induzidas por EBV, p. ex., mononucleose) ou linfopenia (definida como <1000 linfócitos/ $\mu$ L de soro), associado com administração de anticorpos anti-CD3 humano e também reduz o número de doses e duração da administração. Conforme aqui utilizado, “curso de tratamento” ou “rodada de tratamento” significa administração de anticorpos anti-Cd3 humano todo dia, dia sim, dia não ou a cada 3 ou 4 dias por um período de tempo, p. ex., até 30 dias. Em modalidades particulares, a invenção fornece um regime de tratamento de administração de uma dose do anticorpo anti-CD3 humano por 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias. Em modalidades preferidas, a administração é efetuada em dias consecutivos, mas pode ser efetuada em dias alternativos ou em um programa que alterne vários dias consecutivos em que o anticorpo anti-CD3 humano é administrado com vários dias consecutivos em que nenhum anticorpo é administrado. Em certas modalidades, a dose administrada é a mesma em cada dia do regime. Entretanto, em modalidades preferidas, a dose administrada aumenta progressivamente nos primeiros poucos dias do regime (p. ex., aumentam progressivamente nos primeiros quatro dias do regime) para reduzir ou eliminar a incidência de síndrome de liberação de citocina.

Em modalidades específicas, a dose administrada é de aproximadamente 5-50  $\mu$ g/kg/dia, de preferência, 20-30  $\mu$ g/kg/dia, de maior preferência, aproximadamente 22-28  $\mu$ g/kg/dia ou aproximadamente 25-26  $\mu$ g/kg/dia. Em outras modalidades específicas, a dose no dia 1 do regime é 1-

3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , de preferência aproximadamente 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  e aumenta progressivamente para a dose diária nos dias 3, 4, 5, 6 ou 7. Por exemplo, no dia 1, ao indivíduo é administrada uma dose de aproximadamente 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , no dia 2 aproximadamente 3,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , no dia 3 5 aproximadamente 6,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , no dia 4 aproximadamente 13  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  e em dias subsequentes do regime 26  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}/\text{dia}$ . Em outro exemplo de acordo com essa modalidade, no dia 1 ao indivíduo pode ser administrada uma dose de aproximadamente 1,42  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , no dia 2 aproximadamente 5,7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , no dia 3 10 aproximadamente 11  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , no dia 4 aproximadamente 22,6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  e em dias subsequentes do regime 45,4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ .

Em modalidades específicas, a dose administrada é baseada em área de superfície. Por exemplo, a dose administrada é de 5-1200  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , de preferência, 51-826  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ . Em certas modalidades a dose no dia 1 do regime é de 5-100  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  e aumenta progressivamente a dose 15 diária que é de aproximadamente 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15 ou 20 vezes aquela da dose do primeiro dia, por exemplo uma dosagem como recitada imediatamente acima, no dia 3, 4, 5, 6 ou 7. Para os primeiros 2, 3, 4, ou 5 dias, a dose pode aumentar em 1,5 vezes, 2 vezes, 3 vezes, ou 4 vezes em cada dia subsequente. Por exemplo, no dia 1, ao indivíduo é administrada uma dose de aproximadamente 51  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 2 20 aproximadamente 103  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 3 aproximadamente 207  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 4 aproximadamente 413  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  e nos dias subsequentes do regime (p. ex., dias 5-14) 826  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ . Em outra modalidade, no dia 1, ao indivíduo é 25 administrada uma dose de aproximadamente 227  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 2 aproximadamente 459  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 3 e dias subsequentes, aproximadamente 919  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ . Em outra modalidade, no dia 1, ao indivíduo é administrada uma dose de aproximadamente 284  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 2 aproximadamente 574  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ , no dia 3 e dias subsequentes, 25 aproximadamente 1148  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ .

Em modalidades específicas, para reduzir a possibilidade de liberação de citocina e outros efeitos adversos, as primeiras 1, 2, 3 ou 4 doses ou todas as dose do regime são administradas mais vagarosamente, em relação à injeção bolus, por administração intravenosa. Por exemplo, uma dose de  $51 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  pode ser administrada por cerca de 5 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 8 horas, cerca de 10 horas, cerca de 12 horas, cerca de 14 horas, cerca de 16 horas, cerca de 18 horas, cerca de 20 horas e cerca de 22 horas. Em certas modalidades, a dose é administrada por infusão lenta por um período de, p. ex., 20 até 24 horas. Em modalidades específicas, a dose é infundida por uma bomba, de preferência aumentando-se a concentração de anticorpo administrado conforme a infusão progrida.

Alternativamente, a dose diária total pode ser dividida em duas ou mais porções iguais e administrada como infusões bolus no dia em intervalos de 6, 8, 10 ou 12 horas. Por exemplo, uma dose de  $13 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}/\text{dia}$  pode ser administrada em quatro doses de  $3-4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  em intervalos de 6 horas para reduzir o nível de liberação de citocina causado pela administração do anticorpo.

Em outras modalidades, uma fração determinada das doses para o regime de  $51 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  até  $826 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  descrito acima é administrada em doses que aumentam progressivamente. Em certas modalidades, a fração é de  $1/10$ ,  $1/4$ ,  $1/3$ ,  $1/2$ ,  $2/3$ , ou  $\frac{3}{4}$  das doses diárias do(s) regime(s) descritos acima. Consequentemente, por exemplo, quando a fração é de  $1/10$ , as doses diárias serão de  $5,1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1,  $10,3 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2,  $20,7 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3,  $41,3 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e  $82,6 \mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de  $1/4$ , as doses serão de  $12,75 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1,  $25,5 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2,  $51 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3,  $103 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e  $207 \mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de  $1/3$ , as doses serão de  $17 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1,  $34,3 \mu\text{g}/\text{m}^2$  no

dia 2, 69 µg/m<sup>2</sup> no dia 3, 137,6 µg/m<sup>2</sup> no dia 4 e 275,3 µg/m<sup>2</sup> nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 1/2, as doses serão de 25,5 µg/m<sup>2</sup> no dia 1, 51 µg/m<sup>2</sup> no dia 2, 103 µg/m<sup>2</sup> no dia 3, 207 µg/m<sup>2</sup> no dia 4 e 413 µg/m<sup>2</sup> nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 2/3, as doses serão de 34 µg/m<sup>2</sup> no dia 1, 69 µg/m<sup>2</sup> no dia 2, 137,6 µg/m<sup>2</sup> no dia 3, 275,3 µg/m<sup>2</sup> no dia 4 e 550,1 µg/m<sup>2</sup> nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 3/4, as doses serão de 38,3 µg/m<sup>2</sup> no dia 1, 77,3 µg/m<sup>2</sup> no dia 2, 155,3 µg/m<sup>2</sup> no dia 3, 309,8 µg/m<sup>2</sup> no dia 4 e 620 µg/m<sup>2</sup> nos dias 5 até 14. Em outras modalidades, o regime é idêntico a um daqueles descritos acima, mas apenas nos dias 1 até 4, dias 1 até 5, ou dias 1 até 6. Por exemplo, em uma modalidade particular, as doses serão de 17 µg/m<sup>2</sup> no dia 1, 34,3 µg/m<sup>2</sup> no dia 2, 69 µg/m<sup>2</sup> no dia 3, 137,6 µg/m<sup>2</sup> no dia 4 e 275,3 µg/m<sup>2</sup> nos dias 5 e 6.

Em outras modalidades, doses no regime são administradas por certo número de dias consecutivos, seguidos por um certo número de dias sem quaisquer doses administradas, seguidos novamente por doses administradas em um certo número de dias consecutivos e assim por diante até, por exemplo, 14 (ou, p. ex., 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20) doses serem administradas no total. Por exemplo, no dia 1, dia 2, dia 3 e dia 4 doses de um dos regimes descritos acima podem ser administradas por quatro dias consecutivos e então três dias sem quaisquer doses e então no dia 5, 6, 7 e 8 doses são administradas, seguidos por outros três dias sem doses e então no dia 9, 10, 11, 12 doses do dia, com três dias fora e finalmente as doses dos dias 13 e 14.

Em certas modalidades, o anticorpo administrado de acordo com esses regime é OKT3γ1(ala-ala), de preferência, administração intravenosa de OKT3γ1(ala-ala), tal como o título sérico do anticorpo administrado em 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 2 semanas, 3 semanas ou 1 mês após o último dia do regime de dosagem (isto é, é administrado para atingir uma dose “farmacologicamente equivalente”).

Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado para atingir certo nível de modulação e cobertura combinada de complexos de receptor de célula T em células T, como determinado por métodos bem conhecidos na técnica, veja, p. ex., Exemplo 11 de publicação 5 de pedido de patente US 2003/0108548, que é por meio deste incorporado como referência em sua totalidade. Em modalidades específicas, o regime de dosagem atinge uma cobertura e modulação de receptor de célula T combinada de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou de 100% com, em modalidades específicas, pouco ou nenhum anticorpo anti-CD3 10 humano livre detectável (por exemplo, menos de 200 ng/mL o fármaco detectado no sangue do paciente por métodos padrões conhecidos na técnica).

Em modalidades específicas, o anticorpo anti-CD3 humano não é administrado por doses diárias por vários dias, mas em vez disso é administrado por infusão de um modo ininterrupto por 4 horas, 6 horas, 8 15 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 20 horas, 24 horas, 30 horas ou 36 horas. A infusão pode ser constante ou pode partir de uma dosagem mais baixa, por exemplo, pelas primeiras 1, 2, 3, 5, 6, ou 8 horas da infusão e então aumentar para um dosagem mais alta daí em diante. No curso da infusão, o paciente recebe uma dose igual à quantidade administrada, por exemplo, nos 20 regimes de dia 5 até 20 expostos acima. Por exemplo, uma dose de aproximadamente 150 µg/m<sup>2</sup>, 200 µg/m<sup>2</sup>, 250 µg/m<sup>2</sup>, 500 µg/m<sup>2</sup>, 750 µg/m<sup>2</sup>, 1000 µg/m<sup>2</sup>, 1500 µg/m<sup>2</sup>, 2000 µg/m<sup>2</sup>, 3000 µg/m<sup>2</sup>, 4000 µg/m<sup>2</sup>, 5000 µg/m<sup>2</sup>, 25 6000 µg/m<sup>2</sup>, 7000 µg/m<sup>2</sup>, 8000 µg/m<sup>2</sup>, ou 9000 µg/m<sup>2</sup>. Em particular, a velocidade e duração da infusão é desenhada para minimizar o nível de anticorpo anti-CD3 humano livre no indivíduo após a administração. Em certas modalidades, o nível de anticorpo anti-CD3 humano livre não deve exceder 200 ng/mL de anticorpo livre. Além disso, a infusão é desenhada para atingir uma cobertura e modulação de receptor de célula T combinadas de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou de 100%.

Em outras modalidades, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado cronicamente para tratar, controlar, manter, prevenir, ou diminuir a progressão de ou retardar o início da doença ou distúrbio autoimune. Por exemplo, em certas modalidades, uma dose baixa do anticorpo anti-CD3 humano é administrada uma vez por mês, duas vezes por mês, três vezes por mês, uma vez por semana ou mesmo mais frequentemente ou como uma alternativa ao regime de dosagem de 6 até 14 dias discutido acima ou após a administração de tal regime para acentuar ou manter seu efeito terapêutico. Tal dose baixa pode estar em qualquer ponto a partir de 1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  até  $100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , de preferência aproximadamente  $5 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $15 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $20 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $25 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $30 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $35 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $40 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ,  $45 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou  $50 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado cronicamente subsequente à administração de um regime de dosagem de 1 até 30 dias como descrito acima, por exemplo, para manter o efeito terapêutico do regime.

Em outras modalidades, o indivíduo pode ser re-dosado em algum momento subsequente à administração do regime de dosagem do anticorpo anti-CD3 humano, de preferência, com base em um ou mais parâmetros fisiológicos, mas pode ser feito uma questão de curso. Tal redosagem pode ser administrada e/ou a necessidade de tal redosagem avaliada 6 meses, 9 meses, 1 ano, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 30 meses ou 3 anos após a administração de um regime de dosagem e pode incluir administrar um curso de tratamento a cada 6 meses, 9 meses, 1 ano, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 30 meses ou 3 anos.

Em modalidades específicas, a indivíduos é administrada uma rodada subsequente de tratamento de anticorpo anti-CD3 humano com base em uma ou uma combinação da razão de células CD4/CD8, contagem de células CD8, inversão CD4/CD3, razão de células CD4/CD25, razão de células CD4/FoxP3, razão de células CD4/CD40, razão de células CD4/IL-10

e/ou razão de células CD4/TGF- $\beta$ . Outros parâmetros para determinar se para administrar uma rodada subsequente de tratamento incluem um aparecimento ou piora de indicadores diagnósticos para a doença autoimune ou distúrbio como descrito aqui e/ou conhecido na técnica. Por exemplo, com respeito à diabetes tipo I, um aparecimento ou aumento em anticorpos anti-célula da ilhota, tal como GADAs, anticorpos IA-2, anticorpos ICA ou anticorpos anti-insulina ou um aparecimento ou aumento nos níveis de célula T específicos para抗ígenos de célula da ilhota. Exemplos adicionais com respeito à diabetes tipo I incluem doses subsequentes onde o número de células  $\beta$  ou atividade ou função de células  $\beta$  diminui em 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% quando comparado ao número de ou atividade ou função células  $\beta$  durante a administração da rodada precedente de tratamento. Função de célula  $\beta$  pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, a resposta do peptídeo C a MMTT, IGTT, IGTT, ou grampo de glicose de duas fases, ou o teste de Liberação de Insulina em Primeira Fase (FPIR), como discutido aqui ou como conhecido na técnica. Outros parâmetros que podem ser usados para determinar ou redosar durante o tratamento ou controle de diabetes tipo 1 inclui os níveis de HA1 ou HA1c, a necessidade de administração de insulina exógena ou aumento na dosagem de insulina exógena por mais de 0,2 U/kg/dia, 0,5 U/kg/dia, 1 U/kg/dia, 2 U/kg/dia, 5 U/kg/dia, ou 10 U/kg/dia. Em outras modalidades, as doses adicionais podem ser administradas com base no aparecimento de ou aumento no número (tal como um aumento de, em média, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 ou 20), duração e/ou gravidade de episódios hipoglicêmicos ou de episódios de cetoacidose em uma base diária, semanal ou mensal.

Em modalidades preferidas, os anticorpos anti-CD3 humano são administrados parenteralmente, por exemplo, intravenosamente, intramuscularmente ou subcutaneamente, ou senão, são administrados oralmente. Os anticorpos anti-CD3 humano também podem ser administrados

como uma formulação de liberação controlada.

Adicionalmente, em certas modalidades, a invenção fornece métodos e regimes para administrar anticorpos anti-CD3 humano que reduzem a gravidade e/ou incidência de efeitos adversos tal como, mas não limitando a, liberação de citocina, apoptose, ativação de EBV, reação imune contra o anticorpo anti-CD3 humano, linfopenia, anemia, neutropenia, trombocitopenia ou infecção secundária.

Em modalidades preferidas da invenção delas, com respeito a tratamento, diminuindo a progressão de, retardando o início de o prevenindo diabetes tipo 1 ou distúrbio, o indivíduo reteve pelo menos 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% ou 20% de função de célula  $\beta$  antes do início de tratamento e, em algumas modalidades, a função de célula  $\beta$  melhora em níveis de pré-tratamento em pelo menos 5%, 10%, 20%, 30% ou 40%.

Em certas modalidades, a predisposição para desenvolvimento de diabetes tipo I de manifesta como um nível de glicose em jejum prejudicado, isto é, pelo menos uma determinação de um nível de glicose de 100-125 mg/dL após jejum (oito horas sem comida), ou uma tolerância a glicose prejudicada em resposta a um teste de tolerância de glicose oral de 75 gramas (OGTT), isto é, pelo menos uma determinação de um nível de glicose de 2 horas de 140-199 mg/dL em resposta a um OGTT de 75. Em outras modalidades, os indivíduos são positivos para um ou mais autoanticorpos reativos contra抗ígenos de células da ilhota, tal como, anticorpos GAD, tal como GAD 65 e/ou GAD 67, IA-2 ou anticorpos anti-insulina. Em outras modalidades, a predisposição para desenvolvimento de diabetes tipo I tem um primeiro ou segundo grau relativo a quem é um diabético tipo 1 diagnosticado. Em certas modalidades, a predisposição é diagnóstico positivo no paciente ou em um primeiro ou segundo grau relativo de acordo com critérios aceitos da técnica de pelo menos outro distúrbio autoimune incluindo, mas não limitando a, doença da tireóide, diabetes tipo 1, artrite

reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, adenopatia endócrina múltipla e doença celíaca. Em algumas modalidades, o distúrbio autoimune é uma doença autoimune relacionada a DR4 ou DR3 de MHC.

Com respeito ao tratamento de diabetes tipo 1 em um paciente diagnosticado e à prevenção/retardo de sintomas desta em um indivíduo predisposto, o anticorpo anti-CD3 humano com toxicidade reduzida é administrado para atingir, ou manter um nível de hemoglobina glicosilada (HA1 ou HA1c) de menos de 8%, menos de 7,5%, menos de 7%, menos de 6,5%, menos de 6%, menos de 5,5% ou 5% ou menos. No início do tratamento, paciente de preferência, têm um nível de HA1 ou HA1c de menos de 8%, menos de 7,5%, menos de 7%, menos de 6,5%, menos de 6%, ou, de maior preferência, de 4%-6% (de preferência, medido na ausência de outro tratamento para diabetes tal como administração de insulina exógena).

Em certas modalidades, uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3 humano) são administradas para prevenir uma redução de massa de célula  $\beta$  associada com diabetes autoimune. Em algumas modalidades, após um ou mais cursos de tratamento com anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de massa de célula  $\beta$  do paciente diminui em menos de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, menos de 50%, menos de 60%, ou menos de 70% dos níveis de pré-tratamento de pelo menos 3 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 1 ano, pelo menos 18 meses, pelo menos 2 anos, pelo menos 3 anos, pelo menos 5 anos, pelo menos 7 anos ou pelo menos 10 anos após o tratamento inicial. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de massa de célula  $\beta$  do paciente é mantém-se pelo menos 99%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 40%, ou pelo menos 30% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4

meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 30 meses, pelo menos 3 anos, pelo menos 5 anos, ou pelo menos 10 anos após a primeira rodada de tratamento.

5                   Em outra modalidade da invenção, com respeito ao tratamento de diabetes tipo 1, após um ou mais cursos de tratamento com anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente mantém-se pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de 10 níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento ou após a primeira rodada de tratamento e a contagem de linfócito média do paciente não é 15 menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou menos de 200 células/mL no mesmo período. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente 20 mantém-se pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento e a contagem de plaquetas 25 média do paciente não é menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou menos de 100.000

plaquetas/mL.

A administração dos anticorpos anti-CD3 previne dano às células da ilhota, retardando desse modo o início da doença ou, uma vez que ocorra doença diagnosticável, progressão de doença, reduzindo e/ou retardando a necessidade de administração de insulina. Além disso, a invenção fornece métodos para tratamento tais que uma única rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), resulta em um nível de HA1 ou HA1c que é de 7% ou menos, 6,5% ou menos, 6% ou menos, 5,5% ou menos, ou 5% ou menos 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento da primeira rodada de tratamento. Especificamente, em tais métodos da invenção, uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), diminui o nível médio de HA1 ou HA1c no paciente em cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65% ou cerca de 70% quando comparado a níveis de pré-tratamento em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento da primeira rodada de tratamento. Além disso, após tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção em uma única rodada de tratamento ou uma rodada de tratamento repetida a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o nível médio de HA1 ou HA1c no paciente aumenta apenas em cerca de 0,5%, cerca de 1%, cerca de 2,5%, cerca de 5%, cerca de

10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, ou cerca de 50% quando comparado a níveis de pré-tratamento em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento ou da primeira rodada de tratamento. Em outras modalidades, após uma única rodada de tratamento ou rodadas de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com os métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o nível médio de HA1 ou HA1c no paciente está maior em cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70% ou maior que cerca de 100% menos que os níveis em um paciente que iniciou tratamento convencional com parâmetros clínicos similares e foi administrado tratamento convencional após a mesma quantidade de tempo, cujos níveis foram determinados em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento ou da primeira rodada de tratamento.

Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado para atingir ou manter a resposta de peptídeo C em um indivíduo que foi diagnosticado com diabetes autoimune, ou tem uma predisposição a esta, como determinado por um teste de tolerância a refeição mista (MMTT), teste de tolerância s glicose oral (OGTT), teste de tolerância intravenosa (IGTT) ou procedimento de grampo de glicose em duas fases. Em modalidades preferidas, os pacientes têm uma resposta de peptídeo C para MMTT, OGTT, IGTT ou procedimento de grampo de glicose em duas fases (de preferência MMTT) que resulta em uma área sob curva (AUC) de pelo menos 80 pmol/mL/240min, de preferência, pelo menos 90 pmol/mL/240min, de maior preferência pelo menos 100 pmol/mL/240min, ou mesmo pelo menos 110 pmol/mL/240min. Além disso, a invenção fornece métodos de

tratamento tais que após uma única rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o nível de 5 resposta de peptídeo C no paciente é pelo menos 99%, pelo menos 98%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, ou pelo menos 60% da resposta de pré-tratamento após a rodada prévia de tratamento ou da primeira rodada de tratamento. Especificamente, em tais métodos da invenção, após uma única 10 rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o nível médio de resposta de peptídeo C a um MMTT, OGTT, 15 IGTT ou procedimento de grampo de glicose em duas fases no paciente diminui em menos de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, menos de 50% dos níveis de pré-tratamento como determinado em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 20 24 meses após a rodada prévia de tratamento ou da primeira rodada de tratamento. Além disso, após uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o nível médio de resposta de 25 peptídeo C a um MMTT, OGTT, IGTT ou procedimento de grampo de glicose em duas fases no paciente está pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% ou 100% maior que os níveis em um paciente que iniciou terapia para diabetes convencional com parâmetros clínicos similares e foi administrada terapia para diabetes convencional pelo período de 6 meses, 9

meses, 12 meses, 15 meses, ou 18 meses ou que não recebeu qualquer terapia, a citada resposta de peptídeo sendo determinada em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio.

Em modalidades específicas, após uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), os pacientes diagnosticados com diabetes autoimune, ou que têm uma predisposição a esta, têm uma resposta de peptídeo C a MMTT, OGTT, IGTT ou procedimento de grampo de glicose em duas fases (de preferência, MMTT) que resulta em uma AUC de pelo menos 40 pmol/mL/240min, 50 pmol/mL/240min, 60 pmol/mL/240min, 70 pmol/mL/240min, 80 pmol/mL/240min, de preferência, pelo menos 90 pmol/mL/240min, de maior preferência pelo menos 100 pmol/mL/240min, ou mesmo pelo menos 110 pmol/mL/240min, a citada resposta determinada 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento ou após a rodada prévia de tratamento.

A determinação de resposta de peptídeo C é uma medida de função de célula  $\beta$  como é conhecido por alguém versado na técnica. Em outras modalidades, a função de célula  $\beta$  ou função de célula  $\beta$  residual é determinada por Liberação de Insulina de Primeira Fase (FPIR). Em modalidades preferidas, os pacientes antes do tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção têm um FPIR de pelo menos 300 pmol/L, pelo menos 350 pmol/L, pelo menos 400 pmol/L, pelo menos 450 pmol/L, pelo menos 500 pmol/L, de preferência, pelo menos 550 pmol/L, de maior preferência pelo menos 600 pmol/L, ou mesmo pelo menos 700 pmol/L. Além disso, a invenção fornece métodos de tratamento tais que após uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a

cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o FPIR é pelo menos 99%, pelo menos 98%, 5 pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, ou pelo menos 60% da resposta de pré-tratamento, o citado FPIR determinado 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após o tratamento prévio ou tratamento inicial. Especificamente, em tais métodos da invenção, após uma 10 única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o FPIR médio no paciente diminui em menos 15 de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, menos de 50% dos níveis de pré-tratamento, o citado FPIR determinado 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após o tratamento prévio. Além disso, após uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a 20 cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), o FPIR médio no paciente está pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% ou 100% maior que os níveis em um paciente que iniciou terapia para diabetes 25 convencional com parâmetros clínicos similares e foi administrada terapia para diabetes convencional pelo período de 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, ou 18 meses, o citado FPIR sendo determinado 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio ou rodada inicial de tratamento. Em modalidades específicas, após uma única rodada de

tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), os pacientes têm um FPIR de pelo menos 300 pmol/L, pelo menos 5

400 pmol/L, de preferência, pelo menos 500 pmol/L, de maior preferência pelo menos 600 pmol/L, ou mesmo pelo menos 700 pmol/L, o citado FPIR determinado em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento ou rodada inicial de tratamento.

10 Em outras modalidades específicas da invenção, com respeito ao tratamento de diabetes tipo 1, no início do tratamento, o indivíduo não requer administração de insulina ou requer menos de 1 U/kg/dia, de preferência menos que 0,5 U/kg/dia, ainda de maior preferência menos que 0,25 U/kg/dia e ainda de maior preferência menos que 0,1 U/kg/dia. Em 15 certas modalidades, um único tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), previne o requerimento para administração de 20 insulina ou retarda a necessidade de administrar insulina em pelo menos 6 meses, pelo menos 1 ano, pelo menos 18 meses, pelo menos 2 anos, pelo menos 30 meses, pelo menos 3 anos, pelo menos 5 anos, pelo menos 7 anos ou pelo menos 10 anos (em média para uma população de pacientes com diabetes tipo 1). Em outras modalidades, um único tratamento ou rodada de 25 tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), resulta ou em uma diminuição (por exemplo, de 10%, 20%, 30%, 40%, ou 50%) na quantidade

de insulina requerida em média por dia, ou em nenhuma alteração na quantidade média de insulina requerida por dia, ou em um aumento de menos de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 20% ou menos de 30% de insulina administrada, em média, por dia quando comparado à dose média de pré-tratamento de insulina por dia. Em certas modalidades, uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), resulta em uma dose diária média de insulina que é 10%, 20%, 50%, 75%, 90%, 99% menos que a dose diária média de insulina requerida para um paciente similarmente situado (isto é, parâmetros químicos similares no começo do período do mês ou ano) que não recebeu o tratamento de anticorpo anti-CD3 humano.

Em outras modalidades, com respeito ao tratamento de um indivíduo diagnosticado com diabetes autoimune, ou tendo uma predisposição a esta, os métodos da invenção resultam em uma redução em episódios hipoglicêmicos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais episódios em um período de um dia, dois dias, 5 dias, 10 dias ou 15 dias quando comparado a pacientes similarmente situados que não foram administrados com o anticorpo anti-CD3 humano da invenção.

Em modalidades específicas, o indivíduo recebeu células da ilhota transplantadas recebeu administração de uma quantidade eficaz profilaticamente ou terapeuticamente do anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção. Em uma modalidade específica, o indivíduo que recebeu células da ilhota transplantadas é um adulto. Em outra modalidade específica, o indivíduo que recebeu células da ilhota transplantadas tem menos que 21 anos de idade ou tem menos que 18 anos de idade.

Com respeito ao tratamento de esclerose múltipla, o anticorpo

anti-CD3 é administrado para atingir ou manter uma pontuação de desabilidade de acordo com a Escala de Desabilidade Expandida de Kurtzke (EDSS) de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, ou 9,0. Além disso, a invenção fornece métodos tais que após um único tratamento ou tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, a cada 2 anos, a cada 2,5 anos, ou a cada 3 anos com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), a pontuação EDSS é a mesma, não mais que meia etapa, não mais que uma etapa, não mais que uma etapa e meia, não mais que duas etapas, não mais que duas etapas e meia, não mais que três etapas, não mais que três etapas e meia, não mais que quatro etapas, não mais que quatro etapas e meia, não mais que cinco etapas, não mais que cinco etapas e meia, não mais que seis etapas, não mais que seis etapas e meia, não mais que sete etapas, não mais que sete etapas e meia, não mais que oito etapas, não mais que oito etapas e meia maior que a pontuação EDSS de pré-tratamento, a citada pontuação determinada 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio. Especificamente, em tais métodos da invenção, após um único tratamento ou tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, a cada 2 anos, a cada 2,5 anos, ou a cada 3 anos com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), a pontuação EDSS média do paciente aumenta em não mais que meia etapa, uma etapa, uma etapa e meia, duas etapas, duas etapas e meia, três etapas, três etapas e meia, quatro etapas, quatro etapas e meia, cinco etapas, cinco etapas e meia, seis etapas, seis etapas e meia, sete etapas, sete etapas e meia, oito etapas, oito etapas e meia em relação à pontuação de pré-tratamento, a citada pontuação determinada 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio. Além disso, após um

único tratamento ou tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, a cada 2 anos, a cada 2,5 anos, ou a cada 3 anos com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), a pontuação EDSS média no paciente está pelo menos meia etapa, uma etapa, uma etapa e meia, duas etapas, duas etapas e meia, três etapas, três etapas e meia, quatro etapas, quatro etapas e meia, cinco etapas, cinco etapas e meia, seis etapas, seis etapas e meia, sete etapas, sete etapas e meia, oito etapas ou oito etapas e meia menor que a pontuação em um paciente que iniciou terapia para esclerose múltipla convencional pelo período de 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 2,5 anos ou 3 anos, a citada pontuação determinada 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após o tratamento prévio. Em modalidades específicas, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 2,5 ano ou 3 anos 15 após tratamento (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), os pacientes têm uma pontuação EDSS de pelo menos 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, ou 9,0.

Em modalidades específicas da invenção, pacientes diagnosticados com esclerose múltipla (p. ex., de acordo com critérios de McDonald) e antes da administração do anticorpo anti-CD3 da invenção têm uma pontuação EDSS de pelo menos 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 ou 9,5.

Em outras modalidades com respeito ao tratamento de esclerose múltipla, o anticorpo anti-CD3 é administrado para atingir redução na frequência, duração e/ou gravidade dos ataques de MS em relação ao mesmo paciente antes da terapia. Além disso, a invenção fornece métodos de tratamento tais que um único tratamento ou tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, a cada 2 anos, a cada 2,5 anos, ou a cada 3 anos com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os

métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), a frequência, duração e/ou gravidade dos ataques de MS são reduzidos em 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% em relação a níveis de pré-tratamento, as citadas determinações feitas 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio. Especificamente, em tais métodos da invenção, após um único tratamento ou tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, a cada 2 anos, a cada 2,5 anos, ou a cada 3 anos com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), a frequência, duração e/ou gravidade dos ataques de MS do paciente aumentam em não mais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% em relação condições de pré-tratamento, as citadas determinações feitas 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio. Além disso, após um único tratamento ou tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, a cada 2 anos, a cada 2,5 anos, ou a cada 3 anos com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3), a frequência, duração e/ou gravidade médias dos ataques de MS são reduzidas em relação a um paciente que iniciou terapia de esclerose múltipla convencional com parâmetros clínicos similares e recebeu administração de terapia de esclerose múltipla convencional pelo período de 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 2,5 anos ou 3 anos, a citada determinação feita em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após o tratamento prévio.

Em outras modalidades com respeito ao tratamento de psoríase, o anticorpo anti-CD3 é administrado para atingir uma redução na pontuação do Índice de Gravidade e Área de Psoríase (PASI) do indivíduo de

pelo menos 20%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, em relação a condições pré-tratamento, as citadas determinações feitas  
5 em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio. Senão os métodos da invenção melhoram a pontuação de avaliação global de um indivíduo em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%,  
10 pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, em relação a condições pré-tratamento, as citadas determinações feitas em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio.

Em outras modalidades com respeito ao tratamento de artrite reumatóide, o anticorpo anti-CD3 é administrado para atingir uma melhora na condição do indivíduo como avaliado por qualquer escala de gravidade de artrite conhecida na técnica (p. ex., escala de gravidade de artrite reumatóide (RASS)) em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo  
15 menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento, as citadas determinações feitas em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio.  
20

Em certas modalidades, o diagnóstico de um distúrbio autoimune ou manifestação de uma predisposição de um distúrbio autoimune é baseado na detecção de linfócitos T citotóxicos (“CTLs”) que reconhecem抗ígenos específicos de doador (isto é, CTLs autorreativos) no sangue periférico do indivíduo e/ou tecido alvo do distúrbio imune. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD3 da invenção é administrado para atingir

uma redução de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, ou pelo menos 85% em número absoluto, ou proporção, dos

5 CTLs autorreativos do indivíduo como determinado por ensaio de imunoponto (*immunospot*) (p. ex., ELISPOT) em relação à condição pré-tratamento, as citadas determinações feitas 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após o tratamento prévio.

Em modalidades preferidas, o paciente está abaixo de 21 anos  
10 de idade, 18 anos de idade, abaixo de 15 anos de idade, abaixo de 12 anos de idade, abaixo de 9 anos de idade, ou abaixo de 5 anos de idade ou da infância até 3 anos de idade, de 2 até 5 anos de idade, de 5 até 9 anos de idade, de 9 até 12 anos de idade, de 12 até 20 anos de idade. Em outras modalidades, o paciente é um adulto.

15 A invenção também fornece métodos de terapia de combinação. Os métodos da invenção podem ser efetuados em combinação com qualquer tratamento padrão para a indicação particular, tal como tratamentos anti-inflamatórios e/ou imunossupressores padrões administrados para o tratamento ou melhora de doenças autoimunes. Por exemplo, com  
20 respeito ao tratamento de diabetes tipo 1, a terapia de anticorpo anti-CD3 humano da invenção pode ser administrada junto com outras terapias para diabetes, tal como, mas não limitando a, administração de insulina, exenatídeo, pramlintídeo ou uma combinação desses. Com respeito ao tratamento de esclerose múltipla, a terapia de anticorpo anti-CD3 humano da  
25 invenção pode ser administrada com outras terapias conhecidas na técnica para o tratamento de esclerose múltipla, tal como, mas não limitando a, administração de interferon beta (p. ex., AVONEX®, BETASERON® e REBIF®), imunossupressor (p. ex., mitoxantrona), copolímero de proteína básica de mielina 1 (p. ex., COPAXONE®), ou uma combinação destes. Os

anticorpos de CD3 da invenção podem adicionalmente ser administrados com outras terapias tal como anticorpos anti-IL-2, antagonistas de citocina e terapias esteroidais (por exemplo, mas não limitando a, glicocorticóides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, 5 triancinolona, azulfifina, etc.), anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDS), tal como, mas não limitando a aspirina, ibufreno, diclofenac, etodolac, fenoprofen, indometacina, cetolorac, oxaprozina, nabumetona, sulindac, tolmentina, naproxeno, ou cetoprofeno, imunossupressores, tais como, metotrexato ou ciclosporina e inibidores de TNF- $\alpha$ , tais como, mas não limitando a, etanercept e infliximab. Em certas modalidades da invenção, indivíduos que se tornaram refratários a tratamentos convencionais são tratados usando métodos da invenção. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado em combinação com um ou mais抗ígenos de célula de ilhota, tal como GAD, IA-2 ou outros抗ígenos que são ligados 10 por autoantígenos encontrados em pacientes com diabetes tipo 1.

15

A invenção, em outras modalidades, fornece métodos para produzir anticorpos anti-CD3 humano, particularmente anticorpos derivados de OKT3, tais como, mas não limitando a, OKT $\gamma$ 1 (ala-ala), em células CHO. Em modalidades particulares, a invenção fornece métodos para produzir 20 anticorpos anti-CD3 humano compreendendo (a) cultivar células CHO que foram transfetadas com o vetor de expressão pMGX1303, ou progênie dessas, em meios sob condições adequadas para a expressão do citado anticorpo anti-CD3 humano; e (b) recuperar o citado anticorpo anti-CD3 humano a partir dos citados meios.

25 **3.1 TERMINOLOGIA**

Conforme aqui utilizado, o termo “cerca de” ou “aproximadamente”, quando usado em conjunto com um número, se refere a qualquer número dentro de 1, 5 ou 10% do número referenciado ou dentro de erro experimental típico de métodos usados para medição.

Conforme aqui utilizado, o termo “análogo” no contexto de polipeptídeos se refere a um polipeptídeo que possui uma função idêntica ou similar conforme um segundo polipeptídeo, mas não necessariamente compreende uma sequência de aminoácidos idêntica ou similar do segundo 5 polipeptídeo, ou possui uma estrutura idêntica ou similar ao segundo polipeptídeo. Um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos similar se refere a um segundo polipeptídeo que satisfaz pelo menos um dos seguintes: (a) um polipeptídeo que têm uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, 10 pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos de um segundo polipeptídeo; (b) um polipeptídeo codificado por uma sequência nucleotídica que se hibridiza sob condições estringentes a uma 15 sequência nucleotídica codificando um segundo polipeptídeo de pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 40 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 50 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 60 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 100 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos contíguos, ou pelo menos 150 resíduos de 25 aminoácidos contíguos; e (c) um polipeptídeo codificado por uma sequência nucleotídica que possui pelo menos pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de

identidade com a sequência nucleotídica codificando um segundo polipeptídeo. Um polipeptídeo com estrutura similar a um segundo polipeptídeo se refere a um polipeptídeo que tem uma estrutura secundária, terciária ou quaternária similar ao segundo polipeptídeo. A estrutura de um 5 polipeptídeo pode ser determinada por métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo, mas não limitando a, sequenciamento peptídico, cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular e microscopia eletrônica por cristalografia.

Para determinar a identidade porcentual de duas sequências de 10 aminoácidos ou de duas sequências de ácido nucleico, as sequências são alinhadas para fins de comparação ótima (p. ex., interrupções podem ser introduzidas na sequência de uma primeira sequência de aminoácidos ou ácido nucleico para alinhamento ótimo com uma segunda sequência de aminoácidos ou ácido nucleico). Os resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos 15 em posições de aminoácidos ou posições nucleotídicas correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo como a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição. A identidade porcentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de identidade = número de posições de sobrepostas idênticas/número total de posições x 100%). Em uma modalidade, as duas sequências têm o 20 mesmo comprimento.

A determinação de identidade porcentual entre duas 25 sequências também pode ser realizada usando um algoritmo matemático. Um exemplo preferido, não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul, 1990, Proc Natl Acad USA 87: 2264-2268, modificado como em Karlin e Altschul, 1993, Proc Natl Acad USA 90: 5873-5877. Tal algoritmo é incorporado nos

programas NBLAST e XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, J Mol Biol 215: 403. Buscas nucleotídicas de BLAST podem ser realizadas com os parâmetros do programa nucleotídico NBLAST ajustados, p. ex., para pontuação=100, comprimento de palavra=12 para obter sequências nucleotídicas homólogas a moléculas de ácido nucleico da presente invenção. Buscas proteicas de BLAST podem ser realizadas com os parâmetros do programa XBLAST ajustados, p. ex., para pontuação=50, comprimento de palavra=3 para obter sequências de aminoácidos homólogas a moléculas proteicas da presente invenção. Para obter alinhamentos interrompidos para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altshul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Senão, PSI-BLAST pode ser usado para realizar uma busca iterada que detecta relações distantes entre moléculas (*Id.*). Quando se utiliza os programas BLAST, Gapped BLAST e PSI-BLAST, os parâmetros padrões dos respectivos programas (p. ex., XBLAST e NBLAST) podem ser usados (veja, p. ex., portal do NCBI). Outro exemplo preferido, não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de sequências é o algoritmo de Myers e Miller, 1988, CABIOS 4: 11-17. Tal algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que é parte do pacote de programas de alinhamento de sequências GCG. Quando se utiliza o programa ALIGN para comparar sequências de aminoácidos, uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de interrupção de 12 e uma penalidade de interrupção de 4 podem ser usadas.

A identidade porcentual entre duas sequências pode ser determinada usando técnicas similares àquelas descritas acima, com ou sem permitir interrupções. No cálculo de identidade porcentual, tipicamente apenas pareamentos exatos são contados.

Conforme aqui utilizado, o termo “análogo” no contexto de um análogo não proteináceo se refere a uma segunda molécula orgânica ou

inorgânica que possui uma função similar ou idêntica a uma primeira molécula orgânica ou inorgânica e é estruturalmente similar à primeira molécula orgânica ou inorgânica.

Conforme aqui utilizado, o termo “antagonista” e “antagonistas” se referem a qualquer proteína, polipeptídeo, peptídeo, anticorpo, fragmento de anticorpo, molécula grande ou molécula pequena (menos de 1 kD) que bloqueia, inibe, reduz ou neutraliza a função, atividade e/ou expressão de outra molécula. Em várias modalidades, um antagonista reduz a função atividade e/ou expressão de outra molécula em pelo menos 5 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% em relação a um controle tal como salina tamponado com 15 fosfato (PBS).

Conforme aqui utilizado, os termos “anticorpo” e “anticorpos” se referem a anticorpos monoclonais, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), 20 anticorpos Fvs ligados por dissulfeto (sdFv) e anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, p. ex., anticorpos anti-Id para anticorpos da invenção) e fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos acima. Em particular, anticorpos incluem moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas 25 que contêm um sítio de ligação a antígeno. Moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo (p. ex., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (p. ex., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) ou subclasse.

Conforme aqui utilizado, o termo “peptídeo C” se refere a um peptídeo de 31 aminoácidos clivado a partir da pró-insulina conforme ela é

convertida em insulina. A pró-insulina consiste em uma cadeia A, um peptídeo de conexão (peptídeo C) e uma cadeia B. Após a pró-insulina ser clivada, o peptídeo C permanece nos grânulos secretórios de células beta no pâncreas com a insulina e é co-secretado com a insulina em resposta a estimulação por glicose. O peptídeo C é assim liberado a partir do pâncreas em quantidades equimolares com a insulina e pode ser usado como um marcador de produção de insulina endógena.

Conforme aqui utilizado, o termo “derivado” no contexto de polipeptídeos se refere a um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos que foi alterado pela introdução de substituições, deleções ou adições de resíduos de aminoácidos. O termo “derivado” conforme aqui utilizado também se refere a um polipeptídeo que foi modificado, isto é, pela adesão covalente de qualquer tipo de molécula ao polipeptídeo. Por exemplo, mas não por modo de limitação, um anticorpo pode ser modificado, p. ex., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagens proteolíticas, ligação a um ligante ou outra proteína celular, etc. Um polipeptídeo derivado pode ser produzido por modificações químicas usando técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica, incluindo, mas não limitando a clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, um polipeptídeo derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos. Um derivado de polipeptídeo possui uma função similar ou idêntica conforme o polipeptídeo a partir do qual ele foi derivado.

Conforme aqui utilizado, o termo “distúrbio” e “doença” são usado alternadamente para referirem-se a uma patologia em um indivíduo. Em particular, o termo “doença autoimune” é usado alternadamente com o termo “distúrbio autoimune” para referir-se a uma patologia em um indivíduo caracterizada por injúria celular, tecidual e/ou a órgãos causada por uma reação imunológica do indivíduo para suas próprias células, tecidos e/ou

órgãos.

Conforme aqui utilizado, o termo “epítopos” se refere a fragmentos de um polipeptídeo ou proteína que têm atividade antigênica ou imunogênica em um animal, de preferência em um mamífero e da maior preferência em um humano. Um epítopo que tem uma atividade imunogênica é um fragmento de um polipeptídeo ou proteína que elicitá uma resposta de anticorpo em um animal. Um epítopo que tem atividade antigênica é um fragmento de um polipeptídeo ou proteína ao qual um anticorpo se liga imunoespecificamente como determinado por qualquer método bem conhecido por alguém versado na técnica, por exemplo, por imunoensaios. Epítopos antigênicos não precisam necessariamente ser imunogênicos.

Conforme aqui utilizado, o termo “região Fc” é usado para definir uma região C-terminal de uma cadeia pesada de IgG. Embora os limites possam variar levemente, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é definida por estender-se de Cys226 até a extremidade carbóxi-terminal. A região Fc de uma IgG compreende dois domínios constantes, CH2 e CH3. O domínio CH2 de uma região Fc de IgG humana geralmente se estende do aminoácido 231 até o aminoácido 341. O domínio CH3 de uma região Fc de IgG humana geralmente se estende do aminoácido 342 até 447. A região Fc de uma IgG compreende dois domínios constantes, CH2 e CH3. O domínio CH2 de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio “C $\gamma$ 2”) geralmente se estende do aminoácido 231-340. O domínio CH2 é único em que ele não está intimamente pareado com outro domínio. Em vez disso, duas cadeias de carboidrato ramificadas ligadas por N são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma IgG nativa intacta.

Por todo o presente relatório descritivo, a numeração dos resíduos em uma cadeia pesada de IgG é aquela do índice EU como em Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, NH1. MD (1991), expressamente incorporadas aqui como

referências. O “índice EU como em Kabat” se refere à numeração do anticorpo EU de IgG1 humana.

A “região de dobra” geralmente é definida como se estendendo de Glu216 até Pro230 de IgG1 humana. Regiões de dobra de outros isotipos 5 de IgG podem ser alinhadas com a sequência de IgG1 colocando-se os primeiros e últimos resíduos de cisteína formando ligações S-S inter-cadeia pesada nas mesmas posições.

Conforme aqui utilizado, o termo “fragmento” se refere a um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de 10 pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 40 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 60 resíduos de 15 aminoácidos contíguos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 100 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 150 resíduos 20 de aminoácidos contíguos, pelo menos 175 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 200 resíduos de aminoácidos contíguos, ou pelo menos 250 resíduos de aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos de outro polipeptídeo. Em uma modalidade específica, um fragmento de um polipeptídeo retém pelo menos uma função do polipeptídeo.

Conforme aqui utilizado, o termo “fragmento funcional” se 25 refere a um peptídeo ou polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos de pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 40 resíduos de

aminoácidos contíguos, pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 60 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 100 resíduos  
5 de aminoácidos contíguos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 150 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 175 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 200 resíduos de aminoácidos contíguos, ou pelo menos 250 resíduos de aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos de segundo polipeptídeo, diferente,  
10 em que o citado peptídeo ou polipeptídeo retém pelo menos uma função do segundo polipeptídeo, diferente.

Conforme aqui utilizado, o termo “proteína de fusão” se refere a um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de uma primeira proteína ou fragmento funcional, análogo ou derivado desse e uma  
15 sequência de aminoácidos de uma proteína heteróloga (isto é, uma segunda proteína ou fragmento funcional, análogo ou derivado desse). Em modalidades particulares, uma proteína de fusão compreende uma molécula de ligação a CD3 e uma proteína heteróloga, polipeptídeo ou peptídeo.

Conforme aqui utilizado, o termo “célula hospedeira” se refere à célula individual particular transfetada com uma molécula de ácido nucleico e a progénie ou progênie potencial de tal célula. A progênie de tal célula pode não ser idêntica à célula parental transfetada com a molécula de ácido nucleico devido a mutações ou influências ambientais que podem ocorrer em gerações sucessivas ou integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.  
25

Conforme aqui utilizado, o termo “se hibridiza sob condições estringentes” descreve condições para hibridização e lavagem sob as quais sequências nucleotídicas com pelo menos 60% (65%, 70% de preferência 75%, 80% ou 85% e de maior preferência, 90% ou 95%) de identidade umas

com as outras permanecem tipicamente hibridizadas umas as outras. Tais condições estringentes são conhecidas por aqueles versados na técnica e podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1989) 6.3.1-6.3.6. Em um, exemplo não limitante 5 condições de hibridização estringente são hibridização em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,1X, SDS 0,2% em cerca de 68°C. Em um exemplo preferido, não limitante condições de hibridização estringente são hibridização em SSC 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais 10 lavagens em SSC 0,2 X, SDS 0,1% em 50-65°C (isto é, uma ou mais lavagens a 50°C, 55°C, 60°C ou 65°C). Entende-se que os ácidos nucleicos da invenção não incluem moléculas de ácido nucleico que se hibridizam sob essas condições somente a uma sequência nucleotídica que consiste em apenas nucleotídeos A ou T.

15 Conforme aqui utilizado, o termo “episódio hipoglicêmico” se refere a um nível de glicose sanguíneo em um indivíduo de menos de 60 mg/dL que resulta em sintomas típicos de hipoglicemia tal como encharque de suor, náusea, visão borrada (p. ex., vendo pontos), instabilidade, lábios e/ou língua dormente, irritabilidade, desmaio, pele pegajosa, confusão, 20 nervosismo, fraqueza e/ou batimento cardíaca rápido.

Conforme aqui utilizado, o termo “agente imunomodulatório” e variações deste se referem a um agente que modula um sistema imune do hospedeiro. Em certas modalidades, um agente imunomodulatório é um agente imunossupressor. Em certas outras modalidades, um agente 25 imunomodulatório é um agente imunoestimulatório. Agentes imunomodulatórios incluem, mas não estão limitados a, moléculas pequenas, peptídeos, polipeptídeos, proteínas de fusão, anticorpos, moléculas inorgânicas, agentes miméticos e moléculas orgânicas.

Conforme aqui utilizado, o termo “se liga

imunoespecificamente a um antígeno” e termos análogos se referem a peptídeos, polipeptídeos, proteínas de fusão e anticorpos ou fragmentos desses que se ligam especificamente a um antígeno ou um fragmento e não se ligam especificamente a outros抗ígenos. Um peptídeo ou polipeptídeo que

5 se liga imunoespecificamente a um antígeno pode se ligar a outros peptídeos ou polipeptídeos com afinidade mais baixa como determinado, p. ex., por imunoensaios, BIACore, ou outros ensaios conhecidos na técnica. Anticorpos ou fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um antígeno pode reagir cruzadamente com抗ígenos relacionados. De preferência, anticorpos ou

10 fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um antígeno não reagem cruzadamente com outros抗ígenos.

Conforme aqui utilizado, o termo “se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3” e termos análogos se referem a peptídeos, polipeptídeos, proteínas de fusão e anticorpos ou fragmentos desses que se ligam especificamente a um polipeptídeo CD3 ou um fragmento deste e não se ligam especificamente a outros polipeptídeos. Um peptídeo ou polipeptídeo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 pode se ligar a outros peptídeos ou polipeptídeos com afinidade mais baixa como determinado, p. ex., por imunoensaios, BIACore, ou outros ensaios

15 conhecidos na técnica. Anticorpos ou fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 podem reagir cruzadamente com抗ígenos relacionados. De preferência, anticorpos ou fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 ou fragmento desse não reagem cruzadamente com outros抗ígenos. Anticorpos ou fragmentos que se

20 ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 podem ser identificados, por exemplo, por imunoensaios, BIACore, ou outras técnicas conhecidas por aqueles na técnica. Um anticorpo ou fragmento desse se liga especificamente a um polipeptídeo CD3 quando ele se liga a um polipeptídeo CD3 com afinidade mais alta que a qualquer抗ígeno de reação cruzada como

25

determinado usando técnicas experimentais, tais como radioimunoensaios (RIA) e ensaios imunoadsorventes ligados a enzima (ELISAs). Veja, p. ex., Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, Nova Iorque nas páginas 332-336 para uma discussão quanto à especificidade de anticorpo.

Conforme aqui utilizado, o termo “em combinação” se refere ao uso de mais de um agente profilático e/ou terapêutico. O uso do termo “em combinação” não restringe a ordem em que agentes profiláticos e/ou terapêuticos são administrados a um indivíduo com uma doença ou distúrbio.

Um primeiro agente profilático ou terapêutico pode ser administrado antes (p. ex., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, ou 12 semanas após) da administração de um segundo agente profilático ou terapêutico (diferente do primeiro agente profilático ou terapêutico) a um indivíduo com uma doença ou distúrbio.

Conforme aqui utilizado, o termo “isolado” no contexto de um peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo se refere a um peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo que é consideravelmente livre de material celular ou proteínas contaminantes da célula ou fonte tecidual a partir da qual ele é derivado, ou consideravelmente livre de precursores químicos ou outras substâncias químicas quando sintetizado quimicamente. A linguagem “consideravelmente livre de material celular” inclui preparações de peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo em que o peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo é separado de componentes celulares das células a partir das quais ele é isolado ou produzido recombinantemente. Assim, um peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo que é consideravelmente livre de material celular inclui preparações de um peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo que

tem menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (por peso seco) de proteína heteróloga (também referida como “proteína contaminante”). Quando o peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo é produzido recombinantemente, ele também é de preferência, consideravelmente livre de meio de cultura, isto é, o meio de cultura representa menos de cerca de 20%, 10% ou 5% do volume da preparação de proteína. Quando o peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo é produzido por síntese química, ele é de preferência consideravelmente livre de precursores químicos ou outras substâncias químicas, isto é, ele é separado de precursores químicos ou outras substâncias químicas que estão envolvidas na síntese do peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo. Consequentemente, tais preparações de um peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo têm menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (por peso seco) de precursores químicos ou compostos fora o peptídeo, polipeptídeo, proteína de fusão ou anticorpo de interesse. Em uma modalidade preferida, uma molécula de ligação a CD3 é isolada. Em outra modalidade preferida, um anticorpo anti-CD3 humano é isolado.

Conforme aqui utilizado, o termo “isolado” no contexto de moléculas de ácido nucleico se refere a uma molécula de ácido nucleico que é separada de outras moléculas de ácido nucleico que estão presentes na fonte natural da molécula de ácido nucleico. Além disso, uma molécula de ácido nucleico “isolada”, tal como uma molécula de cDNA, pode ser consideravelmente livre de outro material celular, ou meio de cultura quando produzida por técnicas recombinantes, ou consideravelmente livre de precursores químicos ou outras substâncias químicas quando sintetizado quimicamente e pode ser livre de cDNA ou outras moléculas de DNA genômico, p. ex., foi isolada de outros clones em uma biblioteca de ácido nucleico. Em uma modalidade preferida, uma molécula de ácido nucleico que codifica uma molécula de ligação a CD3 é isolada. Em outra modalidade

preferida, uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-CD3 humano é isolada.

Conforme aqui utilizado, os termos “não responsivo” e “refratário” descrevem pacientes tratados com um agente profilático ou terapêutico atualmente disponível para um distúrbio autoimune que não é clinicamente adequado para abrandar um ou mais sintomas associados com o distúrbio imune. Tipicamente, tais pacientes sofrem de doença grave, persistentemente ativa e requerem terapia adicional para melhorar os sintomas associados com seus distúrbios autoimunes.

Conforme aqui utilizado, o termo “início” de doença com referência a diabetes tipo 1 se refere a um paciente que confluí com os critérios estabelecidos para diagnóstico de diabetes tipo 1 pela Associação de Diabetes Americana (veja, Mayfield *et al.*, 2006, Am Fam Physician 58: 1355-1362).

Conforme aqui utilizado, os termos “ácido nucleicos” e “sequências nucleotídicas” incluem moléculas de DNA (p. ex., cDNA ou DNA genômico), moléculas de RNA (p. ex., mRNA), combinações de moléculas de DNA e RNA ou moléculas de DNA/RNA híbridas e análogos de moléculas de DNA ou RNA. Tais análogos podem ser gerados usando, por exemplo, análogos nucleotídicos, que incluem, mas não estão limitados a, bases de inosina ou trilitadas. Tais análogos também podem compreender moléculas de DNA ou RNA compreendendo cernes modificados que proporcionam atributos benéficos às moléculas tal como, por exemplo, resistência a nuclease ou uma habilidade aumentada para cruzar membranas celulares. Os ácidos nucleicos ou sequências nucleotídicas podem ser de simples fita, de dupla fita, podem conter tanto porções de simples fita como de dupla fita e podem conter porções de tripla fita, mas de preferência são DNA dupla fita.

Conforme aqui utilizado, os termos “agente profilático” e

“agentes profiláticos” se referem a moléculas de ligação a CD3 que podem ser usadas na prevenção, tratamento, controle ou melhora de um ou mais sintomas de uma doença autoimune. Em certas modalidades, o termo “agente profilático” se refere a anticorpos anti-CD3 humano (p. ex., OKT3 e variantes 5 e derivados deste).

Conforme aqui utilizado, o termo “quantidade profilaticamente eficaz” se refere àquela quantidade de uma molécula de ligação a CD3 suficiente para prevenir o desenvolvimento, recorrência ou início de um ou mais sintomas de um distúrbio. Em certas modalidades, o termo “quantidade profilaticamente eficaz” se refere à quantidade de um anticorpo anti-CD3 humano suficiente para prevenir o desenvolvimento, recorrência ou início de 10 um ou mais sintomas de um distúrbio.

Conforme aqui utilizado, o termo “prevenir”, “prevenindo” e “prevenção” se referem à prevenção da recorrência ou início de um ou mais 15 sintomas de um distúrbio autoimune ou inflamatório em um indivíduo resultando da administração de um agente profilático ou terapêutico.

Conforme aqui utilizado, um “protocolo” inclui programas de dosagem e regimes de dosagem. Os protocolos aqui são métodos de uso e incluem protocolos profiláticos e terapêuticos. Um “regime de dosagem” ou 20 “curso de tratamento” pode incluir a administração de várias doses de um agente terapêutico ou profilático por 1 até 20 dias.

Conforme aqui utilizada, a expressão “efeitos colaterais” abrange efeitos indesejados e adversos de um agente terapêutico ou 25 profilático. Efeitos adversos são sempre indesejados, mas efeitos indesejados não são necessariamente adversos.

Conforme aqui utilizado, os termos “indivíduo” e “paciente” são usados alternadamente. Conforme aqui utilizado, os termos “indivíduo” e “indivíduos” se referem a um animal, de preferência um mamífero incluindo um não primata (p. ex., uma vaca, porco, cavalo, gato, cachorro, rato e

camundongo) e um primata (p. ex., um macaco ou um humano) e de maior preferência um humano.

Conforme aqui utilizado, o termo “sinergístico” se refere a uma combinação de agentes profiláticos ou terapêuticos que é mais eficaz que os efeitos aditivos do agente na combinação quando administrado individualmente. Um efeito sinergístico de uma combinação de agentes profiláticos ou terapêuticos pode permitir o uso de dosagens mais baixas de um ou mais agentes e/ou administração menos frequente dos citados agentes a um indivíduo com um distúrbio autoimune. A habilidade para utilizar dosagens mais baixas de agentes profiláticos ou terapêuticos e/ou para administrar os citados agentes menos frequentemente reduz a toxicidade associada com a administração dos citados agentes a um indivíduo sem reduzir a eficácia dos citados agentes na prevenção ou tratamento de distúrbios autoimunes. Além disso, um efeito sinergístico pode resultar em eficácia melhorada de agentes na prevenção ou tratamento de distúrbios autoimunes. Finalmente, efeito sinergístico de uma combinação de agentes profiláticos ou terapêuticos pode evitar ou reduzir efeitos colaterais adversos ou indesejados associados com terapia de agente único.

Conforme aqui utilizado, os termos “agente terapêutico” e “agentes terapêuticos” se referem a moléculas de ligação a CD3 que podem ser usadas na prevenção, tratamento, controle ou melhora de um ou mais sintomas de uma doença autoimune ou inflamatória. Em certas modalidades, o termo “agente terapêutico” se refere a anticorpos anti-CD3 humano (p. ex., OKT3 e variantes e derivados deste).

Conforme aqui utilizado, o termo “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere àquela quantidade de um agente terapêutico suficiente para resultar em melhora de um ou mais sintomas de um distúrbio. Com respeito à diabetes, uma quantidade terapeuticamente eficaz de preferência se refere à quantidade de agente terapêutico que reduz

requerimentos de insulina diária média do indivíduo em pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%.

Conforme aqui utilizado, os termos “tratar”, “tratamento” e “tratando” se referem à melhora de um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune ou inflamatório que resulta da administração de uma ou mais moléculas de ligação a CD3. Em particular, tais termos se referem à melhora de um ou mais sintomas associados com um distúrbios autoimunes que resulta da administração de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano.

#### **4. DESCRIÇÃO DA FIGURAS**

FIGS. 1A e 1B. Sequências de regiões variáveis de OKT3. A FIG. 1A e a FIG. 1B mostram os alinhamentos da sequência (linha 1) de aminoácidos de domínio variável da cadeia leve de OKT3 (FIGS. 1A) (SEQ ID NO: 1) e da cadeia pesada (FIGS. 1B) (SEQ ID NO: 5), a sequência de domínio variável dos anticorpos humanos escolhidos como estrutura aceitadora de cadeia pesada e leve (linha 2) (SEQ ID Nos: 2 e 6, respectivamente) e as sequências de domínio variável de OKT3 humanizado (linhas 3-5) (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9). As escolhas de CDR são isoladamente sublinhadas. Linhas 3-5 mostram apenas diferenças a partir da sequência aceitadora humana, com as diferenças não CDR mostradas com duplo sublinhado. Tracejados indicam interrupções introduzidas nas sequências para maximizar o alinhamento. A numeração é como em Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, NH1. MD (1991), que é incorporada aqui como referência.

FIGS. 2A-2D. FIGS. 2A e 2B, sequências de aminoácidos e nucleotídica, respectivamente, da cadeia leve de OKT3 $\gamma$ 1 humanizado (SEQ

ID Nos: 10 e 11, respectivamente). FIGS. 2C e 2D, sequências de aminoácidos e nucleotídica, respectivamente, da cadeia pesada de OKT3 $\gamma$ 1 humanizado (ala-ala) (SEQ ID Nos: 12 e 13, respectivamente).

FIG. 3. Representação esquemática de vetor de expressão em mamífero pMGX1303, contendo regiões codificantes para OKT3 humanizado e capaz de promover a expressão do anticorpo humanizado em célula CHO.

## 5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos para tratar, prevenir, diminuir a progressão de, ou melhorar os sintomas de doenças ou distúrbios autoimunes usando proteínas, particularmente, anticorpos, direcionados contra o complexo CD3 associado com o receptor de célula T humana ou TcR. Em modalidades particulares, o anticorpo se liga à subunidade epsilon do complexo CD3. Os métodos da invenção podem ser usados com qualquer anticorpo anti-CD3 humano apresentado aqui ou conhecido na técnica, p. ex., OKT3, ChAgyCD3 (TRX4<sup>TM</sup>), HUM291 (visilizumab; Nuvion<sup>TM</sup>), UCHT1, Leu4, 500A2, CLB-T3/3, BMA030 e YTH 12,5 e variações ou derivados desse. Em uma modalidade da invenção o anticorpo é OKT3, de preferência versões humanizadas de OKT3 ou um anticorpo que compete pela ligação, por exemplo, como determinado por ensaio de imunoprecipitação ou ELISA, com OKT3. Em outra modalidade, o anticorpo é OKT3 humanizado, que foi modificado em um ou mais resíduos de aminoácidos para exibir ativação de célula T e/ou ligação a FcR reduzidas quando comparado com um anticorpo OKT3 humanizado não modificado, tal como tendo uma alanina, p. ex., no resíduo número 234 do domínio Fc e uma alanina, p. ex., no resíduo número 235 do domínio Fc. De preferência, os anticorpos anti-CD3 humano são administrados em dosagens mais baixas ou por períodos mais curtos de tempo que regimes de dosagem anteriores. Em particular, a invenção contempla regimes de dosagem em que menos de 9.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  e de preferência, menos de 8.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , menos de 7.500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , menos de 7.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou menos de

6.000 µg/m<sup>2</sup> de anticorpo anti-CD3 humano total pela duração da dosagem, particularmente de OKT3γ1 (ala-ala) administrado intravenosamente, ou a quantidade farmacológica equivalente de outro anticorpo anti-CD3 humano desta dose de OKT3γ1 (ala-ala) administrado intravenosamente e/ou qualquer 5 anticorpo anti-CD3 humano administrado por uma rota de administração fora intravenosamente, assim como métodos de dosagem crônica e métodos de redosagem ou dosagem repetida.

Anticorpos monoclonais anti-CD3 são agentes imunossupressores potente direcionados contra um complexo proteico 10 invariante associado com o TcR humano (Van Wauwe, 1980, J Immunol 124: 2708). Acredita-se que os complexos CD3 sejam estruturas acessórias que transduzem os sinais de ativação iniciados na ligação do TcR a seu ligante. A 15 ligação do anticorpo anti-CD3 OKT3 ao TcR medeia o bloqueio de TcR e inibe reconhecimento de aloantígeno e citotoxicidade mediada por célula (Landegren *et al.*, 1982, J Exp Med 155: 1579; van Seventer *et al.*, 1987, J Immunol 139: 2545; Weiss *et al.*, 1986, Ann Rev Immunol 4: 593). Entretanto, a administração de alguns anticorpos direcionados a célula imune, 20 incluindo OKT3 e outros anticorpos anti-CD3, pode induzir ativação de célula T, incluindo a liberação sistemática de várias citocinas, incluindo IL-2, IL-6, TNF-α e IFN-γ (Abramowicz, 1989, Transplantation 47: P606; Chatenoud, 1989, N Eng J Med 320: 1420-1421). Esta produção de citocinas foi 25 correlacionada com os efeitos colaterais adversos frequentemente observados após a primeira injeção de mAbs (van Wauwe, 1980, J Immunol 124: 2708; Chatenoud, 1989, N Eng J Med 320: 1420-1421; Thistlethwaite, 1988, Am J Kidney Dis 11: 112-9) e pode aumentar a produção de anticorpos anti-isotípicos e anti-idiotípicos que ocorrem em alguns pacientes após uma ou duas semanas de tratamento. A resposta imune pode neutralizar o anticorpo específico, assim como outros anticorpos da mesma classe (isotipo) e impedir tratamentos subsequentes (Thistlethwaite, 1988, Am J Kidney Dis 11: 112-9).

Vários peças de evidências sugerem fortemente que esses efeitos colaterais são uma consequência da ligação cruzada entre linfócitos T e células portadoras de receptor Fc (FcR) através da porção Fc de anticorpos, incluindo por exemplo, OKT3, resultando em ativação de ambos os tipos celulares (Debets, 1990, J Immunol 144: 1304; Krutman, 1990, J Immunol 145: 1337): 1) mAbs anti-CD3 não estimulam proliferação de célula T *in vitro*, a menos que o antícorpo tenha sido imobilizada em plástico ou ligado a célula apresentadoras de antígeno FcR+ incluídas na cultura (van Lier, 1989, Immunol 68: 45); 2) a ligação cruzada de OKT3 através de FcRs I e II acentuou a proliferação em resposta a IL-2, *in vitro* (van Lier, 1987, J Immunol 139: 2873); 3) proliferação de célula T murinas induzidas por 145-2C11, um anticorpo monoclonal de criceto direcionado contra o complexo CD3 murino, poderia ser bloqueado pela anticorpo anti-FcR, 2.4G2; 4) a injeção em camundongos de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de 145-2C11 induziu 15 imunossupressão significativa sem desencadear ativação de célula T completa (Hirsch, 1990; Transplantation, 49: 1117-23) e foi menos tóxica em camundongos que o anticorpo completo (Alegre, 1990, Transplant Proc. 22: 1920-1); e 5) a administração de uma variante de mudança para IgA de OKT3 que exibe uma ativação de célula T mediada por FcR reduzida quando 20 comparada com IgG2a de OKT3, resultou em poucos efeitos colaterais em chimpanzés *in vivo* (Parleviet, 1990, Brief Communications 50: 889-892).

A administração de certos anticorpos anti-CD3 também foi associada com ativação de retrovírus transiente, especificamente ativação de infecção por vírus Epstein-Barr (EBV) dormente. Também se descobriu que 25 tratamento com anticorpo anti-CD3 é lítico para células T ativadas e apoptótico para algumas populações de célula T. As razões para esses efeitos não são claros, mas eles podem ser relacionados a dose e provavelmente são o resultado da modulação do complexo TcR que resulta em sinalização subótima.

Assim, melhora de terapia por mAb anti-CD3 pode ser obtida pela modificação molecular do anticorpo para reduzir sua afinidade por FcRs. O Ab mutado obtido poderia levar à ativação celular mais baixa e toxicidade reduzida *in vivo*, mas reter as propriedades imunossupressoras originais do anticorpo.

### 5.1 Anticorpos que se ligam imunoespecificamente a polipeptídeos CD3

Deve-se reconhecer que anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo Cd3 são conhecidos na técnica. Exemplos de anticorpos conhecidos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo Cd3 incluem, mas não estão limitados a OKT3, HuM291, ChAglyCD3, UCHT1, Leu4, 500A2, CLB-T3/3, BMA030, YTH 12,5 e anticorpo de CD3 de rato (Veja Herold *et al.*, 2005, Diabetes 54: 1763-1769; Carpenter *et al.*, 2005, Biol Blood Marrow Transplant 11: 465-471; Keymeulen *et al.*, 2005, N Engl J Med 352: 26422644; Schwinzer *et al.*, 1992, J Immunol 148: 1322-1328; Tsoukas *et al.*, 1985, J Immunol 135: 1719-1723; Patente US No. 6.491.916; Brams *et al.*, 1989 Immunol 66: 348-353; van Lier *et al.*, 1989, Immunol 68: 45-50; Walker *et al.*, 1987, Eur J Immunol 17: 1611-1618; Routledge *et al.*, 1991, Eur J Immunol 21: 2717-2725, respectivamente).

A presente invenção fornece métodos para tratar, prevenir, diminuir a progressão de, ou melhorar os sintomas de distúrbios autoimunes usando anticorpos se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 expresso por uma célula imune tal como uma célula T, em que os citados anticorpos modulam uma atividade ou função da citada célula T. Em uma modalidade específica, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 diretamente ou indiretamente modulam a atividade de linfócitos, de preferência células T de sangue periférico. Em particular, a presente invenção fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 expresso por uma célula T e os citados anticorpos

modulam a atividade de célula T de sangue periférico.

Em uma modalidade específica, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 inibem ativação de célula T em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo 5 menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% e inibem proliferação de célula T em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 10 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica. Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 inibem reconhecimento de aloantígeno por célula T em pelo menos 25%, 15 pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica. Em outra modalidade, anticorpos 20 que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 inibem citotoxicidade mediada por célula T em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por 25 alguém versado na técnica.

Em outra modalidade, os métodos da invenção empregam anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 e não induzem ou reduziram (quando comparados a anticorpos não modificados, p.

ex., o anticorpo monoclonal OKT3 murino) expressão e/ou liberação de citocina em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica. Em uma modalidade específica, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 não induzem um aumento na concentração de citocinas tais como, p. ex., IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-12 e IL-15 no soro de um indivíduo que recebeu administração de tal anticorpo. Em uma modalidade alternativa, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 induzem expressão e/ou liberação de citocina em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica, mas em níveis menores que aqueles induzidos por anticorpos anti-CD3 não modificados, tais como o anticorpo monoclonal OKT3 murino. Concentrações de soro de um citocina podem ser medidas por qualquer técnica bem conhecida por alguém versado na técnica tal como, p. ex., ELISA.

Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo induzem anergia de célula T em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica. Em uma modalidade alternativa, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 não induzem anergia de célula T em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica. Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 elicitam um estado de não responsividade antígeno-específica por pelo menos 30 minutos, pelo menos 1 hora, pelo menos 2 horas, pelo menos 6 horas, pelo menos 12 horas, pelo menos 24 horas, pelo menos 2 dias, pelo menos 5 dias, pelo menos 7 dias, pelo menos 10 dias ou mais em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou conhecido por alguém versado na técnica.

Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 inibem a ativação de célula T

em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% e inibem proliferação de célula T em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica.

Ainda em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 concluem cobertura ou modulação de célula T em pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% e inibem proliferação de célula T em pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% e de preferência em 100% em um ensaio *in vivo* ou *in vitro* descrito aqui ou bem conhecido por alguém versado na técnica.

Em outra modalidade, o domínio Fc de um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 não se liga detectavelmente a um ou mais dos receptores Fc (“FcR”) FcRI, FcRII e/ou FcRIII expressos por uma célula imune tal como célula T, monócito e macrófago.

Anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 incluem, mas não estão limitados a, anticorpos monoclonais, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos

de cadeia única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, anticorpos Fvs ligados por dissulfeto (sdFv) e anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, p. ex., anticorpos anti-Id para anticorpos da invenção) e fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos acima. Em particular,

5 anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 incluem moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas que contêm um sítio de ligação a antígeno que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3. As moléculas de imunoglobulina da invenção podem ser de qualquer

10 tipo (p. ex., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (p. ex., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. Em uma modalidade específica, os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 e medeiam a atividade de célula T compreendem um domínio Fc ou fragmento deste (p. ex., CH2, CH3 e/ou as regiões de dobra de

15 um domínio Fc). Em uma modalidade preferida, os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 e medeiam a atividade de célula T compreendem um domínio Fc ou fragmento deste que não se liga detectavelmente a um FcR (p. ex., um ou mais de um FcRI, FcRII, FcRIII) expresso por uma célula imune ou reduziu a ligação a FcR quando comparado

20 a um anticorpo com um domínio Fc selvagem.

Os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 podem ser de qualquer origem animal incluindo pássaros e mamíferos (p. ex., humano, murino, macaco, ovelha, coelho, cabra, porquinho-da-índia, camelo, cavalo ou galinha). De preferência, os anticorpos da invenção são anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos. Anticorpos humanos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 incluem anticorpos que têm a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e anticorpos isolados de bibliotecas de imunoglobulina humana ou de camundongos que expressam anticorpos de genes humanos.

Os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 podem ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos ou de maior multiespecificidade. Anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítópos de um polipeptídeo CD3 ou podem ser 5 específicos tanto para um polipeptídeo CD3 assim como para um epítopo heterólogo, tal como um polipeptídeo heterólogo ou material de suporte sólido. Veja, p. ex., publicações PCT WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360 e WO 92/05793; Tutt *et al.*, J Immunol 147: 60-69 (1991); Patente US Nos. 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648. 5.573.920 e 5.601.819 e Kostelny 10 *et al.*, J Immunol 148: 1547-1553 (1992).

A presente invenção fornece anticorpos que têm uma alta afinidade de ligação por um polipeptídeo CD3. Em uma modalidade específica, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma constante de taxa de associação ou taxa  $k_{\text{ligação}}$  (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $^{k_{\text{ligação}}} \rightarrow$  Ab-Ag) de pelo menos  $10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , ou pelo menos  $10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Em uma modalidade preferida, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma  $k_{\text{ligação}}$  de pelo menos  $2 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 15 pelo menos  $10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , ou pelo menos  $10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Em uma modalidade preferida, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma  $k_{\text{desligamento}}$  de pelo menos de  $10^{-1}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-2}\text{s}^{-1}$ , menos de 20  $5 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-3}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-4}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-5}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-6}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-7}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-8}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-9}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ , ou menos de  $10^{-10}\text{s}^{-1}$ .

Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma constante de taxa de associação ou taxa  $k_{\text{desligamento}}$  (anticorpo (Ab) + antígeno (Ag) $^{k_{\text{desligamento}}} \rightarrow$  Ab-Ag) de menos de  $10^{-1}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-2}\text{s}^{-1}$ , menos de 25  $5 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-3}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-4}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-5}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-6}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-7}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-8}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-9}\text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ , ou menos de  $10^{-10}\text{s}^{-1}$ . Em

uma modalidade preferida, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma  $k_{\text{ligação}}$  de menos de  $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-5} \text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-6} \text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-7} \text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-8} \text{s}^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ , menos de  $10^{-9} \text{s}^{-1}$   
 5 menos de  $5 \times 10^{-9} \text{s}^{-1}$ , ou menos de  $10^{-10} \text{s}^{-1}$ .

Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma constante de afinidade ou  $K_a$  ( $k_{\text{ligação}}/k_{\text{desligamento}}$ ) de pelo menos  $10^2 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , pelo  
 10 menos  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  
 15  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ , pelo  
 20 menos  $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ , pelo menos  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , ou pelo menos  $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ . Ainda em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 tem uma constante de dissociação ou  $K_d$  ( $k_{\text{desligamento}}/k_{\text{ligação}}$ ) de menos de  $10^{-2} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ , menos de  $10^{-3} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , menos de  $10^{-4} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ , menos de  $10^{-5} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , menos de  $10^{-6} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , menos de  $10^{-7} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ , menos de  $10^{-8} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ , menos de  $10^{-9} \text{ M}$ , menos de  
 25  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ , menos de  $10^{-10} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ , menos de  $10^{-11} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ , menos de  $10^{-12} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ , menos de  $10^{-13} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ , menos de  $10^{-14} \text{ M}$ , menos de  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ , menos de  $10^{-15} \text{ M}$ , ou menos de  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ .

Em uma modalidade específica, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 é OKT3 humanizado ou um fragmento de ligação a antígeno deste, p. ex., (uma ou mais regiões

- determinantes de complementaridade (CDRs) de OKT3 humanizado). OKT3 tem a sequência de aminoácidos divulgada, p. ex., em Patente US Nos. 4.658.019, 6.113.901 e 6.491.916 (cada um das quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade), ou a sequência de aminoácidos do anticorpo monoclonal produzido pela linhagem celular depositada na Coleção de Cultura Tipo Americana (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 em 28 de julho de 1993 como Número de Acesso CRL-8001 (que é incorporado aqui como referência). Várias versões humanizadas de OKT3 também são relatadas em Patente US No. 6.491.916.
- 5 Em uma modalidade alternativa, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 não é OKT3, um derivado de OKT3, p. ex., OKT3 humanizado, um fragmento de ligação a antígeno de OKT3, ou de maior preferência, não uma versão quimérica ou humanizada deste.
- 10 Em uma modalidade específica, a presente invenção também fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo um domínio pesado variável (“VH”) que tem uma sequência de aminoácidos do domínio VH de um OKT3 humanizado (por exemplo, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, ou
- 15 SEQ ID NO: 9; FIG. 1B). Em uma modalidade preferida, o anticorpo OKT3 humanizado compreende uma cadeia pesada com a sequência de aminoácidos de hOKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) fornecido na FIG. 2D (SEQ ID NO: 13) ou codificado pela sequência nucleotídica de hOKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) fornecida na FIG. 2C (SEQ ID NO: 12).
- 20 Em uma modalidade específica, a presente invenção também fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo um domínio leve variável (“VL”)
- 25 que tem uma sequência de aminoácidos do domínio VL de um OKT3 humanizado (por exemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, ou SEQ ID NO: 4;

FIG. 1A). Em uma modalidade preferida, o anticorpo OKT3 humanizado compreende uma cadeia leve com a sequência de aminoácidos de hOKT3 $\gamma$ 1 fornecida na FIG. 2B (SEQ ID NO: 11) ou codificado pela sequência nucleotídica de hOKT3 $\gamma$ 1 fornecida na FIG. 2A (SEQ ID NO: 10).

5 A presente invenção também fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo um domínio VH divulgado aqui, ou um domínio VH de anticorpo divulgado aqui, combinado com um domínio VL divulgado aqui, ou outro domínio VL. A presente invenção fornece adicionalmente anticorpos  
 10 que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo um domínio VL divulgado aqui, ou um domínio VL de anticorpo divulgado aqui, combinado com um domínio VH divulgado aqui, ou outro domínio VH.

Em uma modalidade, uma molécula de ácido nucleico isolada  
 15 codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, o citado anticorpo compreendendo um domínio VH que tem a sequência de aminoácidos do domínio VH de um OKT3 humanizado (por exemplo, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 9; FIG. 1B).

Em uma modalidade preferida, uma molécula de ácido nucleico isolada codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, o citado anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hOKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) divulgado na FIG. 2D (SEQ ID NO: 13).

Em uma modalidade, uma molécula de ácido nucleico isolada  
 25 codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, o citado anticorpo compreendendo um domínio VL que tem a sequência de aminoácidos do domínio VL de um OKT3 humanizado, por exemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 ou 4 (FIG. 1A).

Em uma modalidade preferida, uma molécula de ácido

nucleico isolado codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, o citado anticorpo compreendendo uma cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos da cadeia leve de hOKT3 $\gamma$ 1 divulgado na FIG. 2B (SEQ ID NO: 11).

5 Em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico isolado codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, o citado anticorpo compreendendo um domínio VH que tem a sequência de aminoácidos do domínio VH de um OKT3 humanizado, por exemplo, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 9 (FIG. 1B) e um domínio VL que  
10 tem a sequência de aminoácidos do domínio VL de um OKT3 humanizado, por exemplo, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 (FIG. 1A). Em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico isolado codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, o citado anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos da  
15 cadeia pesada de um OKT3 humanizado, por exemplo, a sequência de aminoácidos da cadeia pesada de hOKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) divulgado na FIG. 2D (SEQ ID NO: 13) e uma cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos da cadeia leve de um OKT3 humanizado, por exemplo, a sequência de aminoácidos de hOKT3 $\gamma$ 1 divulgada na FIG. 2B (SEQ ID NO: 11).

20 Em uma modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem uma ou mais VH CDRs divulgadas na FIG. 1B. Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem mais de uma das VH CDRs divulgadas na FIG. 1B.

25 Em uma modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem uma ou mais VL CDRs divulgadas na FIG. 1A. Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem mais de uma das VL CDRs divulgadas na FIG. 1A.

Em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem uma ou mais VH CDRs divulgadas na FIG. 1B e uma ou mais VL CDRs divulgadas na FIG. 1A. Ainda em outra modalidade, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem mais de uma das VH CDRs divulgadas na FIG. 1B e mais de uma das VL CDRs divulgadas na FIG. 1A.

A presente invenção também fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo derivados dos domínios VH, VH CDRs, domínios VL ou VL CDRs descritas aqui, ou disponíveis a alguém versado na técnica, que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3. Técnicas padrões conhecidas por aqueles versados na técnica podem ser usadas para introduzir mutações na sequência nucleotídica codificando um anticorpo da invenção, incluindo, por exemplo, mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR que resulta em substituições de aminoácidos. De preferência, os derivados incluem menos de 25 substituições de aminoácidos, menos de 20 substituições de aminoácidos, menos de 15 substituições de aminoácidos, menos de 10 substituições de aminoácidos, menos de 5 substituições de aminoácidos, menos de 4 substituições de aminoácidos, menos de 3 substituições de aminoácidos, ou menos de 2 substituições de aminoácidos em relação à molécula original. Em uma modalidade preferida, os derivados têm substituições de aminoácidos conservativas que são feitas em um ou mais resíduos de aminoácidos não essenciais previstos (isto é, resíduos de aminoácidos que não são críticos para o anticorpo para se ligar imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3). Uma “substituição de aminoácido conservativa” é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que têm uma cadeia lateral com uma carga similar. Famílias de resíduos de aminoácidos que têm cadeias

laterais com cargas similares foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (p. ex., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (p. ex., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (p. ex., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (p. ex., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (p. ex., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (p. ex., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Senão, mutações podem ser introduzidas aleatoriamente por toda ou parte da sequência codificante, tal como por mutagênese de saturação e os mutantes resultantes podem ser triados por atividade biológica para identificar mutantes que retêm atividade. Após a mutagênese, o anticorpo codificado pode ser expresso e a atividade do anticorpo pode ser determinada.

Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo a sequência de aminoácidos de um OKT3 humanizado com uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos no domínio leve variável (VL) e/ou domínio pesado variável (VH). A presente invenção também fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo a sequência de aminoácidos dos domínios variáveis de cadeias pesada e leve murinas (SEQ ID Nos: 5 e 1, respectivamente) com uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos em uma ou mais VL CDRs e/ou uma ou mais VH CDRs. O anticorpo gerado pela introdução de substituições no domínio VH, VH CDRs, domínio VL e/ou VL CDRs de OKT3 humanizado pode ser testado *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, por sua habilidade em se ligar a um polipeptídeo CD3, ou por sua habilidade em inibir ativação de célula T, ou por sua habilidade em inibir proliferação de célula T, ou por sua habilidade em induzir lise de célula T, ou por sua habilidade em prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas

associados com um distúrbio autoimune.

Em uma modalidade específica, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência nucleotídica que se hibridiza com a sequência nucleotídica codificando o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem celular depositada na ATCC® como Número de Acesso CRL-8001 sob condições estringentes, p. ex., hibridização para DNA ligado em filtro em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,2 X,/SDS 0,1% em cerca de 50-65°C, sob condições altamente estringentes, p. ex., hibridização para ácido nucleico ligado em filtro em SSC 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,1X/SDS 0,2% em cerca de 68°C, ou sob outras condições de hibridização estringentes que são conhecidas por aqueles versados na técnica (veja, por exemplo, Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocol in Molecular Biology*, Vol. I. Green Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque nas páginas 6.3.1-6.3.6 e 2.10.3).

Em uma modalidade específica, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência nucleotídica que se hibridiza com a sequência nucleotídica codificando o OKT3 humanizado sob condições estringentes, p. ex., hibridização para DNA ligado em filtro em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,2 X,/SDS 0,1% em cerca de 50-65°C, sob condições altamente estringentes, p. ex., hibridização para ácido nucleico ligado em filtro em SSC 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,1X/SDS 0,2% em cerca de 68°C, ou sob outras condições de hibridização estringentes que são conhecidas por aqueles versados na técnica (veja, por exemplo, Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocol in Molecular Biology*, Vol. I. Green Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque nas páginas 6.3.1-6.3.6 e 2.10.3).

Em uma modalidade específica, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos de um domínio VH ou uma sequência de aminoácidos de um domínio VL codificada por uma sequência nucleotídica que se hibridiza com a sequência nucleotídica codificando os domínios VH ou VL de OKT3 humanizado sob condições estringentes, p. ex., hibridização para DNA ligado em filtro em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,2 X/SDS 0,1% em cerca de 50-65°C, sob condições altamente estringentes, p. ex., hibridização para ácido nucleico ligado em filtro em SSC 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,1X/SDS 0,2% em cerca de 68°C, ou sob outras condições de hibridização estringentes que são conhecidas por aqueles versados na técnica (veja, por exemplo, Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocol in Molecular Biology*, Vol. I. Green Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque nas páginas 6.3.1-6.3.6 e 2.10.3).

Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos de uma VH CDR ou uma sequência de aminoácidos de uma VL CDR codificada por uma sequência nucleotídica que se hibridiza com a sequência nucleotídica codificando qualquer um das VH CDRs ou VL CDRs do anticorpo monoclonal produzido pela linhagem celular depositada na ATCC® como Número de Acesso CRL-8001 sob condições estringentes, p. ex., hibridização para DNA ligado em filtro em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,2 X/SDS 0,1% em cerca de 50-65°C, sob condições altamente estringentes, p. ex., hibridização para ácido nucleico ligado em filtro em SSC 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,1X/SDS 0,2% em cerca de 68°C, ou sob outras condições de hibridização estringentes que são conhecidas por aqueles versados na técnica.

Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos de uma VH CDR e uma sequência de aminoácidos de uma VL CDR codificada por sequências nucleotídicas que se hibridizam com as sequências nucleotídicas codificando o anticorpo monoclonal produzido pela linhagem celular depositada na ATCC® como Número de Acesso CRL-8001 sob condições estringentes, p. ex., hibridização para DNA ligado em filtro em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,2 X./SDS 0,1% em cerca de 50-65°C, sob condições altamente estringentes, p. ex., hibridização para ácido nucleico ligado em filtro em SSC 6X em cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em SSC 0,1X/SDS 0,2% em cerca de 68°C, ou sob outras condições de hibridização estringentes que são conhecidas por aqueles versados na técnica.

Em uma modalidade específica, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos do anticorpo monoclonal produzido pela linhagem celular depositada na ATCC® como Número de Acesso CRL-8001. Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos de OKT3 humanizado.

Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos de um domínio VH que possui pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, 5 pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de identidade com o domínio VH de OKT3 humanizado.

Em outra modalidade, um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreende uma sequência de aminoácidos de um domínio VL que possui pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, 10 pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% de identidade com o domínio VL de OKT3 humanizado.

A presente invenção abrange anticorpos que competem com 15 um anticorpo descrito aqui pela ligação a um polipeptídeo CD3. Em uma modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com anticorpos anti-CD3 conhecidos na técnica, derivados desses ou fragmentos de ligação a抗igenos desses. Por exemplo, anticorpos fornecidos 20 pela invenção competem com OKT3 ou um derivado deste, p. ex., OKT3 humanizado, ou um fragmento de ligação a抗igenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com ChAglyCD3 ou um derivado deste ou 25 um fragmento de ligação a抗igenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com HuM291 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗igenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com UCHT1 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗igenos desse

para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com Leu4 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗ígenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com YTH 12,5 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗ígenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com 500A2 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗ígenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com CLB-T3/3 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗ígenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3. Em outra modalidade específica, a presente invenção abrange anticorpos que competem com BMA030 ou um derivado deste ou um fragmento de ligação a抗ígenos desse para ligação ao polipeptídeo CD3.

A presente invenção também abrange domínios VH que competem com o domínio VH dos anticorpos aqui divulgados, ou com os domínios VH de outros anticorpos anti-CD3 humano conhecidos na técnica, ou derivados ou variantes desses pela ligação a um polipeptídeo CD3. Em uma modalidade específica, a presente invenção abrange domínios VH que competem com o domínio VH de OKT3 ou um derivado deste, p. ex., OKT3 humanizado, pela ligação a um polipeptídeo CD3. A presente invenção também abrange domínios VL que competem com o domínio VL dos anticorpos aqui divulgados, ou com os domínios VL de outros anticorpos anti-CD3 humano conhecidos na técnica, ou derivados ou variantes desses pela ligação a um polipeptídeo CD3. Em uma modalidade específica, a presente invenção abrange domínios VL que competem com o domínio VL de OKT3 ou um derivado deste, p. ex., OKT3 humanizado, pela ligação a um polipeptídeo CD3.

Os anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 incluem derivados que são modificados, isto é, pela adesão covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo tal que adesão covalente. Por exemplo, mas não por meio de limitação, os derivados de anticorpo 5 incluem anticorpos que foram modificados, p. ex., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante ou outra proteína celular, etc. Quaisquer de numerosas modificações 10 químicas podem ser efetuados por técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitando a, clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um 15 ou mais aminoácidos não clássicos.

A presente invenção também fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos 15 compreendendo uma região estrutural conhecida por aqueles versados na técnica. De preferência, a região de fragmento de um anticorpo da invenção é humano.

A presente invenção também abrange anticorpos e métodos para uso destes, que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, 20 os citados anticorpos compreendendo a sequência de aminoácidos de OKT3 ou um derivado deste, p. ex., OKT3 humanizado, com mutações (p. ex., uma ou mais substituições de aminoácidos) nas regiões estruturais. Em certas modalidades, anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 compreendem a sequência de aminoácidos de OKT3 ou um 25 derivado deste, p. ex., OKT3 humanizado, com uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos nas regiões estruturais dos domínios VH e/ou VL.

A presente invenção também abrange anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3, os citados anticorpos compreendendo a sequência de aminoácidos de OKT3 ou um derivado deste,

p. ex., OKT3 humanizado, com mutações (p. ex., uma ou mais substituições de resíduos de aminoácidos) nas regiões variáveis e estruturais.

A presente invenção também fornece proteína de fusão compreendendo um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 e um polipeptídeo heterólogo. De preferência, o polipeptídeo heterólogo ao qual o anticorpo está fusionado é útil para direcionar o anticorpo a células T.

Os anticorpos da invenção incluem derivados que são de outro modo modificados, isto é, pela adesão covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo tal que a adesão covalente não previne o anticorpo da ligação a antígeno e/ou geração de resposta anti-idiotípica. Por exemplo, mas não pode meio de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, p. ex., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante ou outra proteína celular, etc. Quaisquer de numerosas modificações químicas podem ser efetuadas por técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitando a, clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

### **5.1.1 Polipeptídeo e anticorpos com regiões Fc variantes**

O uso de anticorpos monoclonais terapêuticos é limitado por problemas de efeitos colaterais de “primeira dose”. Efeitos colaterais de primeira dose variam de sintomas semelhantes a gripe suave até toxicidade severa, podem ser suaves até graves e incluem sintomas, tal como, febre alta, calafrios/rigidez, cefaléia, tremor, náusea/vômito, diarréia, dor abdominal, mal-estar, dores e dores vagas musculares/articulares e fraqueza generalizada. Acredita-se que os efeitos colaterais de primeira dose sejam causados por produção de linfocina e liberação de citocina estimulada pela região Fc de

uma ligação de anticorpo a e ativação de um Fc $\gamma$ R em uma célula contendo Fc $\gamma$ R.

O FcR reconhece imunoglobulinas de um ou mais isotipos através de um domínio de reconhecimento na cadeia  $\alpha$  do receptor Fc. Os receptores Fc são definidos por suas especificidades por subtipos de imunoglobulinas. Por exemplo, receptores Fc para IgG são referidos como Fc $\gamma$ R. Células acessórias diferentes portam receptores Fc para anticorpos de isotipo diferente e o isotipo do anticorpo determina que células acessórias estarão comprometidas em uma dada resposta (revisto por Ravetch J. V. et al.,

1991, Annu Rev Immunol 9: 457-92; Gerber J. S. et al., 2001, Microbes and Infection 3: 131-139; Billadeau D. D. et al., 2002, The Journal of Clinical Investigation 2(109): 161-1681; Ravetch J. V. et al., 2000, Science 290: 84-89; Ravetch J. V. et al., 2001, Annu Rev Immunol 19: 275-90; Ravetch J. V. 1994, Cell 78: 553-60).

A invenção abrange assim moléculas de ligação a CD3 que reduzem ou eliminam pelo menos um sintoma associado com efeitos colaterais de primeira dose pela redução ou eliminação do Fc de um ou mais Fc $\gamma$ R. Tais proteínas de ligação a CD3 compreendem uma região Fc variante que tem uma ou mais modificações de aminoácidos, em relação a uma região Fc selvagem. A modificação diminui ou elimina a ligação do Fc a um ou mais Fc $\gamma$ Rs, em relação a uma região Fc selvagem comparável. A modificação é tipicamente uma substituição de aminoácido. Entretanto, a modificação pode ser uma inserção e/ou deleção de aminoácido. Tipicamente, a modificação ocorre na região CH2 e/ou de dobra. Senão, a ligação de Fc a um ou mais Fc $\gamma$ Rs pode ser reduzida ou eliminado pela alteração ou eliminação de um ou mais grupos glicosil no domínio Fc. A glicosilação de Fc pode ser alterada ou eliminada por métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a glicosilação pode ser alterada pela produção do Fc em uma célula que é deficiente em fucosilação (p. ex., célula nulas para *fuc6*), ou eliminada por

enzimas de desglicosilação ou uma modificação de aminoácido que altere ou elimine um sítio de glicosilação (p. ex., o sítio de glicosilação N-X-S/T nas posições 297-299 no domínio CH2). A ligação de Fc $\gamma$ R pode ser medida usando métodos padrões conhecidos na técnica e aqui exemplificados. Os 5 anticorpos da invenção são assim particularmente úteis porque eles têm toxicidade reduzida ou nenhuma *in vivo* causada por produção de linfocina ou liberação de citocina. As propriedades de ligação e afinidades das moléculas da invenção para um Fc $\gamma$ R são inicialmente determinadas usando ensaios *in vitro* (ensaios com base bioquímica ou imunológica) conhecidos na técnica 10 por determinar interações Fc-FcR, isto é, ligação específica de uma região Fc a um FcR incluindo, mas não limitando a ensaio de ELISA, ensaio de ressonância de plasma de superfície, ensaio de imunoprecipitação (Veja Seção 5.4). De preferência, as propriedades de ligação das moléculas da invenção também são caracterizadas por ensaios funcionais *in vitro* para determinar 15 uma ou mais funções celulares efetoras mediadoras de Fc $\gamma$ R (Veja Seção 5.4). Na maioria das modalidades preferidas, as moléculas da invenção têm propriedades de ligação similares em modelos *in vivo* (tal como aqueles descritos e divulgados aqui) como aqueles em ensaios com base *in vitro*. Entretanto, a presente invenção não exclui moléculas da invenção que não 20 exibem o fenótipo desejado em ensaios com base *in vitro*, mas exibem o fenótipo desejado *in vivo*.

### **5.1.1.1 Receptores de Fc $\gamma$**

Cada membro desta família é uma glicoproteína integral de membrana, possuindo domínios extracelulares relacionados a um grupo C2 de 25 domínios relacionados a imunoglobulina, um domínio transpondo membrana único e um domínio intracitoplasmático de comprimento variável. Existem três Fc $\gamma$ Rs conhecidos Fc $\gamma$ RI(CD64), Fc $\gamma$ RII(CD32) e Fc $\gamma$ RIII(CD16), que exibem homologia extensiva, mas são codificados por genes distintos. Tanto sinais de ativação como inibitórios são transduzidos através dos Fc $\gamma$ Rs após

ligação. Essas funções diametralmente opostas resultam de diferenças estruturais entre as diferentes isoformas de receptor. Em geral, a ligação de um domínio Fc complementar a Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA e Fc $\gamma$ RIIIA resulta em ativação de substratos a jusante (p. ex., PI<sub>3</sub>K) e levando à liberação de mediadores pró-inflamatórios. Em contraste, a ligação de um domínio Fc complementar a Fc $\gamma$ RIIB resulta em fosforilação de Fc $\gamma$ RIIB e associação com o domínio SH2 da inositol polifosfato 5'-fosfatase (SHIP). A SHIP hidrolisa mensageiros de fosfoinositol liberados como consequência de ativação de tirosina quinase mediada por Fc $\gamma$ RI, consequentemente prevenindo o influxo de Ca<sup>++</sup> intracelular. Assim, a ligação cruzada de Fc $\gamma$ RIIB deprime a resposta de ativação para ligação de Fc $\gamma$ R e inibe responsividade celular.

Métodos para medir a produção de linfocinas e liberação de citocinas são conhecidos na técnica e abrangidos aqui. Por exemplo, liberação de citocina pode ser medida pela medição da secreção de citocinas incluindo, mas não limitando a TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ . Veja, p. ex., Patente US No. 6.491.916; Isaacs *et al.*, 2001, *Rheumatology*, 40: 724-738; cada uma dos quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade. Produção de linfocina pode ser medida pela medição de secreção de linfocinas incluindo, mas não limitando a interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12), interleucina-16 (IL-16), PDGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GCSF, GM-CSF, MCSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\gamma$ , IGF-I, IGF-II. Por exemplo, veja, Isaacs *et al.*, 2001, *Rheumatology*, 40: 724-738; Soubrane *et al.*, 1993, *Blood*, 81(1): 15-19; cada uma dos quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

Conforme aqui utilizado, o termo “região Fc” é usado para definir um região C-terminal de uma cadeia pesada de IgG. Embora os limites possam variar levemente, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é definida por estender-se de Cys226 até a extremidade carbóxi-terminal. A

região Fc de uma IgG compreende dois domínios constantes, CH2 e CH3. O domínio CH2 de uma região Fc de IgG humana geralmente se estende do aminoácido 231 até o aminoácido 341. O domínio CH3 de uma região Fc de IgG humana geralmente se estende do aminoácido 342 até 447. O domínio 5 CH2 de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio “C $\gamma$ 2”) geralmente se estende do aminoácido 231-340. O domínio CH2 é único em que ele não está intimamente pareado com outro domínio. Em vez disso, duas cadeias de carboidrato ramificadas ligadas por N são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma IgG nativa intacta.

10 Em modalidades preferidas, a invenção abrange moléculas compreendendo uma região Fc variante, em que a citada região Fc variante compreende pelo menos uma modificação de aminoácido em relação a uma região Fc selvagem, tal região Fc variante não se liga a qualquer Fc $\gamma$ R, como determinado por ensaios padrões conhecidos na técnica e divulgados aqui, em 15 relação a uma molécula comparável compreendendo a região Fc selvagem. Em uma modalidade específica, a uma ou mais modificações de aminoácidos que abolem a ligação a todos os Fc $\gamma$ Rs compreendem regiões Fc que tem uma fenilalanina na posição 233; ou uma arginina na posição 238; ou uma alanina na posição 265; ou um ácido glutâmico na posição 265; ou uma alanina na 20 posição 270; ou uma asparagina na posição 270; ou uma alanina na posição 297; ou uma glutamina na posição 297; ou uma fenilalanina na posição 298; ou uma asparagina na posição 298; ou qualquer aminoácido na posição 299 fora serina ou treonina; ou uma alanina na posição 265 e na posição 297; ou uma alanina na posição 265 e uma glutamina na posição 297; ou um ácido 25 glutâmico na posição 265 e uma alanina na posição 297; ou uma alanina na posição 234 e uma alanina na posição 235. Em outra modalidade, a uma ou mais modificações de aminoácidos que abolem a ligação a todos os Fc $\gamma$ Rs compreendem combinações das modificações listadas aqui ou combinações

das modificações listadas aqui com qualquer que possa conferir ligação nula a Fc $\gamma$ RIIIA, Fc $\gamma$ RIIIB e Fc $\gamma$ RIIA como determinado por métodos divulgados aqui ou conhecidos por alguém versado na técnica.

A invenção abrange métodos para reduzir ou eliminar pelo menos um sintoma associado com efeito colateral de primeira dose em um paciente compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um ou mais anticorpos da invenção. Os métodos da invenção reduzem pelo menos um sintoma associado com síndrome de liberação de citocina incluindo, mas não limitando a febre alta, calafrios/rigidez, cefaléia, tremor, náusea/vômito, diarréia, dor abdominal, mal-estar, dores e dores vagas musculares/articulares e fraqueza generalizada.

A presente invenção fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 que tem uma meia vida estendida *in vivo*. Em particular, a presente invenção fornece anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 que tem uma meia vida em um animal, de preferência um mamífero e da maior preferência um humano, maior que 3 dias, maior que 7 dias, maior que 10 dias, de preferência maior que 15 dias, maior que 25 dias, maior que 30 dias, maior que 35 dias, maior que 40 dias, maior que 45 dias, maior que 2 meses, maior que 3 meses, maior que 4 meses, ou maior que 5 meses.

Para prolongar a circulação sérica de anticorpos (p. ex., anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia única e fragmentos Fab) *in vivo*, por exemplo, moléculas de polímero inertes tal como polietilenoglicol (PEG) de alto peso molecular pode ser aderido aos anticorpos com ou sem ligante multifuncional ou através de conjugação sítio-específica do PEG à extremidade N-terminal ou C-terminal dos anticorpos ou através de grupos épsilon-amino presentes em resíduos de lisina. Derivação de polímero linear ou ramificado que resulta em perda mínima de atividade biológica será usada. O grau de conjugação pode ser intimamente monitorado por SDS-PAGE e

espectrometria de massas para garantir a conjugação apropriada de moléculas de PEG aos anticorpos. PEG não reagido pode ser separado dos conjugados anticorpo-PEG por cromatografia de peneira molecular ou de troca iônica. Anticorpos derivados com PEG podem ser testados por atividade de ligação assim como por eficácia *in vivo* usando métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, por imunoensaios descritos aqui.

Anticorpos que têm uma meia vida aumentada *in vivo* também podem ser gerados introduzindo uma ou mais modificações de aminoácidos (isto é, substituições, inserções ou deleções) em um domínio constante de IgG, ou fragmento de ligação FcRn desse (de preferência um fragmento de domínio Fc-de dobra). Veja, p. ex., Publicação Internacional No. WO 98/23289; Publicação Internacional No. WO 97/34631 e Patente US No. 6.277.375, cada uma das quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

### 15    **5.1.2 Conjugados de anticorpos**

A presente invenção abrange anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno destes que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 recombinantemente fusionado ou quimicamente conjugado (incluindo tanto conjugações covalentes como não covalentes) a um polipeptídeo heterólogo (ou um fragmento deste, de preferência pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos contíguos do polipeptídeo) para gerar proteína de fusão. A fusão não necessariamente precisa ser direta, mas pode ocorrer através de sequências ligantes. Por exemplo, anticorpos podem ser usados para direcionar polipeptídeos heterólogos a tipos celulares particulares (p. ex., células T), ou *in vitro* ou *in vivo*, pela fusão ou conjugação dos anticorpos com anticorpos específicos para receptores de superfície celular particular tal como, p. ex., CD4 e CD8.

A presente invenção também abrange anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno destes que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 fusionado a sequências marcadoras, tal como um peptídeo para facilitar purificação. Em modalidades preferidas, a sequência de 5 aminoácidos marcadora é um peptídeo de hexa-histidina, tal como a marcação fornecida em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA 91311), entre outros, muitos dos quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz *et al.*, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86: 821-824, por exemplo, hexa-histidina fornece purificação conveniente da proteína de 10 fusão. Outras marcações peptídicas úteis para purificação incluem, mas não estão limitadas a, a marcação de hemaglutinina “HA”, que corresponde a um epítopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, 1984 Cell 37: 767) e a marcação “flag”.

A presente invenção abrange adicionalmente anticorpos ou 15 fragmentos de ligação a antígeno destes que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 conjugado a um agente que tem um potencial benefício terapêutico. Um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno destes que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 pode ser conjugado a uma unidade terapêutica tal como uma citotoxina, p. ex., agente citostático ou 20 citocida, um agente que tem um potencial benefício terapêutico, ou um íon metálico radioativo, p. ex., alfa-emissores. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial às célula. Exemplos de uma citotoxina ou agente citotóxico incluem, mas não estão limitados a, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídeo, emetina, 25 mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e análogos ou homólogos desses. Agentes que têm um potencial benefício terapêutico

incluem, mas não estão limitados a, antimetabólitos (p. ex., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluoruracil decarbazina), agentes alquilantes (p. ex., mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cisdiidlorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (p. ex., daunorubicina (formalmente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (p. ex., dactinomicina (formalmente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (p. ex., vincristina e vinblastina).

Adicionalmente, um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 pode ser conjugado a um agente terapêutico ou unidade de fármaco que modifica uma dada resposta biológica. Agentes que têm um potencial benefício terapêutico ou unidades de fármaco não são para serem interpretados como limitados a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a unidade de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possui uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina diftérica; uma proteína tal como fator de necrose de tumor, interferon- $\alpha$  (“IFN- $\alpha$ ”), interferon- $\beta$  (“IFN- $\beta$ ”), fator de crescimento neural (“NGF”), fator de crescimento derivado de plaquetas (“PDGF”), ativador de plasminogênio de tecido (“TPA”), um agente apoptótico, p. ex., TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I (veja, Publicação Internacional No. WO 97/33899), AIM II (veja, Publicação Internacional No. WO 97/34911), ligante de faz (Takahashi *et al.*, 1994, J Immunol 6: 1567-1574) e VEGF (veja, Publicação Internacional No. WO 99/23105), um agente trombótico ou um agente antiangiogênico, p. ex., angiostatina ou endostatina; ou um modificador de resposta biológica tal como, por exemplo, uma linfocina (p. ex., interleucina-1 (“IL-1”), IL-2, IL-6, IL-10, fator estimulante de colônia de macrófago e granulócito (“GM-CSF”)) e

fator estimulante de colônia de granulócito (“G-CSF”)), ou um fator de crescimento (p. ex., hormônio de crescimento (“GH”)).

Técnicas para conjugar tais unidades terapêuticas são bem conhecidas, veja, p. ex., Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy”, em Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld *et al.*, (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies for Drug Delivery”, em Controlled Drug Delivery (2a Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: a Review”, em Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera *et al.*, (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results and Future Prospectiva of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy” em Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin *et al.*, (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) e Thorpe *et al.*, 1982, Immunol Rev 62: 119-58.

Um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno deste que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 pode ser conjugado a um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo como descrito por Segal em Patente US No. 4.676.980, que é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

Anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno destes que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 podem ser aderidos a suportes sólidos, que são particularmente úteis para a purificação de células imunes CD3<sup>+</sup> tal como célula T. Tais suportes sólidos incluem, mas não estão limitados a, vidro, celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinila ou polipropileno.

## 5.2 Métodos profiláticos e terapêuticos

A presente invenção é direcionada a terapias que envolvem administrar moléculas de ligação a CD3, particularmente anticorpos anti-CD3

humano, a um indivíduo, de preferência um indivíduo humano, para prevenir, tratar, retardar o início de, diminuir a progressão de ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune. Em particular, a presente invenção é direcionada a terapias que envolvem administrar moléculas de ligação a CD3, 5 particularmente anticorpos anti-CD3 humano, mais particularmente formas humanas ou humanizadas de anticorpos anti-CD3 humano, tal como OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala), ChAgyCD3 e visilizumab que têm domínios Fc que não se ligam têm ligação significativamente reduzida a receptores Fc, a um indivíduo, de preferência um indivíduo humano, para prevenir, tratar, retardar o início de, 10 diminuir a progressão de ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune, p. ex., diabetes tipo 1. Os métodos divulgados aqui são geralmente métodos melhorados de administração que permitem a administração de dosagens mais baixas e/ou por períodos de tempo mais curtos que ainda atingem eficácia clínica e evitam toxicidade. Em particular, a invenção 15 contempla regimes de dosagem em que menos de 9.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , de preferência, menos de 8.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , menos de 7.500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , menos de 7.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou menos de 6.000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de anticorpo anti-CD3 humano total durante a duração da dosagem, particularmente de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala), ou a quantidade farmacológica equivalente de outro anticorpo anti-CD3 humano, tal como 20 ChAgyCD3 (TRX4<sup>TM</sup>) ou HUM291 (visilizumab; NUVION<sup>TM</sup>), ou OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) administrado intravenosamente. A invenção contempla adicionalmente métodos em que ao paciente são cronicamente administradas doses baixas do anticorpo anti-CD3 humano e em que ao paciente é administrada uma ou mais rodadas adicionais do regime de tratamento de 25 anticorpo anti-CD3 humano aproximadamente 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 2 anos, 3 anos ou 5 anos após o tratamento inicial, dependendo ou não de certos parâmetros clínicos, ou é administrada outra rodada de tratamento com anticorpo anti-CD3 humano a cada aproximadamente 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 2 anos, 3 anos ou 5 anos, dependendo ou

não de certos parâmetros clínicos.

Exemplos de distúrbios autoimunes que podem ser tratados administrando-se as moléculas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolipídica, doença de Addinson autoimune, doenças autoimunes da glândula adrenal, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, ooforite e orquite, trombocitopenia autoimune, doença de Behcet, penfigoide bolhoso, cardiomiopatia, sprue-dermatite celíaca, síndrome de disfunção imune e fadiga crônica (CFIDS), polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, doença de aglutinina gelada, doença de Crohn, lúpus discóide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia-fibromiosite, glomerulonefrite, doença de Grave, Guillain-Barre, tiroidite de Hashimoto, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), doença do intestino irritável (IBD), neuropatia de IgA, artrite juvenil, líquen planus, lúpus eritematoso, doença de Meniere, doença de tecido conjuntivo misto, esclerose múltipla tipo 1 ou diabetes melito imuno-mediada, miastenia grave, pênfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policrondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite e dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoriase, artrite psoriática, fenômeno de Raynauld, síndrome de Reiter, artrite reumatóide, sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de stiff-man, lúpus eritematoso sistêmico, lúpus eritematoso, arterite de Takayasu, arterite temporal/arterite de célula gigante, colite ulcerativa, uveíte, vasculite tal como dermatite herpetiforme vasculite, vitiligo, e granulomatose de Wegener. Alguns distúrbios autoimunes também estão associados com uma patologia inflamatória. Assim, há uma sobreposição entre o que é considerado um distúrbio autoimune e um distúrbio inflamatório. Portanto, alguns distúrbios autoimunes também podem ser caracterizados como distúrbios inflamatórios. Exemplos de distúrbios

inflamatórios que podem ser prevenidos, tratados ou controlados de acordo com os métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a, asma, encefalite, doença de intestino inflamatório, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), distúrbios alérgicos, fibrose pulmonar, espondiloartropatia indiferenciada, artropatia indiferenciada, artrite, osteólise inflamatória e inflamação crônica resultando de infecções por bactérias ou vírais crônicas. Exemplos de tipos de psoríase que podem ser tratadas de acordo com as composições e métodos da invenção incluem, mas não estão limitado a, psoríase em placa, psoríase pustular, psoríase eritrodérmica, psoríase gutada e psoríase inversa.

### 5.2.1 Diabetes

Diabetes melito imuno-mediada ou diabetes tipo 1 é causada por uma resposta autoimune em que as células  $\beta$  produtoras de insulina do pâncreas são gradualmente destruídas. Acredita-se que a destruição das células  $\beta$  seja grandemente mediada por CTLs (células T CD8+). O estágio inicial da doença, denominada insulite é caracterizado por infiltração de leucócitos no pâncreas e está associado tanto com inflamação pancreática como com a liberação de anticorpos citotóxicos anti-célula- $\beta$ . Estágios iniciais da doença são frequentemente não vistos ou mal diagnosticados visto que sintomas clínicos de diabetes tipicamente se manifestam apenas após 80% das células  $\beta$  terem sido destruídas. Mesmo com terapia imunossupressora, populações de célula  $\beta$  não se recuperam em uma extensão significativa; portanto, uma vez que os sintomas ocorram, o diabético tipo 1 é normalmente dependente de insulina por toda a vida. Insulina é atualmente a única terapia padrão para tratar sintomas de diabetes tipo 1. Embora fármacos imunossupressores tais como metotrexato e ciclosporina tenham mostrado promessa clínica inicial no tratamento de diabetes tipo 1, p. ex., manutenção de função de célula  $\beta$ , como com todos os imunossupressores gerais, o uso prolongado deles foi associado com vários efeitos colaterais graves. O uso da

invenção no contexto de diabetes, portanto, abrange métodos para suster/proteger os níveis e funcionalidade de células  $\beta$  que existem no momento do tratamento.

Em uma modalidade específica, um anticorpo anti-CD3 humano não é usado para o tratamento de diabetes aguda, mas em vez disso para prevenir a progressão da doença em indivíduos diagnosticados recentemente, incluindo crianças diagnosticadas com diabetes juvenil (veja Herold *et al.*, 2005 Diabetes 54: 1763-1769). Em uma modalidade específica, terapia anti-CD3 humano é usada apenas em pacientes que têm função de célula  $\beta$  residual como determinado por métodos descritos aqui ou conhecidos por alguém de conhecimento ordinário da técnica. Em outra modalidade, terapia de anticorpo anti-CD3 humano é usada para manter função de célula  $\beta$  transplantada em receptores de transplante pancreático.

Em modalidades alternativas, a invenção abrange a administração de anticorpos anti-CD3 humano a indivíduos predispostos a desenvolver diabetes tipo 1, mas não satisfazem critérios diagnósticos como estabelecido pela Associação de Diabetes Americana ou a Sociedade de Imunologia da Diabetes para prevenir ou retardar o início de diabetes tipo 1 e/ou prevenir ou retardar a necessidade de administração de insulina a tais pacientes. Em certas modalidades, fatores de alto risco para a identificação de indivíduos predispostos de acordo com esta modalidade são ter parentes de primeiro ou segundo grau diagnosticados com diabetes tipo 1, um nível de glicose em jejum prejudicado (isto é, em pelo menos uma determinação de um nível de glicose de 100-125 mg/dL após jejum (oito horas sem comida)), uma tolerância a glicose prejudicada em resposta a um OGTT de 75 g (isto é, pelo menos uma determinação de um nível de glicose de 2 horas de 140-199 mg/dL em resposta a um OGTT de 75g), um tipo de HLA de DR7 em um caucasiano, um tipo de HLA de DR4 em uma pessoa de descendência africana, um tipo de HLA de DR9 em uma pessoa de descendência japonesa,

exposição a vírus da infância (p. ex., vírus coxsakie B, enterovírus, adenovírus, da rubéola, citomegalovírus e vírus Epstein-Barr), um diagnóstico positivo de acordo com critérios aceitos na técnica de pelo menos um outro distúrbio autoimune (p. ex., doença da tireóide, doença celíaca) e/ou a detecção de autoanticorpos, particularmente ICAs, no soro ou outros tecidos. Em certas modalidades, o indivíduo identificado como predisposto a desenvolver diabetes tipo 1 de acordo com os métodos da invenção tem pelo menos um dos fatores de risco descritos aqui e/ou como conhecido na técnica. A invenção também abrange a identificação de indivíduos predispostos ao desenvolvimento de diabetes tipo 1, em que o citado indivíduo apresenta uma combinação de dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, ou mais que cinco dos fatores de risco divulgados aqui ou conhecidos na técnica.

Autoanticorpos séricos associados com diabetes tipo 1 ou com uma predisposição para o desenvolvimento de diabetes tipo 1 são autoanticorpo de célula da ilhota (p. ex., autoanticorpos anti-ICA512), autoanticorpos de descarbamilase de ácido glutâmico (p. ex., autoanticorpos anti-GAD65) e/ou autoanticorpos anti-insulina. Consequentemente, em um exemplo específico de acordo com esta modalidade, a invenção abrange o tratamento de um indivíduo com autoanticorpo detectáveis associados com uma predisposição ao desenvolvimento de diabetes tipo 1 ou associados com estágio inicial de diabetes tipo 1 (p. ex., autoanticorpos anti-IA2, anti-ICA512, anti-GAD ou anti-insulina), em que o citado indivíduo não foi diagnosticado com diabetes tipo 1 e/ou é um parente de primeiro ou segundo grau de um diabético do tipo 1. Em certas modalidades, a presença dos autoanticorpos é detectada por ELISA, radioensaio (veja, p. ex., Yu *et al.*, 1996, J Clin Endocrinol Metab 81: 4264-4267), ou por qualquer outro método para detecção imunoespecífica de anticorpos descritos aqui ou como conhecido por alguém de conhecimento ordinário da técnica.

A função de célula  $\beta$  antes de, durante e após terapia pode ser

avaliada por métodos descritos aqui ou por qualquer método conhecido por alguém de conhecimento ordinário da técnica. Por exemplo, o grupo de pesquisa do Ensaio de Complicações e Controle de Diabetes (DCTT) estabeleceu o monitoramento de porcentagem de hemoglobina glicosilada (HA1 e HA1c) com o padrão para avaliação de controle de glicose sanguíneo (DCTT, 1993, N Engl J Med 329: 977-986). Senão, a caracterização de necessidades de insulina diária, resposta/níveis de peptídeo C, episódios hipoglicêmicos e/ou FPIR podem ser usados como marcadores de função de célula  $\beta$  ou para estabelecer um índice terapêutico (Veja Keymeulen *et al.*, 2005, N Engl J Med 352: 2598-2608; Herold *et al.*, 2005, Diabetes 54: 1763-1769; Pub. Ped. Pat. US No. 2004/0038867 A1 e Greenbaum *et al.*, 2001, Diabetes 50: 470-476, respectivamente). Por exemplo, FPIR é calculado como a soma de valores de insulina em 1 e 3 minutos pós-IGTT, que são realizados de acordo com os protocolos de Estudo de Usuários de Registro de Anticorpo de Célula da Ilhota (veja, p. ex., Bingley *et al.*, 1996, Diabetes 45: 1720-1728 e McCulloch *et al.*, 1993, Diabetes Care 16: 911-915).

### **5.2.2 Esclerose Múltipla**

Diagnóstico de MS tipicamente requer múltiplas avaliações neurológicas a fim de excluir outras causas mais comuns dos sintomas apresentados. A partir de 2001, o Painel Internacional em Diagnóstico de MS recomeçou critérios diagnósticos revisados para uma determinação de esclerose múltipla que incluem avanços em tecnologia MRI (p. ex., visualização melhorada de lesões) e outros métodos diagnósticos para-clínicos. Os critérios atualizados foram chamados os critérios de McDonald após o autor principal do relato e representa melhorias sobre critérios diagnósticos prévios, isto é, os critérios de Poser e Schumacher (veja, McDonald *et al.*, 2001, Ann Neurol 50: 121-127).

Estudos da história natural de MS sugerem que há padrões diferentes de atividade de doença embora quatro variedades principais seja

reconhecidas: MS Reincidente/Remitente (RRMS), MS Progressiva Secundária (SPMS), MS Reincidente Progressiva (PRMS) e MS Progressiva Primária (PPMS) (veja, p. ex., Lublin *et al.*, 1996, Neurology 46: 907-911. A distinção entre as variedades depende da frequência e gravidade dos ataques e da progressão destes. RRMS é caracterizada por recuperação completa ou parcial entre ataques, com uma estabilidade geral de condição basal são definidos como tendo MS reincidente-remitente. Em alguns casos, RRMS inclui MS “benigna”, caracterizada por ataques raros e incapacidade mínima dez anos pós-diagnóstico de MS. Pacientes que experimentam RRMS constituem aproximadamente 80-90% de sofredores de MS. Desses, aproximadamente 50% terão dificuldade em caminhar 15 anos após o início e 80% irão por fim (após cerca de 25 anos) experimentar progressão gradual de desabilidade com ou sem ataques. Pacientes que primeiro experimentam exacerbações e mais tarde experimentam progressão gradual de desabilidade têm SPMS. Aproximadamente 10-15% de pacientes com MS não experimentam um ataque inicial. Aqueles pacientes que gradualmente pioram após o aparecimento do primeiro sintoma têm PPMS. Poucos pacientes com MS progressiva primária irão experimentar mais tarde uma exacerbação; esses pacientes têm PRMS.

Testes clínicos para diagnóstico e/ou monitoramento da progressão de MS incluem, por exemplo, varredura visualização por ressonância magnética (MRI) para detectar lesões ou monitorar tamanho de lesão, punção lombar para detectar evidência de inflamação, um teste de potencial evocado (olho, orelha, pele) para medir a velocidade em que mensagens do cérebro passam ao longo dos nervos em resposta a estímulos (visual, auditório, ou dor, respectivamente), uso da escala de estado de desabilidade expandida de Kurtzke (EDSS) para taxar a gravidade dos sintomas, urinálise para medir o nível de material semelhante proteína básica de mielina presente em uma amostra de urina, medição de atrofia no cérebro

ou medula espinhal e detecção de buracos negros (áreas no cérebro que emitem sinais muito baixos em uma varredura de MRI). Consequentemente, a invenção abrange o uso de um anticorpo anti-CD3 da invenção para o tratamento de esclerose múltipla em paciente que exibem uma ou mais 5 indicações de ter a doença, ou em que um diagnóstico de acordo com critérios de McDonald foi estabelecido.

Embora não estando ligado por um mecanismo particular de ação, a administração de anticorpo anti-CD3 e em particular, hOKT3 ala-ala, leva ao tratamento de distúrbios autoimunes, incluindo, por exemplo, diabetes 10 tipo 1 e MS, pela indução de tolerância imunológica. Múltiplos estudos identificaram vários mecanismos possíveis pelos quais hOKT3y1 ala-ala pode induzir tolerância incluindo indução de anergia de célula T, um processo pelo qual célula T se tornam quiescentes e falham em reagir a抗ígenos próprios; ativação de populações  $T_{reg}$ , subpopulações recentemente identificadas de 15 célula T que são expandidas por hOKT3y1 ala-ala *in vivo* e exercem efeitos inibitórios dominantes em células T autorreativas e produção acentuada de citocinas tipo Th2 imunorregulatórias tal como IL-10 e TGF(3, que contribuem para supressão mediada por  $T_{Reg}$  *in vivo* (veja, p. ex., Kohm *et al.*, 2005, Int Rev Immunol 24: 361-392, Filippi *et al.*, 2005, Int Rev Immunol 24: 20 341-360 e Chen *et al.*, 2004 Cell Mol Immunol 1: 328-335).

### **5.2.3 Psoríase**

Psoríase é um doença de pele inflamatória, hiperproliferativa que afeta aproximadamente 1-2% da população geral com homens e mulheres afetados em números iguais (Nevitt, G. J. *et al.*, 1996, British J of 25 Dermatology 135: 533-537). Aproximadamente 150.000 novos casos de psoríase e aproximadamente 400 mortes de psoríase são relatadas cada ano (Stem, R. S. 1995, Dermatol Clin 13: 717-722). O tipo mais comum de psoríase é síndrome de placa crônica. A patologia é crônica para muitos sofredores e consiste em períodos de remissão e reincidência durante o curso

da doença (Ashcroft, D. M. *et al.*, 2000, *J of Clin Pharm and Therap* 25: 1-10).

Psoríase é caracterizada por placas endurecidas, escalantes eritematosas mais comumente localizadas no escâlpo ou faces extensoras dos cotovelos e joelhos, mas podem ocorrer em qualquer sítio cutâneo. Opções de tratamento presentes atualmente disponíveis para psoríase incluem agentes tópicos, fototerapia e agentes sistêmicos. Tratamentos tópicos são terapia de primeira linha para pacientes com psoríase de placa leve a moderada. O tratamento sistêmico é geralmente prescrito para vários casos de psoríase onde a terapia tópica é não prática ou ineficaz. A fototerapia pode ser administrada sozinha ou em combinação com agentes tópicos ou sistêmicos. Infelizmente, cada uma dessas opções de tratamento está associada com graves efeitos colaterais. A maioria dos agentes tópicos disponíveis para o tratamento de psoríase está associada com irritação cutânea, toxicidade e possível carcinogenicidade (Ashcroft, D. M. *et al.*, 2000, *J of Clin Pharm and Therap* 25: 1-10). Fototerapia, ou banda ampla (UVB) ou onda longa (UVA) está associada com riscos em curto prazo tal como vesiculação, náusea, eritema, cefaléia e dor na pele assim como riscos de longo prazo de ceratoses actínicas, envelhecimento prematuro da pele, pigmentação irregular e carcinoma de célula escamosa que é relatado em um quarto dos paciente (Stern, R. S., 1994, *Cancer* 73: 2759-2764). Agentes sistêmicos também estão associados com efeitos colaterais adversos e a maioria está indisponível a pacientes grávidas. Em particular, metotrexato, que é considerado como sendo o 'padrão ouro' para tratamento de psoríase grave, porta um risco de hepatotoxicidade com uso em longo prazo. Além disso, é recomendado que pacientes tenham uma biópsia de revestimento realizada no ou próximo ao início de cada tratamento e após cada dose cumulativa de 1,0-1,5 mg de MTX (Roenigk, H. H. *et al.*, 1988, *J of the Am Acad of Dermatology*).

Quando pacientes são fornecidos com informação em relação a

possíveis efeitos adversos das terapias atualmente disponíveis para psoríase, muitos frequentemente escolhem viver com a patologia em vez de sofrer tratamento (Greaves M. W. 1995, New England J of Medicine 332: 581-588). Assim, permanece uma necessidade por melhores métodos para tratar psoríase 5 que as terapias atualmente disponíveis.

O uso da invenção no contexto de psoríase, portanto, abrange métodos para tratar as fases agudas da doença assim como para prevenir a recorrência de sintomas de psoríase. A resposta a terapia de anti-CD3 no contexto de psoríase pode ser avaliada por métodos descritos aqui ou por 10 qualquer método conhecido por alguém de conhecimento ordinário da técnica. Métodos comuns usados para monitorar os sintomas de psoríase incluem, mas não estão limitados a, o Índice de Gravidade e Área de Psoríase (PAST), Avaliação Global do Médico (PGA) e Pontuação de Psoríase NPF (NPF-PS) (Veja Ashcroft *et al.*, 1999, Br J Dermatol 141: 185-191; van der Kerkhof *et* 15 *al.*, 1997, Br J Dermatol 137: 661-662 e Krueger *et al.*, 1999, National Psoriasis Foundation Psoriasis Forum 5: 1-5, respectivamente).

#### **5.2.4 Artrite reumatóide**

Artrite reumatóide (RA) é um distúrbio autoimune onde o sistema imune do corpo inadequadamente identifica as membranas sinoviais 20 que secretam o fluido de lubrificação nas articulações como estranhas. Resulta inflamação e a cartilagem e tecidos na e em torno das articulações são lesionados ou destruídos. Em casos graves, esta inflamação se estende para outros tecidos articulares e cartilagem circundante, onde ela pode erodir ou destruir osso e cartilagem e levar à deformidades articulares. O corpo substitui 25 tecido lesionado com tecido de cicatriz, levando os espaços normais dentro das articulações a se tornarem estreitos e os ossos a fundirem-se. A artrite reumatóide cria inflexibilidade, inchaço, fadiga, anemia, perda de peso, febre, e frequentemente, dor paralisante. Alguns sintomas comuns de artrite reumatóide incluem inflexibilidade articular ao despertar que duram uma hora

ou mais; inchaço em um dedo específico ou articulações dos punhos; inchaço no tecido mole em volta das articulações; e inchaço em ambos os lados da articulação. Inchaço pode ocorrer com ou sem dor e pode piorar progressivamente ou permanecer o mesmo por anos antes e progredir. Além 5 da artrite reumatóide, outros tipos de artrite associados com inflamação autoimune incluem os seguintes: artrite psoriática, síndrome de Reiter e artrite de espondilite anquilosante. A artrite reumatóide ocorre em articulações dos dois lados do corpo (tal como de ambas as mãos, punhos ou joelhos). Esta simetria auxilia a distinguir artrite reumatóide de outros tipos de artrite. Além 10 disso, para *afetar* as articulações, a artrite reumatóide pode ocasionalmente afetar a pele, olhos, pulmões, coração, sangue ou nervos.

A artrite reumatóide afeta cerca de 1% da população mundial e é potencialmente incapacitante. Existem aproximadamente 2,9 milhões de incidências de artrite reumatóide nos Estados Unidos. Duas ou três vezes mais 15 mulheres são afetadas que homens. A idade típica em que a artrite reumatóide ocorre está entre 25 e 50. A artrite reumatóide juvenil afeta 71.000 americanos jovens (com idade até dezoito), afetando seis vezes mais garotas que garotos.

A terapia atualmente disponível para a artrite se foca em 20 reduzir a inflamação das articulações com medicações anti-inflamatórias ou imunossupressoras. A primeira linha de tratamento de qualquer artrite é geralmente anti-inflamatórios, tal como aspirina, ibufreno e inibidores de Cox-2 tal como celecoxib e rofecoxib. “Fármacos de segunda linha” incluem ouro, metotrexato e esteróides. Embora esses sejam tratamentos bem 25 estabelecidos para artrite, muitos poucos pacientes remitem nessas linhas de tratamento apenas. Avanços recentes no entendimento da patogênese de artrite reumatóide levaram ao uso de metotrexato em combinação com anticorpos para citocinas ou receptores solúveis recombinantes. Entretanto, apenas cerca de 50% dos pacientes tratados com uma combinação de

metotrexato e agentes anti-TNF tal como receptores solúveis recombinantes para TNF-a mostram melhora clinicamente significativa. Muitos pacientes permanecem refratários apesar do tratamento. Questões de tratamento difícil ainda permanecem para pacientes com artrite reumatóide. Muitos tratamentos 5 atuais têm uma alta incidência de efeitos colaterais ou não podem prevenir completamente a progressão de doença.

O uso da invenção no contexto de RA, portanto, abrange métodos para tratar as fases agudas da doença assim como para prevenir a recorrência de sintomas de RA. A resposta aos métodos terapêuticos da 10 invenção no contexto de RA podem ser avaliadas por métodos descritos aqui ou por qualquer método conhecido por alguém de conhecimento ordinário da técnica. Por exemplo, muitas, mas não todas, as pessoas com artrite reumatóide têm anticorpo de fator reumatóide em seus sangues; entretanto, a presença de fator reumatóide não é por si só definitivo para um diagnóstico 15 positivo de RA conforme são conhecidas outras patologias que levam o fator reumatóide a ser produzido. Portanto, o diagnóstico e avaliação de artrite reumatóide é mais comumente baseado em uma combinação de fatores, incluindo, mas não limitando a: localização específica e simetria de articulações doloridas, a presença de inflexibilidade articular na manhã, a 20 presença de galos e nódulos sob a pele (nódulos reumatóides), resultados de testes de raios-X que sugerem artrite reumatóide. A invenção abrange qualquer método para avaliar a gravidade da patologia aceito na técnica. Métodos de avaliação comuns são baseados nas respostas do indivíduo dos 25 questionários de dor do indivíduo (p. ex., O Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ) com Subescalas de Desabilidade, Gravidade de Dor e Estado de Saúde); entretanto, tais avaliações individuais são frequentemente confundidas pelo funcionamento fisiológico do indivíduo. Consequentemente, foram desenvolvidas escalas objetivas que permitem avaliação quantitativa de gravidade de artrite reumatóide pelo médico de tratamento, p. e.x, a Escala de

Gravidade de Artrite Reumatóide (“RASS”; veja, p. ex., Bardwell *et al.*, 2002, *Rheumatology* 41: 38-45, incorporada por meio deste como referência em sua totalidade).

### **5.2.5 Transplante de tecidos**

Transplante de tecidos entre indivíduos geneticamente não idênticos resulta em rejeição imunológica do tecido através de mecanismos dependentes de célula T. Para prevenir rejeição de aloenxerto, a imunossupressão é atingida com agentes que interferem geralmente com a função de célula T pela modulação de transdução de sinal de TcR (veja, p. ex., Borel, J. F., 1989, *Pharmacol Rev* 42: 260-372; Morns P. J., 1991, *Curr Opin Immunol* 3: 748-751; Sigal *et al.*, 1992, *Ann Rev Immunol* 10: 519-560 e L'Azou *et al.*, 1999, *Arch Toxicol* 73: 337-345). Adicionalmente, visto que o efeito dos agentes imunossupressores é de curta duração, receptores de transplantes normalmente requerem tratamento por todo a vida com agente imunossupressores para prevenir rejeição de transplante. Receptores de transplantes que recebem tratamento imunossupressivo de longa duração têm um alto risco de desenvolver infecções e tumores. Por exemplo, pacientes que recebem imunoterapia estão sob risco mais alto de desenvolver linfomas, tumores de pele e tumores cerebrais (veja, p. ex., Fellstrom *et al.*, 1993, *Immunol Rev* 134: 83-98). Como uma alternativa para agentes imunossupressivos gerais atualmente usados para a prevenção de rejeição de aloenxerto, anticorpos monoclonais, incluindo OKT3, foram prosperamente usados para bloquear especificamente receptores envolvidos em ativação por estimulação de célula T.

O uso da invenção no contexto de transplante de tecidos, portanto, abrange métodos para tratar as fases agudas da rejeição assim como para prevenir a recorrência de sintomas de rejeição. A resposta aos métodos terapêuticos da invenção no contexto de tecido pode ser avaliada por métodos descritos aqui ou por qualquer método conhecido por alguém de

conhecimento ordinário da técnica; entretanto, nenhum método geral, fora detectar uma frequência crescente de CTL que reconhece抗ígenos de doador (descrito *infra*), existe presentemente para monitorar se um transplante está sendo rejeitado por um receptor. Embora a função de alguns transplantes 5 possa ser diretamente monitorada (isto é, rim ou fígado), frequentemente o primeiro sinal público de rejeição é uma completa insuficiência fisiológica do tecido, ponto em que o tecido está normalmente além da salvação.

### **5.2.6 Diagnóstico, predição e avaliação de distúrbios autoimunes**

Pacientes com distúrbios autoimunes geralmente têm uma 10 frequência crescente de CTL que reconhecem autoantígenos. No contexto de transplante de tecidos, os pacientes exibirão uma frequência crescente de CTL que reconhecem抗ígenos específicos de doador. Tal CTL autorreativo ou reativo a doador podem ser detectado no sangue periférico ou tecidos alvo. Por exemplo, no paciente diabético, CTL autorreativo pode ser detectado em 15 tecidos de célula da ilhota pancreática; no paciente psoriático, CTL autorreativo pode ser detectado em tecidos epidérmicos e dérmicos; no paciente com artrite, CTL autorreativo pode ser detectado em tecidos celulares sinoviais e no receptor de transplante de órgão, CTL reativo a doador pode ser detectado no enxerto do transplante. Visto que se pensa que a 20 geração de CTL autorreativo ou reativo a doador precede o desenvolvimento de anticorpos auto/doador e outros indícios dos sintomas clínicos de distúrbios imunes, detecção de CTL específica podem em alguns casos permitir diagnóstico mais sensível e específico do distúrbio.

Os ensaios também podem ser usados para quantificar tanto o 25 número absoluto como a proporção de CTL autorreativa presente em uma amostra, tal como uma amostra de sangue periférico, tanto em indivíduos pré-clínicos como pacientes que receberam terapia. Em algumas modalidades, tanto a gravidade como o curso do distúrbio autoimune ou de aloenxerto podem ser previstos e seguidos usando tais ensaios. Por exemplo, a molécula

de classe I de MHC humano HLA-A 0201 pode ser usada em combinação com um autoantígeno diabético, por exemplo, IA-2, para detectar CTL autorreativo presente em uma amostra de sangue periférico de um indivíduo pré-diabético ou paciente diabético atualmente sofrendo terapia usando os 5 métodos da invenção.

Os compostos da invenção também podem ser usados *in vivo* em combinação com, por exemplo, técnicas de visualização ou outros métodos de detecção para detectar CTLs marcados pela ligação com compostos ou formulações da invenção.

10 CTLs antígeno-específicos podem ser detectados usando uma ampla variedade de ensaios, incluindo ensaios de imunoponto (p. ex., ELISPOT), ensaios de tetrâmero de classe I de MHC ou outros ensaios como descrito aqui ou como conhecido por uma pessoa versada na técnica.

15 O período de tempo pelo qual qualquer biomarcador de progressão de distúrbio eficácia terapêutica pode ser avaliado pode ser o período de tempo de uma única dose ou um período de tempo de tratamento estendido, p. ex., horas, dias, semanas ou meses.

### **5.2.7 Métodos terapêuticos e profiláticos**

As composições e métodos da invenção são particularmente 20 úteis para a prevenção, tratamento e melhora de doenças mediadas por célula T tais como distúrbios autoimunes caracterizados por infiltração de célula T aumentada de linfócitos em tecidos afetados ou distúrbios autoimunes 25 caracterizados por ativação de célula T aumentada e/ou apresentação e/ou reconhecimento de antígeno anormal. As composições e métodos também são úteis para a prevenção, tratamento e melhora de distúrbios inflamatórios caracterizados pela ativação de célula T aumentada e/ou apresentação de antígeno anormal. Em modalidades específicas, a invenção fornece métodos para tratar, prevenir, controlar ou melhorar os sintomas de uma doença autoimune, particularmente, diabetes tipo 1, esclerose múltipla, colite

ulcerativa, psoríase, artrite reumatóide, lúpus (particularmente, cutâneo), artrite psoriática, doença do intestino inflamatória (IBD), efeitos de transplante de órgãos e doença enxerto contra hospedeiro (GVHD). De preferência, os regimes de tratamento descritos aqui são administrados a 5 pacientes em estágios iniciais da doença autoimune, exibindo lesão tecidual leve resultando da reação imune e requerendo mínima intervenção médica, p. ex., baixas doses de terapia padrão, para controlar a doença. Os regimes de tratamento descritos aqui mantêm alto nível de funcionamento e previnem, diminuem ou reduzem lesão tecidual adicional. Assim, os métodos da 10 invenção podem reduzir a necessidade por terapia adicional para tratar, controlar ou melhorar a doença ou distúrbio e/ou sintomas destes.

Em certas modalidades, composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3 humano) são administradas uma ou mais vezes, de 15 preferência em um regime de dosagem administrado em múltiplas doses por um período de 2 até 20 dias, para tratar, controlar ou melhorar os sintomas de um distúrbio de diabetes autoimune, para prevenir ou diminuir a diminuição em função de célula  $\beta$  associada com diabetes autoimune, ou retardar ou prevenir o início de um distúrbio de diabetes autoimune em um indivíduo com 20 uma predisposição para desenvolvimento de diabetes tipo 1 como descrito aqui. Ainda em outra modalidade, uma ou mais composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3 humano) são administradas uma ou mais vezes para 25 prevenir a diminuição em função de célula  $\beta$  associada com diabetes em um indivíduo que teve um aloenxerto compreendendo tecido de célula da ilhota pancreática. De acordo com essas modalidades, alterações em uma função de célula  $\beta$  do indivíduo podem ser avaliadas pela caracterização de requerimentos de insulina diária, níveis de HbA1c, níveis/função de peptídeo C, frequência de episódios hipoglicêmicos ou FPIR como conhecido na

técnica.

Em certas modalidades, o curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com os métodos da invenção é repetido em intervalos de 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 12 5 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, ou 36 meses. Em modalidades específicas, a eficácia do tratamento com um anticorpo anti-CD3 da invenção é determinada como descrito aqui ou como conhecido na técnica em 2 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 10 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, ou 36 meses subsequentes ao tratamento prévio.

10 Em outra modalidade, a um indivíduo é administrada uma ou mais doses 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, 15 aproximadamente 1-10 µg/kg, aproximadamente 20-40 µg/kg, aproximadamente 20-30 µg/kg, aproximadamente 22-28 µg/kg, ou aproximadamente 25-26 µg/kg de um ou mais anticorpos anti-CD3 para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune, particularmente diabetes. Em outra modalidade, a um indivíduo é 20 administrada uma ou mais unidades de doses de 200 µg/kg, 178 µg/kg, 180 µg/kg, 128 µg/kg, 100 µg/kg, 95 µg/kg, 90 µg/kg, 85 µg/kg, 80 µg/kg, 75 µg/kg, 70 µg/kg, 65 µg/kg, 60 µg/kg, 55 µg/kg, 50 µg/kg, 45 µg/kg, 40 µg/kg, 35 µg/kg, 30 µg/kg, 26 µg/kg, 25 µg/kg, 20 µg/kg, 15 µg/kg, 13 µg/kg, 10 µg/kg, 6,5 µg/kg, 5 µg/kg, 3,2 µg/kg, 3 µg/kg, 2,5 µg/kg, 2 µg/kg, 1,6 µg/kg, 25 1,5 µg/kg, 1 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,1 µg/kg, ou 0,05 µg/kg de um ou mais anticorpos anti-CD3 para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune, particularmente diabetes.

Em uma modalidade, a um indivíduo é administrada uma ou mais dose de 200 µg/kg ou menos, 175 µg/kg ou menos, 150 µg/kg ou menos,

128 µg/kg ou menos, 100 µg/kg ou menos, 95 µg/kg ou menos, 90 µg/kg ou  
menos, 85 µg/kg ou menos, 80 µg/kg ou menos, 75 µg/kg ou menos, 70 µg/kg  
ou menos, 65 µg/kg ou menos, 60 µg/kg ou menos, 55 µg/kg ou menos, 50  
µg/kg ou menos, 45 µg/kg ou menos, 40 µg/kg ou menos, 35 µg/kg ou menos,  
5 30 µg/kg ou menos, 25 µg/kg ou menos, 20 µg/kg ou menos, 15 µg/kg ou  
menos, 10 µg/kg ou menos, 5 µg/kg ou menos, 2,5 µg/kg ou menos, 2 µg/kg  
ou menos, 1,5 µg/kg ou menos, 1 µg/kg ou menos, 0,5 µg/kg ou menos, 0,25  
µg/kg ou menos, 0,1 µg/kg ou menos, ou 0,05 µg/kg ou menos de um ou mais  
anticorpos anti-CD3 da invenção para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais  
10 sintomas de um distúrbio autoimune, tal como, mas não limitando a, diabetes.

Em modalidades particulares, a um indivíduo é administrada uma ou mais dose de 5-1200 µg/m<sup>2</sup>, de preferência, 51-826 µg/m<sup>2</sup>. Em outra modalidade, a um indivíduo é administrada uma ou mais dose de 1200 µg/m<sup>2</sup>, 1150 µg/m<sup>2</sup>, 1100 µg/m<sup>2</sup>, 1050 µg/m<sup>2</sup>, 1000 µg/m<sup>2</sup>, 950 µg/m<sup>2</sup>, 900 µg/m<sup>2</sup>,  
15 850 µg/m<sup>2</sup>, 800 µg/m<sup>2</sup>, 750 µg/m<sup>2</sup>, 700 µg/m<sup>2</sup>, 650 µg/m<sup>2</sup>, 600 µg/m<sup>2</sup>, 550  
µg/m<sup>2</sup>, 500 µg/m<sup>2</sup>, 450 µg/m<sup>2</sup>, 400 µg/m<sup>2</sup>, 350 µg/m<sup>2</sup>, 300 µg/m<sup>2</sup>, 250 µg/m<sup>2</sup>,  
200 µg/m<sup>2</sup>, 150 µg/m<sup>2</sup>, 100 µg/m<sup>2</sup>, 50 µg/m<sup>2</sup>, 40 µg/m<sup>2</sup>, 30 µg/m<sup>2</sup>, 20 µg/m<sup>2</sup>,  
15 µg/m<sup>2</sup>, 10 µg/m<sup>2</sup>, ou 5 µg/m<sup>2</sup> de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano  
para prevenir, tratar, diminuir a progressão de, retardar o início de ou  
melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio ou doença autoimune.

Em outra modalidade, ao indivíduo é administrado um regime de tratamento compreendendo uma ou mais dose de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano, em que o curso de tratamento é administrado por 2 dias, 3 dias,  
25 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou  
14 dias. EM uma modalidade, o regime de tratamento compreende administrar doses da quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano todo dia, a cada 2 dias, a cada 3  
dias ou a cada 4 dias. Em certas modalidades, o regime de tratamento

compreende administrar doses de quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano na segunda-feira, terça-feira, quarta-feira, quinta-feira de uma dada semana e não administrar doses da quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de 5 um ou mais anticorpos anti-CD3 humano na sexta-feira, sábado e domingo da mesma semana até 14 doses, 13 doses, 12 doses, 11 doses, 9 doses, ou 8 doses serem administradas. Em certas modalidades, a dose administrada é a mesma em cada dia do regime. Em certas modalidades, a um indivíduo é administrado um regime de tratamento compreendendo uma ou mais doses de 10 uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano, em que a quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz é de 200 µg/kg/dia/dia, 175 µg/kg/dia, 150 µg/kg/dia, 125 µg/kg/dia, 100 µg/kg/dia, 95 µg/kg/dia, 90 µg/kg/dia, 85 µg/kg/dia, 80 µg/kg/dia, 75 µg/kg/dia, 70 µg/kg/dia, 65 µg/kg/dia, 60 µg/kg/dia, 55 µg/kg/dia, 50 µg/kg/dia, 45 µg/kg/dia, 40 µg/kg/dia, 35 µg/kg/dia, 30 µg/kg/dia, 26 µg/kg/dia, 25 µg/kg/dia, 20 µg/kg/dia, 15 µg/kg/dia, 13 µg/kg/dia, 10 µg/kg/dia, 6,5 µg/kg/dia, 5 µg/kg/dia, 3,2 µg/kg/dia, 3 µg/kg/dia, 2,5 µg/kg/dia, 2 µg/kg/dia, 1,6 µg/kg/dia, 1,5 µg/kg/dia, 1 µg/kg/dia, 0,5 µg/kg/dia, 0,25 µg/kg/dia, 0,1 µg/kg/dia, ou 0,05 µg/kg/dia; e/ou em que a 15 quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz é de 1200 µg/m<sup>2</sup>/dia, 1150 µg/m<sup>2</sup>/dia, 1100 µg/m<sup>2</sup>/dia, 1050 µg/m<sup>2</sup>/dia, 1000 µg/m<sup>2</sup>/dia, 950 µg/m<sup>2</sup>/dia, 900 µg/m<sup>2</sup>/dia, 850 µg/m<sup>2</sup>/dia, 800 µg/m<sup>2</sup>/dia, 750 µg/m<sup>2</sup>/dia, 700 µg/m<sup>2</sup>/dia, 650 µg/m<sup>2</sup>/dia, 600 µg/m<sup>2</sup>/dia, 550 µg/m<sup>2</sup>/dia, 500 µg/m<sup>2</sup>/dia, 450 µg/m<sup>2</sup>/dia, 400 µg/m<sup>2</sup>/dia, 350 µg/m<sup>2</sup>/dia, 300 µg/m<sup>2</sup>/dia, 250 µg/m<sup>2</sup>/dia, 200 µg/m<sup>2</sup>/dia, 150 µg/m<sup>2</sup>/dia, 100 µg/m<sup>2</sup>/dia, 50 µg/m<sup>2</sup>/dia, 40 µg/m<sup>2</sup>/dia, 30 µg/m<sup>2</sup>/dia, 20 µg/m<sup>2</sup>/dia, 15 µg/m<sup>2</sup>/dia, 10 µg/m<sup>2</sup>/dia, ou 5 µg/m<sup>2</sup>. Em outra 20 modalidade, a dose intravenosa de 1200 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 1150 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 1100 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 1050 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 1000 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 950 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 900 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 850 µg/m<sup>2</sup> ou menos, 800 µg/m<sup>2</sup>

ou menos, 750  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 700  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 650  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 600  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 550  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 450  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 400  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 350  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 300  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 250  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 150  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 40  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 30  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 20  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, 10  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos, ou 5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ou menos de um ou mais anticorpos anti-CD3 é administrada por cerca de 24 horas, cerca de 22 horas, cerca de 20 horas, cerca de 18 horas, cerca de 16 horas, cerca de 14 horas, cerca de 12 horas, cerca de 10 horas, cerca de 8 horas, cerca de 6 horas, cerca de 4 horas, cerca de 2 horas, cerca de 1,5 horas, cerca de 1 hora, cerca de 50 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 5 minutos, cerca de 2 minutos, cerca de 1 minuto, cerca de 30 segundos ou cerca de 10 segundos para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1. A dosagem total da duração do regime é de preferência um total de menos de 9000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 8000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 7000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 6000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  e pode ser menos de 5000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 4000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 3000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 2000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ . Em modalidades específicas, a dosagem total administrada no regime é de 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  até 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  até 500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  até 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  até 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ .

Em modalidades preferidas, a dose aumenta progressivamente no primeiro quarto, primeira metade ou primeiros 2/3 das doses (p. ex., nos primeiros 2, 3, 4, 5 ou 6 dias de um regime de 10, 12, 14, 16, 18 ou 20 dias de uma dose por dia) do regime de tratamento até a quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz diária de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano ser atingida. Em certas modalidades, a um indivíduo é administrado um regime de tratamento compreendendo uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano, em que a quantidade profilaticamente ou terapeuticamente

eficaz é aumentada em, p. ex., 0,01 µg/kg, 0,02 µg/kg, 0,04 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,75 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, 50 µg/kg, 55 µg/kg,  
5 60 µg/kg, 65 µg/kg, 70 µg/kg, 75 µg/kg, 80 µg/kg, 85 µg/kg, 90 µg/kg, 95 µg/kg, 100 µg/kg, ou 125 µg/kg cada dia; ou aumentada em, p. ex., 1 µg/m<sup>2</sup>, 5 µg/m<sup>2</sup>, 10 µg/m<sup>2</sup>, 15 µg/m<sup>2</sup>, 20 µg/m<sup>2</sup>, 30 µg/m<sup>2</sup>, 40 µg/m<sup>2</sup>, 50 µg/m<sup>2</sup>, 60 µg/m<sup>2</sup>, 70 µg/m<sup>2</sup>, 80 µg/m<sup>2</sup>, 90 µg/m<sup>2</sup>, 100 µg/m<sup>2</sup>, 150 µg/m<sup>2</sup>, 200 µg/m<sup>2</sup>, 250 µg/m<sup>2</sup>, 300 µg/m<sup>2</sup>, 350 µg/m<sup>2</sup>, 400 µg/m<sup>2</sup>, 450 µg/m<sup>2</sup>, 500 µg/m<sup>2</sup>, 600 µg/m<sup>2</sup>,  
10 ou 650 µg/m<sup>2</sup>, cada dia conforme o tratamento progrida. Em certas modalidades, a um indivíduo é administrado um regime de tratamento compreendendo uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano, em que a quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz é aumentada por um fator de 1,25, um fator de 1,5, um fator de 2, um fator de 2,25, um fator de 2,5, ou um fator de 5 até a quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano ser atingida.  
15

Em uma modalidade específica, a um indivíduo é administrada intramuscularmente uma ou mais doses de 200 µg/kg ou menos, de preferência 175 µg/kg ou menos, 150 µg/kg ou menos, 125 µg/kg ou menos, 100 µg/kg ou menos, 95 µg/kg ou menos, 90 µg/kg ou menos, 85 µg/kg ou menos, 80 µg/kg ou menos, 75 µg/kg ou menos, 70 µg/kg ou menos, 65 µg/kg ou menos, 60 µg/kg ou menos, 55 µg/kg ou menos, 50 µg/kg ou menos, 45 µg/kg ou menos, 40 µg/kg ou menos, 35 µg/kg ou menos, 30 µg/kg ou menos, 25 µg/kg ou menos, 20 µg/kg ou menos, 15 µg/kg ou menos, 10 µg/kg ou menos, 5 µg/kg ou menos, 2,5 µg/kg ou menos, 2 µg/kg ou menos, 1,5 µg/kg ou menos, 1 µg/kg ou menos, ou 0,5 µg/kg ou menos de um ou mais anticorpos anti-CD3 para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune.

Em outra modalidade, a um indivíduo é administrada subcutaneamente uma ou mais doses de 200 µg/kg ou menos, de preferência 175 µg/kg ou menos, 150 µg/kg ou menos, 125 µg/kg ou menos, 100 µg/kg ou menos, 95 µg/kg ou menos, 90 µg/kg ou menos, 85 µg/kg ou menos, 80 µg/kg ou menos, 75 µg/kg ou menos, 70 µg/kg ou menos, 65 µg/kg ou menos, 60 µg/kg ou menos, 55 µg/kg ou menos, 50 µg/kg ou menos, 45 µg/kg ou menos, 40 µg/kg ou menos, 35 µg/kg ou menos, 30 µg/kg ou menos, 25 µg/kg ou menos, 20 µg/kg ou menos, 15 µg/kg ou menos, 10 µg/kg ou menos, 5 µg/kg ou menos, 2,5 µg/kg ou menos, 2 µg/kg ou menos, 1,5 µg/kg ou menos, 1 µg/kg ou menos, ou 0,5 µg/kg ou menos de um ou mais anticorpos anti-CD3 para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune.

Em outra modalidade, a um indivíduo é administrada intravenosamente uma ou mais doses de 100 µg/kg ou menos, de preferência 95 µg/kg ou menos, 90 µg/kg ou menos, 85 µg/kg ou menos, 80 µg/kg ou menos, 75 µg/kg ou menos, 70 µg/kg ou menos, 65 µg/kg ou menos, 60 µg/kg ou menos, 55 µg/kg ou menos, 50 µg/kg ou menos, 45 µg/kg ou menos, 40 µg/kg ou menos, 35 µg/kg ou menos, 30 µg/kg ou menos, 25 µg/kg ou menos, 20 µg/kg ou menos, 15 µg/kg ou menos, 10 µg/kg ou menos, 5 µg/kg ou menos, 2,5 µg/kg ou menos, 2 µg/kg ou menos, 1,5 µg/kg ou menos, 1 µg/kg ou menos, ou 0,5 µg/kg ou menos de um ou mais anticorpos anti-CD3 para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune.

Em outra modalidade, a dose intravenosa de 100 µg/kg ou menos, 95 µg/kg ou menos, 90 µg/kg ou menos, 85 µg/kg ou menos, 80 µg/kg ou menos, 75 µg/kg ou menos, 70 µg/kg ou menos, 65 µg/kg ou menos, 60 µg/kg ou menos, 55 µg/kg ou menos, 50 µg/kg ou menos, 45 µg/kg ou menos, 40 µg/kg ou menos, 35 µg/kg ou menos, 30 µg/kg ou menos, 25 µg/kg ou menos, 20 µg/kg ou menos, 15 µg/kg ou menos, 10 µg/kg ou menos, 5 µg/kg ou menos, 2,5 µg/kg ou menos, 2 µg/kg ou menos, 1,5 µg/kg ou menos, 1 µg/kg ou menos,

ou 0,5 µg/kg ou menos de um ou mais anticorpos anti-CD3 é administrada por cerca de 6 horas, cerca de 4 horas, cerca de 2 horas, cerca de 1,5 horas, cerca de 1 hora, cerca de 50 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 20 minutos, cerca de 10 minutos, cerca de 5 minutos, cerca de 2 minutos, cerca de 1 minuto, cerca de 30 segundos ou cerca de 10 segundos para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune.

Em uma modalidade específica em que doses que aumentam progressivamente são administradas para os primeiros dias do regime de dosagem, a dose no dia 1 do regime é de 5–100 µg/m<sup>2</sup>/dia, de preferência, 51 µg/m<sup>2</sup>/dia e aumenta progressivamente a dose diária como recitado imediatamente acima nos dias 3, 4, 5, 6 ou 7. Por exemplo, no dia 1, ao indivíduo é administrada uma dose de aproximadamente 51 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 2 aproximadamente 103 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 3 aproximadamente 207 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 4 aproximadamente 413 µg/m<sup>2</sup>/dia e nos dias subsequentes do regime (p. ex., dias 5-14) 826 µg/m<sup>2</sup>/dia. Em outra modalidade, no dia 1, ao indivíduo é administrada uma dose de aproximadamente 227 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 2 aproximadamente 459 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 3 e dias subsequentes, aproximadamente 919 µg/m<sup>2</sup>/dia. Em outra modalidade, no dia 1, ao indivíduo é administrada uma dose de aproximadamente 284 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 2 aproximadamente 574 µg/m<sup>2</sup>/dia, no dia 3 e dias subsequentes, aproximadamente 1148 µg/m<sup>2</sup>/dia.

Em outras modalidades, a dose inicial é de 1/4, até 1/2, para igualar-se à dose diária no fim do regime, mas é administrada em porções em intervalos de 6, 8, 10 ou 12 horas. Por exemplo, uma dose de 13 µg/kg/dia é administrada em quatro doses de 3-4 µg/kg em intervalos de 6 horas para reduzir o nível de liberação de citocina causado pela administração do anticorpo.

Em modalidades específicas, para reduzir a possibilidade de

liberação de citocina e outros efeitos adversos, as primeiras 1, 2, 3 ou 4 doses ou todas as doses no regime são administradas mais vagarosamente por administração intravenosa. Por exemplo, uma dose de 51  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  pode ser administrada por cerca de 5 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 30 5 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 8 horas, cerca de 10 horas, cerca de 12 horas, cerca de 14 horas, cerca de 16 horas, cerca de 18 horas, cerca de 20 horas e cerca de 22 horas. Em certas modalidades, a dose é administrada por infusão lenta por um período de, p. ex., 20 até 24 horas. Em modalidades específicas, 10 a dose é infundida por uma bomba, de preferência aumentando-se a concentração de anticorpo administrado conforme a infusão progrida.

Em outras modalidades, uma fração determinada das doses para o regime de 51  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  até 826  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$  descrita acima é administrada em dose que aumentam progressivamente. Em certas 15 modalidades, a fração é de 1/10, 1/4, 1/3, 1/2, 2/3, ou  $\frac{3}{4}$  das doses diárias do(s) regime(s) descritos acima. Consequentemente, por exemplo, quando a fração é de 1/10, as doses diárias serão de 5,1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 10,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2, 20,7  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 41,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 82,6  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 1/4, as doses serão de 12,75  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 25,5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  20 no dia 2, 51  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 103  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 207  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 1/3, as doses serão de 17  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 34,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2, 69  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 137,6  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 275,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 1/2, as doses serão de 25,5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 51  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  25 no dia 2, 103  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 207  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 413  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 2/3, as doses serão de 34  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 69  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2, 137,6  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 275,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 550,1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Quando a fração é de 3/4, as doses serão de 38,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 77,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2, 155,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 309,8  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 620  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 até 14. Em outras modalidades, o regime é idêntico a um daqueles

descritos acima, mas apenas nos dias 1 até 4, dias 1 até 5, ou dias 1 até 6. Por exemplo, em uma modalidade particular, as doses serão de 17  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 1, 34,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 2, 69  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 3, 137,6  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  no dia 4 e 275,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nos dias 5 e 6.

5 Em modalidades específicas, o anticorpo anti-CD3 humano não é administrado por doses diárias em um número de dias, mas em vez disso é administrado por infusão em de uma maneira ininterrupta por 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 20 horas, 24 horas, 30 horas ou 36 horas. A infusão pode ser constante ou pode partir de uma  
10 dosagem mais baixa, por exemplo, pelas primeiras 1, 2, 3, 5, 6, ou 8 horas da infusão e então aumentar para um dosagem mais alta daí em diante. No curso da infusão, o paciente recebe uma dose igual à quantidade administrada, por exemplo, nos regimes de dia 5 até 20 expostos acima. Por exemplo, uma dose de aproximadamente 150  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 250  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 750  
15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 1500  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 2000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 3000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 4000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 5000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 6000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 7000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 8000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou 9000  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ . Em particular, a velocidade e duração da infusão é desenhada para minimizar o nível de anticorpo anti-CD3 humano livre no indivíduo após a administração. Em certas modalidades, o nível de anticorpo anti-CD3 humano livre não deve  
20 exceder 200 ng/mL de anticorpo livre. Além disso, a infusão é desenhada para atingir uma cobertura e modulação de receptor de célula T combinadas de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou de 100%.

Em certas modalidades, o anticorpo administrado de acordo com esse regime é OKT3 $\gamma$ 1(ala-ala), p. ex., por administração intravenosa, tal  
25 como o título de soro do anticorpo administrado 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 2 semanas, 3 semanas ou 1 mês após o último dia do regime de dosagem.

Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado para atingir um certo nível de modulação e cobertura combinada

de complexos de receptor de célula T em células T, como determinado por métodos bem conhecidos na técnica, veja, p. ex., Exemplo 11 de publicação de pedido de patente US 2003/0108548, que é por meio deste incorporado como referência em sua totalidade. Em modalidades específicas, o regime de 5 dosagem atinge uma cobertura e modulação de receptor de célula T combinada de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou de 100% com, em modalidades específicas, pouco ou nenhum anticorpo anti-CD3 humano livre detectável (por exemplo, menos de 200 ng/mL o fármaco detectado no sangue do paciente).

10 Em outras modalidades, o anticorpo anti-CD3 humano é administrado cronicamente para tratar, prevenir, ou diminuir ou retardar o início ou progressão, ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1. Por exemplo, em certas modalidades, uma dose baixa do anticorpo anti-CD3 humano é administrada uma vez por mês, duas vezes por mês, três vezes por 15 mês, uma vez por semana ou mesmo mais frequentemente ou como uma alternativa ao regime de dosagem de 6 até 14 dias discutido acima ou após a administração de tal regime para acentuar ou manter seu efeito terapêutico. Tal dose baixa pode estar em qualquer ponto a partir de 1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  até 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , de preferência aproximadamente 5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 10  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 20  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 25  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 30  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 35  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 40  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 45  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ .

20 Em outras modalidades, o indivíduo pode ser re-dosado em algum momento subsequente à administração do regime de dosagem do anticorpo anti-CD3 humano, de preferência, com base em um ou mais parâmetros fisiológicos ou pode ser feito uma questão de curso. Tal redosagem pode ser administrada e/ou a necessidade de tal redosagem avaliada 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 9 meses, 1 ano, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 30 meses ou 3 anos após a administração de um regime de dosagem e pode incluir administrar um curso de tratamento a cada 6 meses, 9 meses, 1 ano, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 30 meses ou 3 anos

indefinidamente.

Em outras modalidades, o indivíduo pode ser re-dosado em algum momento subsequente à administração do regime de dosagem do anticorpo anti-CD3 humano, de preferência, com base em um ou mais parâmetros fisiológicos, ou pode ser feito como uma questão de curso. Tal redosagem pode ser administrada e/ou a necessidade de tal redosagem avaliada 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 9 meses, 1 ano, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 30 meses ou 3 anos após a administração de um regime de dosagem e pode incluir administrar um curso de tratamento a cada 6 meses, 9 meses, 1 ano, 15 meses, 18 meses, 2 anos, 30 meses ou 3 anos indefinidamente.

Em modalidades específicas, a indivíduos é administrada uma rodada subsequente de tratamento de anticorpo anti-CD3 humano com base em medições de uma ou uma combinação do seguinte: a razão de células CD4/CD8, contagem de células CD8, inversão CD4/CD3, razão de células CD4/CD25, razão de células CD4/FoxP3, razão de células CD4/CD40, razão de células CD4/IL-10 e/ou razão de células CD4/TGF-β.

Com respeito ao tratamento de controle de diabetes tipo 1, outros parâmetros para determinar se para administrar uma rodada subsequente de tratamento inclui uma aparecimento ou aumento de anticorpos anti-célula da ilhota, tal como GADAs, anticorpos IA-2 ou anticorpos anti-insulina ou um aparecimento ou aumento nos níveis de célula T específicas para antígenos de célula da ilhota. Doses subsequentes podem ser administradas se o número de células β ou atividade ou função de células β diminui em 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% quando comparado ao número de ou atividade ou função de células β durante a administração da rodada precedente de tratamento. Função de célula β pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, a resposta do peptídeo C a MMTT, OGTT, IGTT, ou grampo de glicose de duas

fases, ou o teste de Liberação de Insulina em Primeira Fase (FPIR), como discutido acima. Outros parâmetros que podem ser usados para determinar ou redosar inclui os níveis de HA1 ou HA1c, a necessidade de administração de insulina exógena ou aumento na dosagem de insulina exógena por mais de 0,1  
5 U/kg/dia, 0,2 U/kg/dia, 0,5 U/kg/dia, 0,6 U/kg/dia, 1 U/kg/dia, ou 2 U/kg/dia. Por exemplo, a um indivíduo pode ser administrada uma rodada subsequente de tratamento quando a resposta de peptídeo C ou FPIR do paciente a MMTT, OGTT, IGTT, ou grampo de glicose de duas fases diminui em mais de 1%, mais de 5%, mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, ou mais  
10 de 50% de níveis pré-tratamento. Em modalidades particulares, indivíduos são redosados se eles têm uma resposta de peptídeo C a MMTT, OGTT, IGTT, ou procedimento de grampo de glicose de duas fases (de preferência, MMTT) resultando em um AUC de menos de 40 pmol/mL/240 min, menos de 50 pmol/mL/240min, menos de 60 pmol/mL/240min, menos de 70  
15 pmol/mL/240min, menos de 80 pmol/mL/240min, ou menos de 90 pmol/mL/240min. Em modalidades específicas, indivíduos podem ser redosados eles têm um FPIR de menos de 300 pmol/L, menos de 400 pmol/L, menos de 500 pmol/L, menos de 600 pmol/L, ou menos de 700 pmol/L. Além disso, por exemplo, um indivíduo pode ser redosado quando os níveis de HA1  
20 ou HA1C aumentam em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% comparados a níveis pré-tratamento ou os níveis absolutos são maiores que 8%, maiores que 7,5%, ou maiores que 7%. Em outras modalidades, as doses adicionais podem ser  
25 administradas com base em aparecimento de ou aumento em número (tal como um aumento por, em média, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 ou 20), duração e/ou gravidade de episódios hipoglicêmicos ou de episódios de cetoacidose em uma base diária, semanal ou mensal.

Em uma modalidade específica, terapia de anti-CD3 humano é

usada em pacientes com diabetes tipo 1 que têm pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de função de célula  $\beta$  residual quando comparado a um indivíduo sem nenhum indicador de diabetes ou predisposição a diabetes na mesma população (isto é, idade, sexo, raça e saúde geral) e determinada por métodos descritos aqui ou conhecidos por alguém de conhecimento ordinário da técnica. Em outra modalidade, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente diminui em menos de 1%, 5 menos de 5%, menos de 10%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, 10 menos de 50% dos níveis de pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente é mantido em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 15 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano 20 de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente é mantido em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou 25 pelo menos 30 meses após o fim do tratamento e a contagem de linfócito média do paciente não é menor que 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou menos de 200 células/mL no

mesmo período de tempo. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente mantém-se em pelo 5 menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento e a contagem de plaquetas média do paciente 10 não é menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou menos de 100.000 15 plaquetas/mL.

Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3 humano) são administradas a um indivíduo que tem diabetes tipo 1, para prevenir ou diminuir a redução de 20 massa de célula  $\beta$  associada com diabetes autoimune. Em algumas modalidades, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de massa de célula  $\beta$  do paciente diminui em menos de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, menos de 50%, menos de 60%, ou menos de 25 70% dos níveis de pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula  $\beta$  do paciente é mantido em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50%, pelo menos 40%, ou pelo menos

30% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula β do paciente é mantido em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento e a contagem de linfócito média do paciente não é menos que 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou menos de 200 células/mL no mesmo período de tempo. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o nível de função de célula β do paciente mantém-se em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento e a contagem de plaquetas média do paciente não é menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou menos de 100.000 plaquetas/mL.

Nos métodos da invenção, a terapia de anti-CD3 humano é administrada em pacientes que não requerem insulina diária, ou que têm requerimentos de insulina média de menos de 0,05 U/kg/dia, menos de 0,1 U/kg/dia, menos de 0,2 U/kg/dia, menos de 0,4 U/kg/dia, menos de 0,6 U/kg/dia, menos de 0,8 U/kg/dia, menos de 1 U/kg/dia, menos de 2 U/kg/dia, menos de 5 U/kg/dia, menos de 10 U/kg/dia, ou menos de 50 U/kg/dia. Em outra modalidade, um paciente com um distúrbio de diabetes autoimune é administrado um regime de doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano para evitar ou retardar a necessidade de administrar insulina, ou aumentar a dose de insulina administrada por mais de 6 meses, 1 ano, 18 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses, 5 anos, 7 anos ou 10. Em outras modalidades, em pacientes que requerem insulina exógena, métodos da invenção atingem uma redução no requerimento de insulina diária de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou pelo menos 90% de níveis pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção em pacientes que requerem insulina exógena, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, a redução de requerimentos de insulina diária do paciente de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou pelo menos 90% de níveis pré-tratamento é mantida por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, a redução de requerimentos de insulina diária do

paciente de pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% de níveis pré-tratamento é  
5 mantida por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o curso de tratamento e a contagem de linfócito média do paciente não é menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL,  
10 menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou menos de 200 células/mL no mesmo período.

Em outras modalidades, em paciente que requerem insulina exógena, métodos da invenção resultam em um aumento no requerimento de  
15 insulina diária por não mais que 1%, não mais que 5%, não mais que 10%, não mais que 15%, não mais que 20%, não mais que 25%, não mais que 30%, não mais que 40%, não mais que 45%, não mais que 50%, não mais que 55%, não mais que 60%, não mais que 65%, não mais que 70%, ou não mais que 75% quando comparados a níveis pré-tratamento. Ainda em outra modalidade  
20 da invenção em pacientes que requerem insulina exógena, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o aumento em requerimentos de insulina diária do paciente em não mais que 1%, não mais que 5%, não mais que 10%, não mais que 15%, não mais que 20%, não mais que 25%, não mais que 30%, não mais que 40%, não mais que 45%, não mais que 50%, não mais que 55%, não mais que 60%, não mais que 65%, não mais que 70%, ou não mais que 75% de níveis pré-tratamento é  
25 mantido por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o curso de tratamento. Ainda em outra modalidade da

invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, o aumento em requerimentos de insulina diária do paciente em não mais que 1%, não mais que 5%, não mais que 10%, não mais que 15%, não mais que 20%, não mais que 25%, não mais que 30%, não mais que 5 40%, não mais que 45%, não mais que 50%, não mais que 55%, não mais que 60%, não mais que 65%, não mais que 70%, ou não mais que 75% de níveis pré-tratamento é mantido por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 10 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o curso de tratamento e a contagem de linfócito média do paciente não é menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou menos de 200 células/mL no mesmo período.

15                  Ainda em outra modalidade, a um indivíduo humano que tem diabetes tipo 1, ou um humano identificado como tendo uma predisposição a desenvolver diabetes tipo 1 é administrado um curso de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano para preservar a resposta de peptídeo C ou FPIR do paciente a 20 MMTT, OGTT, IGTT, ou procedimento grampo de glicose de duas fases por cerca de 2 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 4 meses, cerca de 5 meses, cerca de 6 meses, cerca de 7 meses, cerca de 8 meses, cerca de 9 meses, cerca de 10 meses, cerca de 11 meses, cerca de 12 meses, cerca de 15 meses, cerca de 18 meses, cerca de 21 meses, ou cerca de 24 meses após 25 tratamento. Em modalidades preferidas, os pacientes têm inicialmente uma resposta de peptídeo C a MMTT, OGTT, IGTT, ou procedimento grampo de glicose de duas fases (de preferência MMTT) que resulta em uma área sob curva (AUC) de pelo menos 80 pmol/mL/240min, de preferência, pelo menos 90 pmol/mL/240min, de maior preferência pelo menos 100 pmol/mL/240min,

ou mesmo pelo menos 110 pmol/mL/240min. Em modalidades preferidas, os pacientes antes do tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção têm um FPIR de pelo menos 300 pmol/L, pelo menos 350 pmol/L, pelo menos 400 pmol/L, pelo menos 450 pmol/L, pelo menos 500 pmol/L, de preferência, pelo menos 550 pmol/L, de maior preferência pelo menos 600 pmol/L, ou mesmo pelo menos 700 pmol/L. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, a resposta de peptídeo C ou FPIR do paciente a MMTT, OGTT, IGTT, ou procedimento grampo de glicose de duas fases diminui em menos de 1%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 20%, menos de 30%, menos de 40%, menos de 50% dos níveis de pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, a resposta de peptídeo C ou FPIR do paciente a MMTT, OGTT, IGTT, ou procedimento grampo de glicose de duas fases é mantida em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento. Em outra modalidade da invenção, após um curso de tratamento com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção, a resposta de peptídeo C ou FPIR do paciente a MMTT, OGTT, IGTT, ou procedimento grampo de glicose de duas fases é mantida em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% de níveis de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, ou pelo menos 30 meses após o fim do tratamento e a contagem de linfócito média do paciente não é menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de

650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou menos de 200 células/mL no mesmo período.

Em modalidades particulares, a invenção fornece métodos de tratamento tal que uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), resulta em um nível de HA1 ou HA1c que é de 7% ou menos, 6,5% ou menos, 6% ou menos, 5,5% ou menos, ou 5% ou menos 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento da primeira rodada de tratamento. Em modalidades específicas, após uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), os pacientes têm uma resposta de peptídeo C para MMTT, OGTT, IGTT ou procedimento de grampo de glicose em duas fases (de preferência MMTT) que resulta em uma área sob curva (AUC) de pelo menos 40 pmol/mL/240min, 50 pmol/mL/240min, 60 pmol/mL/240min, 70 pmol/mL/240min, 80 pmol/mL/240min, de preferência, pelo menos 90 pmol/mL/240min, de maior preferência pelo menos 100 pmol/mL/240min, ou mesmo pelo menos 110 pmol/mL/240min, a citada resposta determinada 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento ou após a rodada prévia de tratamento. Em modalidades específicas, após uma única rodada de tratamento ou rodada de tratamento a cada 6 meses, a cada 9 meses, a cada 12 meses, a cada 15 meses, a cada 18 meses, ou a cada 24 meses com um anticorpo anti-CD3 humano (de preferência, sem qualquer tratamento interveniente com anticorpos anti-CD3 humano), os pacientes têm um FPIR

de pelo menos 300 pmol/L, pelo menos 400 pmol/L, de preferência, pelo menos 500 pmol/L, de maior preferência pelo menos 600 pmol/L, ou mesmo pelo menos 700 pmol/L, o citado FPIR determinado em 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses após a rodada prévia de tratamento 5 ou rodada inicial de tratamento.

Em outra modalidade, com respeito ao tratamento de MS, composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3) são administradas uma ou mais vezes para prevenir ou reduzir um aumento, ou diminuir ou 10 reduzir um aumento em pontuação EDSS associada com MS em um indivíduo. Ainda em outra modalidade, uma ou mais composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3) são administradas uma ou mais vezes para prevenir um aumento na frequência, gravidade e/ou duração de ataques 15 associados com MS em um indivíduo. Ainda em outras modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3) são administradas uma ou mais vezes para prevenir um aumento em número e/ou volume total de lesões, como detectado por, p. ex., MRI, associadas com MS em um 20 indivíduo. De acordo com essas modalidades, a pontuação EDSS do indivíduo e/ou uma determinação da frequência, duração e/ou gravidade de ataques podem ser avaliados por um praticante médico qualificado de acordo com métodos comumente aceitos e bem conhecidos na técnica. Em certas modalidades, o indivíduo tem MS benigna. Em outras modalidades, o 25 indivíduo tem RRMS, SPMS, PRMS ou PPMS. Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais moléculas de ligação a CD3 (p. ex., um ou mais anticorpos anti-CD3) são administradas uma ou mais vezes para reduzir a incidência, gravidade e/ou duração de um sintoma associado com MS em um indivíduo, em que os citados sintomas são

descritos aqui ou são conhecidos na técnica. Em certas modalidades, sintomas associados com MS incluem, mas não estão limitados a fadiga, perturbações da visão, perturbações de força, perturbações de coordenação, perturbações de equilíbrio, perturbações da bexiga/ função dos intestinos, fraqueza ou paralisia em uma ou mais extremidades, tremor em uma ou mais extremidades, espasticidade muscular, atrofia muscular, movimento disfuncional, dormência ou sensação anormal em qualquer área, formigamento, dor facial, dor em extremidade, perda de visão em um ou ambos os olhos, dupla visão, incômodo ocular, movimentos oculares rápidos incontroláveis, coordenação diminuída, perda de equilíbrio, habilidade diminuída em controlar movimentos pequenos ou complexos, anormalidades na caminhada ou marcha, espasmos musculares, tonteira, vertigem, hesitação urinária, urgência urinária, frequência urinária aumentada, incontinência, memória diminuída, espontaneidade diminuída, julgamento diminuído, perda de habilidade para pensar abstratamente, perda de habilidade para generalizar, depressão, tempo de atenção diminuído, fala ininteligível, dificuldade em discurso ou fala compreensiva, fadiga, constipação, perda de audição e/ou reflexo de Babinski positivo.

Em uma modalidade específica terapia anti-CD3 é usada para o tratamento de MS em pacientes que têm uma pontuação de desabilidade de acordo com a Escala de Desabilidade Expandida de Kurtzke (EDSS) de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 ou 9,5 como determinado por métodos descritos aqui ou conhecidos por alguém de conhecimento ordinário da técnica. Em outra modalidade, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação EDSS do paciente aumenta por não mais que meia etapa, não mais que uma etapa, não mais que uma etapa e meia, não mais que duas etapas, não mais que duas etapas e meia, não mais que três etapas, não mais que três etapas e meia, não mais que quatro etapas, não mais que quatro etapas e meia,

não mais que cinco etapas, não mais que cinco etapas e meia, não mais que seis etapas, não mais que seis etapas e meia, não mais que sete etapas, não mais que sete etapas e meia, não mais que oito etapas, não mais que oito etapas e meia em relação à pontuação de pré-tratamento.

5                   Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação EDSS do paciente é mantida ou aumenta por não mais que meia etapa, não mais que uma etapa, não mais que uma etapa e meia, não mais que duas etapas, não mais que duas etapas e meia, não mais que três etapas, não  
10                  mais que três etapas e meia, não mais que quatro etapas, não mais que quatro etapas e meia, não mais que cinco etapas, não mais que cinco etapas e meia, não mais que seis etapas, não mais que seis etapas e meia, não mais que sete etapas, não mais que sete etapas e meia, não mais que oito etapas, não mais que oito etapas e meia em relação à pontuação de pré-tratamento por pelo  
15                  menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação EDSS do paciente é mantida ou aumenta por não mais que meia etapa, não mais que uma etapa, não mais que uma etapa e meia, não mais que duas etapas, não mais que duas etapas e meia, não mais que três etapas, não  
20                  mais que três etapas e meia, não mais que quatro etapas, não mais que quatro etapas e meia, não mais que cinco etapas, não mais que cinco etapas e meia, não mais que seis etapas, não mais que seis etapas e meia, não mais que sete etapas, não mais que sete etapas e meia, não mais que oito etapas, não mais que oito etapas e meia em relação à pontuação de pré-tratamento por pelo  
25                  menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou

pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 200 células/mL ou menos.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação EDSS do paciente é mantida ou aumenta por não mais que meia etapa, não mais que uma etapa, não mais que uma etapa e meia, não mais que duas etapas, não mais que duas etapas e meia, não mais que três etapas, não mais que três etapas e meia, não mais que quatro etapas, não mais que quatro etapas e meia, não mais que cinco etapas, não mais que cinco etapas e meia, não mais que seis etapas, não mais que seis etapas e meia, não mais que sete etapas, não mais que sete etapas e meia, não mais que oito etapas, não mais que oito etapas e meia em relação à pontuação de pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

Em outras modalidades, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a média de incidência, frequência, gravidade ou duração de sintomas e/ou ataques associados com MS em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% em relação

à condição pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a média de incidência, frequência, gravidade ou duração de sintomas e/ou ataques associados com MS em um paciente aumenta por não mais que 5 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% em relação à condição pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.

10 Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a média de incidência, frequência, gravidade ou duração de sintomas e/ou ataques associados com MS em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% 15 em relação à condição pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, 20 menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 200 células/mL ou menos.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a média de 25 incidência, frequência, gravidade ou duração de sintomas e/ou ataques associados com MS em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% em relação à condição pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo

menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL,  
5 menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

Em outra modalidade específica, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número e/ou volume total de lesões associadas com MS como determinado por MRI em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% da condição pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número e/ou volume total de lesões associadas com MS como determinado por MRI em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% em relação à condição pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo  
10 menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.  
15

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número e/ou volume total de lesões associadas com MS como determinado por MRI em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% em relação à  
20 condição pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e

não reduz a contagem de linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 5 200 células/mL ou menos.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número e/ou volume total de lesões associadas com MS como determinado por MRI em um paciente aumenta por não mais que 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 10 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% em relação à condição pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 15 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

20 Em outra modalidade específica, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação de Índice de Gravidade e Área de Psoríase (PASI) de um paciente que tem psoríase diminui em pelo menos 20%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, 25 pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, em relação a condições pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação de Índice de Gravidade e Área de Psoríase (PASI) de um paciente

que tem psoríase diminui em pelo menos 20%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, em relação a condições pré-tratamento por 5 pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a 10 pontuação de Índice de Gravidade e Área de Psoríase (PASI) de um paciente que diagnosticado com psoríase diminui em pelo menos 20%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, em relação a condições 15 pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 200 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 20 200 células/mL ou menos.

Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a 25 pontuação de Índice de Gravidade e Área de Psoríase (PASI) de um paciente que diagnosticado com psoríase diminui em pelo menos 20%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, ou pelo menos 85%, em relação a condições

pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

Em outra modalidade específica, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação de avaliação global de um paciente diagnosticado com psoriase melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% em relação a condições pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação de avaliação global de um paciente diagnosticado com psoriase melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% em relação a condições pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação de avaliação global de um paciente diagnosticado com psoriase

melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% em relação a condições pré-  
5 tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 10 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 200 células/mL ou menos.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a pontuação de avaliação global de um paciente diagnosticado com psoríase melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% em relação a condições pré-  
15 tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 100.000.000 20 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 25 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

Em outra modalidade específica, após um ou mais cursos de

tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a condição do indivíduo como avaliada por qualquer escala de gravidade de artrite conhecida na técnica (p. ex., RASS) melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 5 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a condição 10 do indivíduo como avaliada por qualquer escala de gravidade de artrite conhecida na técnica (p. ex., RASS) melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo 15 menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de 20 tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a condição do indivíduo como avaliada por qualquer escala de gravidade de artrite conhecida na técnica (p. ex., RASS) melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, 25 pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de

linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 200 células/mL ou menos.

5 Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção a condição do indivíduo como avaliada por qualquer escala de gravidade de artrite conhecida na técnica (p. ex., RASS) melhora em pelo menos 25%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 10 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos 15 ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 20 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

Em outra modalidade específica, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número absoluto ou proporção, dos CTLs autorreativos do indivíduo como determinado por ensaio de imunoponto (p. ex., ELISPOT) diminui em pelo 25 menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos

95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento. Ainda em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número absoluto ou proporção, dos CTLs autorreativos do indivíduo como determinado por ensaio de imunoponto (p. ex., ELISPOT) diminui em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número absoluto ou proporção, dos CTLs autorreativos do indivíduo como determinado por ensaio de imunoponto (p. ex., ELISPOT) diminui em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento por pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de linfócito média do paciente para menos de 800 células/mL, menos de 750 células/mL, menos de 700 células/mL, menos de 650 células/mL, menos de 600 células/mL, menos de 550 células/mL, menos de 500 células/mL, menos de 400 células/mL, menos de 300 células/mL ou 200 células/mL ou menos.

Em outra modalidade da invenção, após um ou mais cursos de tratamento com um anticorpo anti-CD3 de acordo com a invenção o número absoluto ou proporção, dos CTLs autorreativos do indivíduo como determinado por ensaio de imunoponto (p. ex., ELISPOT) diminui em pelo 5 menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 100% em relação a condições pré-tratamento por pelo 10 menos 4 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 2,5 anos ou pelo menos 3 anos após o fim do tratamento e não reduz a contagem de plaquetas média do paciente para menos de 100.000.000 plaquetas/mL, menos de 15 75.000.000 plaquetas/mL, menos de 50.000.000 plaquetas/mL, menos de 25.000.000 plaquetas/mL, menos de 1.000.000 plaquetas/mL, menos de 750.000 plaquetas/mL, menos de 500.000 plaquetas/mL, menos de 250.000 plaquetas/mL, menos de 150.000 plaquetas/mL ou 100.000 plaquetas/mL ou menos.

Em modalidades preferidas, os anticorpos anti-CD3 humano 20 são administrados parenteralmente, por exemplo, intramuscularmente ou subcutaneamente, ou senão, são administrados oralmente. Os anticorpos anti-CD3 humano também podem ser administrados como uma formulação de liberação controlada.

Em uma modalidade específica, a contagem de linfócito 25 absoluta média em um indivíduo com um distúrbio autoimune é avaliada antes e/ou após a administração de uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano para determinar se uma ou mais doses subsequentes de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais

anticorpos anti-CD3 humano deve ser administrada ao citado indivíduo. Em outra modalidade, a contagem de linfócito absoluta média em um indivíduo com um distúrbio autoimune é avaliada antes e/ou após a administração de uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano para determinar se uma ou mais doses subsequentes de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano deve ser administrada ao citado indivíduo. De preferência, uma dose subsequente de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano não é administrada ao citado indivíduo se a contagem de linfócito for de menos de 800 células/mm<sup>3</sup>, menos de 750 células/mm<sup>3</sup>, menos de 700 células/mm<sup>3</sup>, menos de 650 células/mm<sup>3</sup>, menos de 600 células/mm<sup>3</sup>, menos de 550 células/mm<sup>3</sup>, menos de 500 células/mm<sup>3</sup>, menos de 400 células/mm<sup>3</sup> ou menos de 300 células/mm<sup>3</sup>.

Em outra modalidade, a contagem de linfócito absoluta média em um indivíduo com um distúrbio autoimune é determinada antes da administração de uma primeira dose de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e a contagem de linfócito absoluta média é monitorada antes da administração de uma ou mais doses subsequentes de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano. De preferência, a contagem de linfócito absoluta média no indivíduo é de pelo menos 900 células/mm<sup>3</sup>, de preferência pelo menos 950 células/mm<sup>3</sup>, pelo menos 1000 células/mm<sup>3</sup>, pelo menos 1050 células/mm<sup>3</sup>, pelo menos 1100 células/mm<sup>3</sup>, pelo menos 1200 células/mm<sup>3</sup>, ou pelo menos 1250 células/mm<sup>3</sup> antes da administração de uma primeira dose de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano.

Em outra modalidade, a contagem de linfócito absoluta média de aproximadamente 700 células/mL até aproximadamente 1200 células/mL,

aproximadamente 700 células/mL até aproximadamente 1100 células/mL, aproximadamente 700 células/mL até aproximadamente 1000 células/mL, aproximadamente 700 células/mL até aproximadamente 900 células/mL, aproximadamente 750 células/mL até aproximadamente 1200 células/mL,  
5       aproximadamente 750 células/mL até aproximadamente 1100 células/mL, aproximadamente 750 células/mL até aproximadamente 1000 células/mL, aproximadamente 750 células/mL até aproximadamente 900 células/mL, aproximadamente 800 células/mL até aproximadamente 1200 células/mL, aproximadamente 800 células/mL até aproximadamente 1100 células/mL,  
10      aproximadamente 800 células/mL até aproximadamente 1000 células/mL, aproximadamente 900 células/mL até aproximadamente 1200 células/mL, aproximadamente 900 células/mL até aproximadamente 1100 células/mL, aproximadamente 900 células/mL até aproximadamente 1000 células/mL, ou  
aproximadamente 1000 células/mL até aproximadamente 1200 células/mL é  
15      mantida em um indivíduo que tem distúrbio de diabetes tipo 1 pela administração de uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano. Em outra modalidade, a contagem de linfócito absoluta média de aproximadamente 700 células/mL até aproximadamente 1000 células/mL é  
20      mantida em um indivíduo que tem um distúrbio autoimune pela administração de uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano.

Em uma modalidade específica, a administração de uma ou mais doses ou de um regime de dosagem de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano não induz ou reduz em relação a outros agentes imunossupressores um ou mais dos seguintes efeitos indesejados ou adversos: anormalidades de sinal vital (febre, taquicardia, bardicardia, hipertensão, hipotensão), eventos hematológicos (anemia, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia), cefaléia,

calafrios, tonteira, náusea, astenia, dor nas costas, dor no peito (pressão no peito), diarréia, mialgia, dor, pturite, psoríase, rinite, encharque de suor, reação em sítio de injeção, vasodilatação e risco aumentado de infecção oportunista, ativação de vírus Epstein Barr, apoptose de células T e um risco aumentado de desenvolver certos tipos de câncer. Em outra modalidade específica, a administração de uma ou mais doses de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano não induz ou reduz em relação a outros agentes imunossupressores um ou mais dos seguintes efeitos indesejados ou adversos:

5 anormalidades de sinal vital (febre, taquicardia, bardicardia, hipertensão, hipotensão), eventos hematológicos (anemia, linfopenia, leucopenia, trombocitopenia), cefaléia, calafrios, tonteira, náusea, astenia, dor nas costas, dor no peito (pressão no peito), diarréia, mialgia, dor, pturite, psoríase, rinite, encharque de suor, reação em sítio de injeção, vasodilatação, um risco

10 aumentado de infecção oportunista, ativação de vírus Epstein Barr, apoptose de células T e um risco aumentado de desenvolver certos tipos de câncer.

15

De acordo com a invenção, a dose ou regime de dosagem compreendendo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano para o tratamento de um distúrbio autoimune pode ser repetida em 1 mês, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses ou mais longo após a dose ou regime de dosagem prévio ou inicial compreendendo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano. A dose ou regime de dosagem repetido podem ser administrado como uma questão de curso, quando sintomas associados com o citado distúrbio autoimune recorrem após uma melhora seguindo a dose ou regime de dosagem prévio ou inicial, ou quando sintomas associados com o citado distúrbio autoimune não melhoram após a dose ou regime de dosagem inicial de anticorpos anti-CD3 de acordo com métodos da invenção. Com respeito a

20

25

diabetes, uma dose ou regime de dosagem repetido compreendendo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano pode ser administrada a um indivíduo quando, por exemplo, o uso de insulina diária média do indivíduo em 1 mês, 2 meses,

5 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses ou mais longo após tratamento prévio ou inicial com anticorpos anti-CD3 humano não diminui em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% comparados a níveis pré-tratamento. Senão, com respeito a diabetes, a dose ou regime de dosagem repetido compreendendo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano pode ser administrado a um indivíduo quando, por exemplo, os níveis de HA 1 ou HA 1 C do indivíduo em 1 mês, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses ou mais longo após tratamento prévio ou inicial com anticorpos anti-CD3 não diminui em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% comparados a níveis pré-tratamento. Em outra modalidade, com respeito a

10 diabetes, a dose ou regime de dosagem repetido compreendendo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano pode ser administrado a um indivíduo quando, por exemplo, a resposta de peptídeo C do indivíduo em 1 mês, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses ou 24 meses ou mais

15 longo após tratamento prévio ou inicial com anticorpos anti-CD3 diminui em mais de 5%, mais de 10%, mais de 20%, mais de 30%, mais de 40%, mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80%, ou mais de 90% comparados a níveis pré-tratamento.

20

25

### **5.2.8 Terapia combinatória**

A presente invenção fornece composições compreendendo um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos fora anticorpos anti-CD3 humano e métodos para prevenir, tratar, retardar o início de, diminuir a progressão de ou melhorar um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune, p. ex., um distúrbio autoimune inflamatório, em um indivíduo em necessidade deste compreendendo administrar ao citado indivíduo uma ou mais das citadas composições. Agentes terapêuticos ou profiláticos incluem, mas não estão limitado a, peptídeos, polipeptídeos, proteínas de fusão, moléculas de ácido nucleico, pequenas moléculas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgânicas e moléculas orgânicas. Qualquer agente que é conhecido como sendo útil, ou que foi usado ou está atualmente sendo usado para a prevenção, tratamento ou melhora de um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune, particularmente diabetes tipo 1, pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-CD3 humano de acordo com a invenção descrita aqui. Exemplos de tais agentes incluem, mas não estão limitados a fragmentos de anticorpo, análogos ou derivados de GLP-1, agonistas de GLP-1 (p. ex., exendina-4; exantatídeo), análogos ou derivados de amilina, insulina, agentes dermatológicos para erupções e inchaços (p. ex., fototerapia (isto é, radiação ultravioleta B), fotoquimioterapia (p. ex., PUVA) e agentes tópicos tal como emolientes, ácido salicílico, alcatrão de carvão, esteróides tópicos, corticosteróides tópicos, análogos de vitamina D3 (p. ex., calcipotrieno), tazarateno e retinóides tópicos), agentes anti-inflamatórios (p. ex., corticosteróides (p. ex., prednisona e hidrocortisona), glicocorticóides, esteróides, fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (p. ex., aspirina, ibuprofeno, diclofenac e inibidores de COX-2), beta-agonistas, agentes anticolinérgicos e metil xantinas), agentes imunomodulatórios (p. ex., moléculas orgânicas pequenas, moduladores de receptor de célula T, moduladores de receptor de citocina, agentes depletares de célula T,

antagonistas de citocina, antagonistas de monocina, inibidores de linfócito, ou agentes anticancerígenos), injeções de ouro, sulfassalazina, penicilina e agentes antiangiogênicos (p. ex., angiostatina, antagonistas de TNF-a (p. ex., anticorpos anti-TNF $\alpha$ ) e ensostatina), dapsona, psoralenos (p. ex., metoxaleno 5 e trioxsaleno), agentes antimaláricos (p. ex., hidroxicloroquina), agentes antivirais e antibióticos (p. ex., eritromicina e penicilina). Qualquer agente imunomodulatório bem conhecido por alguém versado na técnica também pode ser usado nos métodos e composições da invenção. Agentes imunomodulatórios podem afetar um ou mais ou todos os aspectos das 10 resposta imune em um indivíduo. Aspectos da resposta imune incluem, mas não estão limitados a, resposta inflamatória, a cascata do complemento, diferenciação de leucócito e linfócito, proliferação e/ou função efetora, contagens de monócito e/ou basófilo e a comunicação celular entre células do sistema imune. Em certas modalidades da invenção, um agente 15 imunomodulatório modula um aspecto da resposta imune. Em outras modalidades, um agente imunomodulatório modula mais de um aspecto da resposta imune. Em uma modalidade preferida da invenção, a administração de um agente imunomodulatório a um indivíduo inibe ou reduz um ou mais aspectos das capacidades de resposta imune do indivíduo. Em uma 20 modalidade específica da invenção, o agente imunomodulatório inibe ou suprime a resposta imune em um indivíduo. De acordo com a invenção, um agente imunomodulatório não é um anticorpo anti-CD3 humano. Em certas modalidades, um agente imunomodulatório não é um agente anti-inflamatório. Em outras modalidades, um agente imunomodulatório não é 25 uma molécula de ligação a CD3. Ainda em outras modalidades, um agente imunomodulatório não é OKT3 ou um derivado deste.

Um agente imunomodulatório pode ser selecionado para interferir com as interações entre os subgrupos de T auxiliar e célula B para inibir formação de anticorpo neutralizante. Um agente imunomodulatório

pode ser selecionado para interferir com as interações entre células TH1 e CTLs para reduzir a ocorrência de morte mediada por CTL. Um agente imunomodulatório pode ser selecionado para alterar (p. ex., inibir ou suprimir) a proliferação, diferenciação, atividade e/ou função das células CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup>. Por exemplo, anticorpos específicos para células T podem ser usados como agente imunomodulatórios para depletar, ou alterar a proliferação, diferenciação, atividade e/ou função das células CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup>.

Em modalidades específicas, a molécula de ligação a CD3 humano é co-administrada com um antagonista de citocina. Em outras modalidades, a molécula de ligação anti-CD3 humano é co-administrada com um anticorpo anti-IL-2, tal como, por exemplo, daclizumab, basiliximab ou MT204 (Micromet) ou outro inibidor de IL-2, tal como, mas não limitando a rapamicina, ciclosporina ou tacrolimus.

Em outras modalidades, a molécula de ligação a CD3 humano é administrada em conjunto com um antígeno direcionado por anticorpos anti-célula da ilhota tal como, mas não limitando a GAD (tal como GAD 65), insulina, IA-2, ICA512 ou outro antígeno contra o qual autoanticorpos são encontrados em pacientes com diabetes tipo 1. Tal co-administração pode levar à tolerância dos抗ígenos de célula da ilhota.

Em uma modalidade preferida, proteína, polipeptídeos ou peptídeos (incluindo anticorpos) que são utilizados como agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios são derivados da mesma espécie que o receptor das proteínas, polipeptídeos ou peptídeos. Em outra modalidade preferida, quando o indivíduo é um humano, as proteínas, polipeptídeos ou peptídeos que são utilizados como agentes imunomodulatórios são humanos ou humanizados.

De acordo com a invenção, um ou mais agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios são administrados a um indivíduo com

uma doença inflamatória ou autoimune antes de, subsequente a, ou concomitantemente com os agentes profiláticos e/ou terapêuticos da invenção. De preferência, um ou mais agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios são administrados a um indivíduo com uma doença 5 inflamatória ou autoimune para reduzir ou inibir um ou mais sintomas da doença ou aspectos da resposta imune como necessário. Qualquer técnica bem conhecida por alguém versado na técnica pode ser usada para medir um ou mais aspectos da resposta imune em um indivíduo particular e desse modo determinar quando é necessário administrar um agente imunomodulatório ao 10 citado indivíduo. Em uma modalidade preferida, uma contagem de linfócito absoluta de aproximadamente 500 células/mm<sup>3</sup>, de preferência 600 células/mm<sup>3</sup>, mais 700 células/mm<sup>3</sup>, e da maior preferência 800 células/mm<sup>3</sup> é mantida em um indivíduo. Em outra modalidade preferida, a um indivíduo 15 com um distúrbio autoimune ou inflamatório não é administrado um agente imunomodulatório se a contagem de linfócito dele for de 500 células/mm<sup>3</sup> ou menos, 550 células/mm<sup>3</sup> ou menos, 600 células/mm<sup>3</sup> ou menos, 650 células/mm<sup>3</sup> ou menos, 700 células/mm<sup>3</sup> ou menos, 750 células/mm<sup>3</sup> ou menos, ou 800 células/mm<sup>3</sup> ou menos.

Em uma modalidade preferida, um ou mais agentes 20 profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios são administrados a um indivíduo com uma doença inflamatória ou autoimune para que reduza ou iniba transientemente um ou mais aspectos da doença ou da resposta imune. Tal inibição ou redução transiente de um ou mais aspectos da doença ou do sistema imune pode durar horas, dias, semanas ou meses. De preferência, a 25 inibição ou redução transiente de um ou mais aspectos da doença ou do sistema imune dura poucas horas (p. ex., 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, ou 48 horas ), poucos dias (p. ex., 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 14 dias), ou poucas semanas (p. ex., 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas ou 6 semanas). A redução

ou inibição transiente de um ou mais aspectos da doença ou da resposta imune acentua as capacidades profiláticas e/ou terapêuticas de um anticorpo anti-CD3.

De acordo com a invenção, um ou mais agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios são administrados a um indivíduo com diabetes tipo 1, ou uma predisposição a esta, antes de, subsequente a, ou concomitantemente com os agentes profiláticos e/ou terapêuticos da invenção. Tais métodos podem ser empregados para tratar, prevenir, retardar o início de, diminuir a progressão de ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1.

Em modalidades específicas, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar, retardar o início de, diminuir a progressão de, ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de insulina. Em uma modalidade, a prevenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar, retardar o início de, diminuir a progressão de, ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de GLP1 ou análogo de GLP1. Em uma modalidade, a prevenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar, retardar o início de, diminuir a progressão de, ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de exendina-4 ou análogo desta. Em uma modalidade, a prevenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar, retardar o início de, diminuir a

progressão de, ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de amilina ou um análogo desta. Em outra modalidade, a prevenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar, retardar o início de, diminuir a progressão de, ou melhorar um ou mais sintomas de diabetes tipo 1, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD3 humano humanizado OKT3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de insulina.

Moléculas de ácido nucleico que codificam proteínas, polipeptídeos ou peptídeos com atividade profilática, terapêutica ou imunomodulatória ou proteínas, polipeptídeos ou peptídeos com atividade profilática, terapêutica ou imunomodulatória podem ser administrados a um indivíduo com um distúrbio autoimune de acordo com os métodos da invenção. Adicionalmente, moléculas de ácido nucleico que codificam derivados, análogos, fragmentos ou variantes de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos com atividade profilática, terapêutica ou imunomodulatória, ou derivados, análogos, fragmentos ou variantes de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos com atividade profilática, terapêutica ou imunomodulatória podem ser administrados a um indivíduo de acordo com os métodos da invenção. De preferência, tais derivados, análogos, fragmentos e variantes retêm a atividade profilática, terapêutica ou imunomodulatória da proteína, polipeptídeo ou peptídeo selvagem completo.

Proteínas, polipeptídeos ou peptídeos que podem ser usados como agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios podem ser produzidos por qualquer técnica bem conhecida na técnica ou descrita aqui. Veja, p. ex., capítulo 16 de Ausubel *et al.*, (eds.), 1999, Short Protocols in

Molecular Biology, Quarta Edição, John Wiley & Sons, NY, que descreve métodos para produzir proteínas, polipeptídeos ou peptídeos e que é incorporada aqui como referência em sua totalidade. Anticorpos que podem ser usados como agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios 5 podem ser produzidos, p. ex., por métodos descritos em Patente US No. 6.245.527 e em Harlow e Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988, que são incorporadas aqui como referência em suas totalidades. De preferência, agentes que estão comercialmente disponíveis e conhecidos por funcionar 10 como agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios nas composições e métodos da invenção. A atividade profilática, terapêutica ou imunomodulatória de um agente pode ser determinada *in vitro* e/ou *in vivo* por qualquer técnica bem conhecida por alguém versado na técnica, incluindo, p. ex., por ensaios de CTL, ensaio de proliferação e imunoensaio (p. ex., 15 ELISAs) para a expressão de proteínas particulares tal como moléculas coestimulatórias e citocinas.

A combinação de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos fora anticorpos anti-CD3 humano produz um melhor efeito profilático ou terapêutico em um indivíduo 20 que tratamento isolado. Em certas modalidades, a combinação de um anticorpo anti-CD3 humano e um agente profilático ou terapêutico fora anticorpo anti-CD3 humano atinge um efeito profilático ou terapêutico 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% melhor em um indivíduo com o distúrbio autoimune, ou 25 predisposição a este, que o tratamento isolado. Em modalidades particulares, a combinação de um ou mais anticorpos anti-CD3 e um agente profilático ou terapêutico fora anticorpo anti-CD3 atinge redução de 20%, de preferência 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% ou maior na inflamação de um órgão, tecido ou articulação

particular em um indivíduo com um distúrbio inflamatório ou um distúrbio autoimune que está associado com inflamação que o tratamento isolado. Em outras modalidades, a combinação de um ou mais anticorpos anti-CD3 e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos fora anticorpos anti-CD3 tem um 5 efeito mais que cumulativo ou sinérgico em um indivíduo com um distúrbio autoimune ou inflamatório.

As terapias de combinação da invenção permitem dosagens mais baixas de anticorpos anti-CD3 humano e/ou administração menos frequente de anticorpos anti-CD3 humano a um indivíduo com um distúrbio 10 autoimune para atingir um efeito profilático ou terapêutico. As terapias de combinação da invenção permitem dosagens mais baixas dos agentes profiláticos ou terapêuticos utilizados em conjunto com anticorpos anti-CD3 humano e/ou administração menos frequente de tais agentes profiláticos ou terapêuticos para atingir um efeito profilático ou terapêutico.

15 Os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação da presente invenção podem ser administrados concomitantemente, simultaneamente ou sequencialmente. Os agentes profiláticos ou terapêuticos das terapias de combinação da presente invenção também podem ser administrados ciclicamente. Terapia de ciclagem envolve 20 a administração de um primeiro agente profilático ou terapêutico por um período de tempo, seguido pela administração de um segundo agente profilático ou terapêutico por um período de tempo e a repetição dessa administração sequencial, isto é, do ciclo, a fim de reduzir o desenvolvimento 25 de resistência a um dos agentes, para evitar ou reduzir os efeitos colaterais de um dos agentes e/ou para melhorar a eficácia do tratamento.

#### **5.2.8.1 Métodos de uso de terapia de combinação**

Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune ou inflamatório em um indivíduo, o

citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo um ou mais anticorpos anti-CD3 e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos fora anticorpos anti-CD3. Em uma modalidade preferida, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune ou inflamatório em um indivíduo, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo um ou mais anticorpos anti-CD3 e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos fora anticorpos anti-CD3, em que pelo menos um dos anticorpos anti-CD3 é um OKT3 humanizado.

A presente invenção fornece métodos para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune ou inflamatório em um indivíduo, os citados métodos compreendendo administrar ao citado indivíduo um ou mais anticorpos anti-CD3 e um ou mais agentes profiláticos, terapêuticos ou imunomodulatórios. De preferência, os agentes imunomodulatórios não são administrados a um indivíduo com um distúrbio autoimune ou inflamatório cuja contagem de linfócito absoluta seja de menos de 500 células/mm<sup>3</sup>, menos de 550 células/mm<sup>3</sup>, menos de 600 células/mm<sup>3</sup>, menos de 650 células/mm<sup>3</sup>, menos de 700 células/mm<sup>3</sup>, menos de 750 células/mm<sup>3</sup>, menos de 800 células/mm<sup>3</sup>, menos de 850 células/mm<sup>3</sup>, ou menos de 900 células/mm<sup>3</sup>. Assim, em uma modalidade preferida, antes da ou subsequente à administração de uma ou mais dosagens de um ou mais agentes imunomodulatórios a um indivíduo com um distúrbio autoimune ou inflamatório, a contagem de linfócito absoluta do citado indivíduo é determinada por técnicas bem conhecidas por alguém versado na técnica, incluindo, p. ex., contagens de citometria de fluxo ou de azul de trypan.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com diabetes, o citado método compreendendo administrar ao citado

indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de insulina. Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com diabetes, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de GLP1 ou análogo de GLP1.

5 Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com diabetes, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de exendina-4 ou análogo desta. Em uma modalidade, a presente

10 invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com diabetes, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de amilina ou um análogo desta.

15 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com diabetes, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD3 humanizado OKT3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de insulina.

20 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com psoriase, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 e uma quantidade

25

profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de metotrexato. Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um ou mais sintomas associados com psoríase, o citado método compreendendo administrar ao citado indivíduo uma quantidade 5 profilaticamente ou terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD3 humanizado OKT3 e uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de metotrexato.

### **5.3 Composições farmacêuticas**

A presente invenção fornece composições para o tratamento, 10 profilaxia e melhora de um ou mais sintomas associados com um distúrbio autoimune. Em uma modalidade específica, uma composição compreende um ou mais anticorpos anti-CD3 humano. Em outra modalidade, uma composição compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias pesada e leve de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano.

15 Em uma modalidade específica, a composição compreende um anticorpo anti-CD3 humano, em que o citado anticorpo anti-CD3 humano é um anticorpo monoclonal humano ou humanizado, de preferência modificado para reduzir a ligação do domínio Fc a receptores de Fc e, desse modo, reduzir toxicidade do anticorpo. Ainda em outra modalidade preferida, uma 20 composição compreende OKT3 humanizado, um análogo, derivado, fragmento deste que se liga imunoespecificamente a polipeptídeos CD3, de preferência OKT3 $\gamma$ 1(ala-ala), mas também pode incluir CHAGlyCD3 (TRX4<sup>TM</sup>), ou HUM291 (visilizumab; NUVION<sup>TM</sup>).

25 Em uma modalidade preferida, uma composição da invenção é uma composição farmacêutica. Tais composições compreendem uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade específica, o termo “farmaceuticamente aceitável” significa aprovado por uma agência regulatória do governo federal ou de um estado ou

listado na Farmacopéia dos E. U. ou outra farmacopéia geralmente reconhecida para uso em animais e mais particularmente em humanos. O termo “veículo” se refere a um diluente, adjuvante (p. ex., adjuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente, ou veículo com o qual a substância terapêutica é administrada. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e semelhantes. Água é um veículo preferido quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. Soluções de salina e soluções de dextrose e glicerol aquosas também podem ser empregadas como veículos líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, calcário, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e semelhantes (Veja, por exemplo, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Arthur H. Kibbe (ed., 2000, que é incorporada como referência aqui em sua totalidade), Am Pharmaceutical Association, Washington, DC. A composição, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umidificadores ou emulsificantes ou agentes tamponantes de pH. Essas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pó, formulações de liberação controlada e semelhantes. Formulação oral pode incluir veículos padrões como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc.

Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são descritos em “Remington's Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin. Tais composições conterão uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um agente profilático ou terapêutico de preferência na forma purificada, junto com uma quantidade adequada de veículo para que forneça a forma para

administração apropriada ao paciente. A formulação deve ajustar-se ao modo de administração. Em uma modalidade preferida, as composições farmacêuticas são estéreis e estão em forma adequada para administração a um indivíduo, de preferência um indivíduo animal, de maior preferência um indivíduo mamífero e da maior preferência um indivíduo humano.

Em uma modalidade específica, pode ser desejável administrar as composições farmacêuticas da invenção localmente na área em necessidade de tratamento; isto pode ser obtido por, por exemplo, e não por meio de limitação, infusão local, por injeção, ou por meio de um implante, o citado implante sendo um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, tal como membranas sialásticas, ou fibras. De preferência, quando se administra um anticorpo anti-CD3 humano, deve-se tomar cuidado para usar materiais que o anticorpo anti-CD3 humano não absorva.

Em outra modalidade, a composição pode ser distribuída em uma vesícula, em particular um lipossomo (veja Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat *et al.*, em *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss, Nova Iorque, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid*, pp. 3 17-327; veja geralmente *ibid*.).

Ainda em outra modalidade, a composição pode ser distribuída em um sistema de liberação controlada ou liberação sustentada. Em um modalidade, uma bomba pode ser usada para atingir liberação controlada ou sustentada (veja Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit Ref Biomed Eng 14: 20; Buchwald *et al.*, 1980. *Surgery* 88: 507; Saudek *et al.*, 1989, N Engl J Med 321: 574). Em outra modalidade, materiais poliméricos pode ser usados para atingir liberação controlada ou sustentada dos anticorpos da invenção ou fragmentos destes (veja, p. ex., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Flórida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nova Iorque (1984); Ranger and Peppas, 1983, J

Macromol Sci Rev Macromol Chem 23: 61; veja também Levy *et al.*, 1985, Science 228: 190; During *et al.*, 1989, Ann Neurol 25: 351; Howard *et al.*, 1989, J Neurosurg. 71: 105); Patente US No. 5.679.377; Patente US No. 5.916.597; Patente US No. 5.912.015; Patente US No. 5.989.463; Patente US  
5 No. 5.128.326; Publicação PCT No. WO 99/15154 e Publicação PCT No. WO 99/20253. Exemplos de polímeros usados em formulações de liberação prolongada incluem, mas não estão limitadas a, metacrilato de poli(2-hidróxi etil), metacrilato de poli(metil), ácido poli(acrílico), acetato de poli(etileno-co-vinil), ácido poli(metacrílico), poliglicolídeos (PLG), polianidridos,  
10 pirrolidona poli(N-vinil), álcool poli(vinílico), poliacrilamida, poli(etileno glicol), polilactídeos (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeos) (PLGA) e poliortoesteres. Em uma modalidade preferida, o polímero usado em uma formulação de liberação controlada é inerte, livre de impurezas lixiviáveis, estável em estocagem, estéril e biodegradável. Ainda em outra modalidade,  
15 um sistema de liberação controlada ou sustentada pode ser colocado em proximidade ao alvo terapêutico, isto é, os pulmões, assim, requerendo apenas uma fração da dose sistêmica (veja, p. ex., Goodson, em Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Qualquer técnica conhecida por alguém versado na técnica pode ser usada para produzir formulações de liberação controlada compreendendo um ou mais anticorpos da invenção ou fragmentos destes. Veja, p. ex., Patente US No. 4.526.938; Publicação PCT WO 91/05548; Publicação PCT WO 96/20698; Ning *et al.*, 1996, Radiotherapy & Oncology 39: 179-189; Song *et al.*, 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397; Cleek *et al.*, 1997, Pro Int'l Symp Control Rel Bioact Mater 24: 759-760, cada uma das quais é incorporada como referência em sua totalidade.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para

ser compatível com sua rota de destino de administração. Exemplos de rotas de administração incluem, mas não estão limitadas a, administração parenteral, p. ex., intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (p. ex., inalação), intranasal, transdérmica (tópica), transmucosal e retal. Em uma modalidade específica, a composição é formulada de acordo com procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, oral, intranasal ou tópica a seres humanos. Em uma modalidade preferida, uma composição farmacêutica é formulada de acordo com procedimentos de rotina para administração subcutânea a seres humanos. Tipicamente, composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotônico estéril. Quando necessário, a composição também pode incluir um agente de solubilização e um anestésico local tal como lignocáne para aliviar dor no sítio da injeção.

Se as composições da invenção são para serem administradas topicalmente, as composições podem ser formuladas no forma de, p. ex., uma pomada, creme, emplastro transdérmico, loção, gel, xampu, borrifo, aerossol, solução, emulsão ou outra forma bem conhecida para alguém versado na técnica. Veja, p. ex., Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4<sup>a</sup> ed., Lea & Febiger, Filadélfia, PA (1985). Para formas de dosagem não borrifáveis tópicas, formas viscosas a semi-sólidas ou sólidas compreendendo um veículo ou um ou mais excipientes compatíveis com aplicação tópica e que têm uma viscosidade dinâmica de preferência maior que água são tipicamente empregadas. Formulações adequadas incluem, sem limitação, soluções, suspensões, emulsões, cremes, pomadas, pós, linimentos, ungüento e semelhantes, que são, se desejado, esterilizadas ou misturadas com agentes auxiliares (p. ex., conservantes, estabilizantes, agentes umidificadores, tampões ou sais) para influenciar várias propriedades, tais como, por exemplo, pressão osmótica.

Outras formas de dosagem tópica adequadas incluem preparações de aerossol borrifável em que o ingrediente ativo, de preferência em combinação com um veículo inerte sólido ou líquido, é embalado em uma mistura com um volátil pressurizado (p. ex., um propulsor gasoso, tal como freon), ou em uma garrafa de apertar. Umidificadores ou umectantes também podem ser adicionados a composições farmacêuticas e formas de dosagem se desejado. Exemplos de tais ingredientes são bem conhecidos na técnica.

Se as composições da invenção são para serem administradas intranasalmente, as composições podem ser formuladas em uma forma de aerossol, borrifo, névoa ou na forma de gotas. Em particular, agentes profiláticos ou terapêuticos para uso de acordo com a presente invenção podem ser convenientemente distribuídos na forma de uma apresentação de borrifo de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou de um nebulizador, com o uso de um propulsor adequado, p. ex., diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada por prover uma válvula para distribuir uma quantidade medida. Cápsulas e cartuchos de, p. ex., gelatina para uso em um inalador ou insuflador pode ser formulada contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

Se as composições da invenção são para serem administradas oralmente, as composições podem ser formuladas oralmente na forma de, p. ex., comprimidos, cápsulas, selos, cápsulas de gel, soluções, suspensões e semelhantes. Comprimidos ou cápsulas podem ser preparadas por meios convencionais com excipientes aceitáveis farmaceuticamente tal como agentes de ligação (p. ex., amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose); enchimentos (p. ex., lactose, celulose microcristalina ou fosfato de cálcio e hidrogênio);

lubrificantes (p. ex., estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (p. ex., amido de batata ou glicolato de amido sódico); ou agente umidificadores (p. ex., lauril sulfato de sódio). Os comprimidos podem ser revestidos por métodos bem conhecidos na técnica. Preparações líquidas para administração 5 oral podem tomar a forma de, por exemplo, soluções, xaropes, ou suspensões, ou elas podem ser apresentadas como um produto seco para constituição com água ou outro veículo adequado antes do uso. Tais preparações líquidas pode ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmaceuticamente aceitáveis tais como agentes de suspensão (p. ex., xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras comestíveis hidrogenadas); agentes 10 emulsificantes (p. ex., lecitina ou acácia); veículos não aquosos (p. ex., óleo de amêndoas, ésteres oleosos, álcool etílico ou óleos vegetais fracionados); e conservantes (p. ex., metil ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). As preparações também podem conter sais de tampão, aromatizantes, corantes e 15 agentes edulcorantes conforme apropriado. Preparações para administração oral pode ser adequadamente formuladas para liberação lenta, liberação controlada ou liberação sustentada de agente(s) profilático(s) ou terapêutico(s).

As composições da invenção podem ser formuladas para 20 administração parenteral por injeção, p. ex., injeção bolus ou infusão contínua. Formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, p. ex., em ampolas ou em recipientes multidose, com um conservante adicionado. As formulações podem tomar tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem 25 conter agentes formulatórios tal como agentes de suspensão, estabilizadores e/ou de dispersão. Senão, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, p. ex., água livre de pirógeno, antes do uso.

Em modalidades específicas, a invenção fornece formas de

dosagem que permitem administração de anticorpos anti-CD3 humano continuamente por um período de horas ou dias (p. ex., associadas com uma bomba ou outro dispositivo para tal distribuição), por exemplo, por um período de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 5 horas, 16 horas, 20 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 4 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias ou 14 dias.

As composições da invenção também podem ser formuladas em composições retais tal como supositórios ou enemas de retenção, p. ex., contendo bases de supositório convencionais tal como manteiga de cacau ou 10 outros glicerídeos.

Além das formulações descritas previamente, as composições da invenção também podem ser formuladas como uma preparação de depósito. Tais formulações de ação prolongada podem ser administradas por implante (por exemplo, subcutâneo ou intramuscular) ou por injeção 15 intramuscular. Assim, por exemplo, as composições podem ser formuladas com materiais hidrofóbicos ou poliméricos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de troca de íons, ou como derivados solúveis frugalmente, por exemplo, como um sal solúvel frugalmente.

As composições da invenção podem ser formuladas como 20 formas neutrais ou sais. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles formados com ânions tal como aqueles derivados de ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. e aqueles formados com cátions tal como aqueles derivados de hidróxidos de sódio, potássio, amônio, cálcio, 25 férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Geralmente, os ingredientes de composições da invenção são fornecidos separadamente ou misturados em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado livre de água em um

recipiente hermeticamente selado tal como uma ampola ou sache indicando a quantidade do agente ativo. Quando a composição é para ser administradas por infusão, ela pode ser dispensada com uma garrafa de infusão contendo água de grau farmacêutico estéril ou salina. Quando a composição é 5 administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou salina pode ser fornecida para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

Em particular, a invenção fornece um ou mais anticorpos anti-CD3 humano ou composições farmacêuticas da invenção embaladas em um recipiente hermeticamente selado tal como um ampola ou sache indicando a quantidade do agente. Em uma modalidade, um ou mais dos anticorpos anti-CD3 humano, ou composições farmacêuticas da invenção são fornecidas como um pó liofilizado esterilizado ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente selado e podem ser reconstituídos, p. ex., com água 10 ou salina até a concentração apropriada para administração a um indivíduo. De preferência, um ou mais dos anticorpos anti-CD3 humano, ou composições farmacêuticas da invenção são fornecidas como um pó liofilizado estéril em um recipiente hermeticamente selado em uma unidade 15 de dosagem de pelo menos 5 mg, de maior preferência pelo menos 10 mg, pelo menos 15 mg, pelo menos 25 mg, pelo menos 35 mg, pelo menos 45 mg, pelo menos 50 mg, pelo menos 75 mg, ou pelo menos 100 mg. Os agentes profiláticos ou terapêuticos, ou composições farmacêuticas da invenção liofilizadas devem ser estocados entre 2 e 8°C em seu recipiente original e os agentes profiláticos ou terapêuticos, ou composições farmacêuticas da 20 invenção devem ser administrados dentro de 1 semana, de preferência dentro de 5 dias, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, ou dentro de 1 hora após ser reconstituído. Em uma modalidade alternativa, um ou mais do anticorpos anti-CD3 humano, ou composições farmacêuticas da invenção 25

são fornecidas na forma líquida em um recipiente hermeticamente selado indicando a quantidade e concentração do agente. De preferência, a forma líquida da composição administrada é fornecida em um recipiente hermeticamente selado com pelo menos 2,5 mg/mL, pelo menos 5 mg/mL, 5 pelo menos 8 mg/mL, pelo menos 10 mg/mL, pelo menos 15 mg/mL, pelo menos 25 mg/mL, pelo menos 50 mg/mL, pelo menos 75 mg/mL ou pelo menos 100 mg/mL. A forma líquida deve ser estocada entre 2°C e 8°C em seu recipiente original.

Em uma modalidade preferida, a invenção fornece a 10 composição da invenção embalada em um recipiente hermeticamente selado tal como uma ampola ou sache indicando a quantidade de anticorpo anti-CD3 humano.

As composições podem, ser desejado, estar presentes em um pacote ou dispositivo dispensador que pode conter uma ou mais formas de 15 dosagem de unidade contendo o ingrediente ativo. O pacote pode, por exemplo, compreender lâmina metálica ou plástica, tal como um pacote bolha.

Geralmente, os ingredientes das composições da invenção são derivados de um indivíduo que é da mesma origem de espécie ou reatividade 20 de espécie conforme um receptor de tais composições. Assim, em um modalidade preferida, anticorpos humanos ou humanizados são administrados a um paciente humano para terapia ou profilaxia.

A quantidade da composição da invenção que será eficaz no tratamento, prevenção ou melhora de um ou mais sintomas associados com 25 distúrbio de diabetes autoimune pode ser determinada por técnicas clínicas padrões. A dose precisa a ser empregada na formulação também dependerá da rota de administração e seriedade da patologia e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e das circunstâncias de cada paciente. Doses eficazes podem ser extrapoladas de curvas de dose-resposta derivadas de

sistemas de teste em modelo animal ou *in vitro*.

#### **5.4 Caracterização de utilidade terapêutica ou profilática de anti-CD3**

Moléculas de ligação a CD3 podem ser caracterizadas em uma variedade de maneiras. Em particular, moléculas de ligação a CD3 podem ser avaliadas pela habilidade de se ligar imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3. Tal ensaio pode ser realizado em solução (p. ex., Houghten, 1992, Bio/Techniques 13: 412-421), em microesferas (Lam, 1991, Nature 354: 82-84), em chips (Fodor, 1993, Nature 364: 555-556), em bactérias (Patente US No. 5.223.409), em esporos (Patente US Nos. 5.571.698; 5.403.484 e 5.223.409), em plasmídeos (Cull *et al.*, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 1865-1869) ou em um fago (Scott e Smith, 1990, Science 249: 386-390; Devlin, 1991, Science 249: 404-406; Cwirla *et al.*, 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87: 6378-6382; e Felici, 1991, J Mol Biol 222: 301-310) (cada uma dessas referências é incorporada aqui em sua totalidade como referência). Moléculas de ligação a CD3 que foram identificadas por se ligarem imunologicamente a um polipeptídeo CD3 podem então serem avaliadas por suas especificidade e afinidade por um polipeptídeo CD3.

Moléculas de ligação a CD3 podem ser avaliadas por ligação imunoespecífica a um polipeptídeo CD3 e reatividade cruzada com outros polipeptídeos por qualquer método conhecido na técnica. Imunoensaios que podem ser usados para analisar ligação imunoespecífica e reatividade cruzada incluem, mas não estão limitados a, sistemas de ensaio competitivo e não competitivo usando técnicas tal como transferências de Western, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzima), imunoensaios em “sanduíche”, ensaio de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitina em difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A, para nomear poucos. Tais ensaios são rotina e bem conhecidos na

técnica (veja, p. ex., Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, que é incorporada como referência aqui em sua totalidade). Imunoensaios exemplares são descritos brevemente abaixo (mas não se destinam como meio de limitação).

- 5                   Protocolos de imunoprecipitação geralmente compreendem lisar uma população de células em um tampão de lise tal como tampão RIPA (1% de NP-40 ou Triton X-100, 1% de desoxicólico de sódio, 0,1% de SDS, 0,15M de NaCl, 0,01M de fosfato de sódio em pH 7,2, 1% de Trasitol) suplementado com proteína fosfatase e/ou inibidores de protease (p. ex.,
- 10                  EDTA, P<sub>SF</sub>, aprotinina, vanadato de sódio), adicionar a molécula de ligação a CD3 ao lisado de células, incubar por um período de tempo (p. ex., 1 até 4 horas) a 40°C, adicionar microesferas de sefarese com proteína A e/ou proteína G ao lisado de células, incubar por cerca de uma hora ou mais a 40°C, lavar as microesferas em tampão de lise e ressuspender as microesferas
- 15                  em tampão de amostra/SDS. A habilidade da molécula de ligação a CD3 de interesse em imunoprecipitar um antígeno particular pode ser avaliada, p. ex., por análise de transferência de Western. Alguém versado na técnica seria instruído quanto aos parâmetros que podem ser modificados para aumentar a ligação da molécula de ligação a CD3 a um polipeptídeo CD3 e diminuir o
- 20                  ruído (p. ex., pré-clarificando o lisado de células com microesferas de sefarese). Para discussão adicional com relação a protocolos de imunoprecipitação veja, p. ex., Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque em 10.16.1.
- 25                  Análise de transferência de Western compreende geralmente preparar amostras proteicas, eletroforese das amostras proteicas em um gel de poliacrilamida (p. ex., SDS-PAGE 8%-20% dependendo do peso molecular do antígeno), transferir a amostra de proteína do gel de poliacrilamida para uma membrana tal como nitrocelulose, PVDF ou náilon, bloquear a

membrana em solução de bloqueio (p. ex., PBS com 3% de BSA ou leite desnatado), lavar a membrana em tampão de lavagem (p. ex., PBS-Tween 20), bloquear a membrana com molécula de ligação a CD3 de interesse (p. ex., um anticorpo de interesse) diluída em tampão de bloqueio, lavar a

5 membrana em tampão de lavagem, bloquear a membrana com um anticorpo (que reconheça a molécula de ligação a CD3) conjugado a um substrato enzimático (p. ex., peroxidase de rábano selvagem ou fosfatase alcalina) ou molécula radioativa (p. ex.,  $^{32}\text{P}$  ou  $^{125}\text{I}$ ) diluída em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem e detectar a presença do polipeptídeo CD3.

10 Alguém versado na técnica seria instruído quanto aos parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado e reduzir o barulho de ruído. Para discussão adicional com relação a protocolos de transferência de Western veja, p. ex., Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque em 10.8.1.

15 ELISAs compreendem preparar polipeptídeo CD3, revestir o poço de um placa de microtitulação de 96 poços com o polipeptídeo CD3, adicionar a molécula de ligação a CD3 de interesse conjugada a um composto detectável tal como um substrato enzimático (p. ex., peroxidase de rábano selvagem ou fosfatase alcalina) ao poço e incubar por um período de tempo e  
20 detectar a presença do polipeptídeo CD3. Em ELISAs a molécula de ligação a CD3 de interesse não tem que estar conjugada a um composto detectável; em vez disso, um anticorpo (que reconhece a molécula de ligação a CD3 de interesse) conjugado a um composto detectável pode ser adicionado ao poço. Adicionalmente, em vez de revestir o poço com o polip CD3, a molécula de  
25 ligação a CD3 pode ser revestida ao poço. Neste caso, um anticorpo conjugado a um composto detectável pode ser adicionado após a adição do polipeptídeo CD3 ao poço revestido. Alguém versado na técnica seria instruído quanto aos parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado assim como outras variações de ELISAs conhecidas na

técnica. Para discussão adicional com relação a ELISAs veja, p. ex., Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque em 11.2.1.

A afinidade de ligação de uma molécula de ligação a CD3 a um polipeptídeo CD3 e a taxa de desligamento de uma interação molécula de ligação a CD3-polipeptídeo CD3 pode ser determinada por ensaios de ligação competitiva. Um exemplo de ensaio de ligação é um radioimunoensaio compreendendo a incubação de polipeptídeo CD3 marcado (p. ex.,  $^3\text{H}$  ou  $^{125}\text{I}$ ) com a molécula de ligação a CD3 de interesse na presença de quantidades crescentes de polipeptídeo CD3 não marcado e a detecção da molécula de ligação a CD3 ligada ao polipeptídeo CD3 marcado. A afinidade de uma molécula de ligação a CD3 por um polipeptídeo CD3 e as taxas de desligamento de ligação podem ser determinadas a partir dos dados por análise de plotagem scatchard. Competição com uma segunda molécula de ligação a CD3 também pode ser determinada usando radioimunoensaios. Neste caso, um polipeptídeo CD3 é incubado com uma molécula de ligação a CD3 conjugada a um composto marcado (p. ex.,  $^3\text{H}$  ou  $^{125}\text{I}$ ) na presença de quantidades crescentes de uma segunda molécula de ligação a CD3 não marcada.

Em uma modalidade preferida, análise cinética de BIACore é usada para determinar as taxas de ligação e desligamento de moléculas de ligação a CD3 a um polipeptídeo CD3. Análise cinética de BIACore compreende analisar a ligação e dissociação de um polipeptídeo CD3 a partir de chips com moléculas de ligação a CD3 imobilizadas em sua superfície.

As moléculas de ligação a CD3, em particular anticorpos anti-CD3 humano, e composições da invenção também podem ser avaliadas por sua habilidade em modular ativação de célula T. A ativação de célula T pode ser determinada pela medição, p. ex., de alterações no nível de expressão de citocinas e/ou marcadores de ativação de célula T. Técnicas conhecidas por

aqueles versados na técnica, incluindo, mas não limitando a, imunoprecipitação seguida por análise de transferência de Western, ELISAs, citometria de fluxo, análise de transferência de Northern e RT-PCR podem ser usadas para medir a expressão de citocinas e marcadores de ativação de célula

- 5 T. Em uma modalidade preferida, uma moléculas de ligação a Cd3 ou composição da invenção é testada por sua habilidade em induzir a expressão de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2.

Os anticorpos anti-CD3 e composições da invenção também podem ser avaliados por suas habilidades em induzir sinalização de célula T.

- 10 A habilidade de um anticorpo anti-CD3 ou de uma composição da invenção em induzir sinalização de célula T pode ser avaliada, p. ex., por ensaios de quinase e ensaio de alteração eletroforética (EMSA).

Os anticorpos anti-CD3 e composições da invenção podem ser testados *in vitro* ou *in vivo* por suas habilidades em modular proliferação de célula T. Por exemplo, a habilidade de um anticorpo anti-CD3 ou de uma composição da invenção em modular proliferação de célula T pode ser avaliada, p. ex., por incorporação de  $^3$ H-timidina, contagens com azul de trypan e classificação de celular ativada por fluorescência (FACS).

Os anticorpos anti-CD3 humano e composições da invenção podem ser testados *in vitro* ou *in vivo* por suas habilidades em induzir citólise. Por exemplo, a habilidade de um anticorpo anti-CD3 ou de uma composição da invenção em induzir citólise pode ser avaliada, p. ex., por ensaios de liberação de  $^{51}$ Cr.

Os anticorpos anti-CD3 e composições da invenção podem ser testados *in vitro* ou *in vivo* por suas habilidades em mediar depleção de células T de sangue periférico. Por exemplo, a habilidade de um anticorpo anti-CD3 ou de uma composição da invenção em mediar depleção de células T de sangue periférico pode ser avaliada, p. ex., por medição de contagens de célula T usando análise de citometria de fluxo.

Os anticorpos anti-CD3 e composições da invenção podem ser testados *in vivo* por suas habilidades em mediar contagens de linfócito de sangue periférico. Por exemplo, a habilidade de um anticorpo anti-CD3 ou de uma composição da invenção em mediar contagens de linfócito de sangue periférico pode ser avaliada, p. ex., por obtenção de uma amostra de sangue periférico de um indivíduo, separação dos linfócitos de outros componentes de sangue periférico tal como plasma usando, p. ex., um gradiente de Ficoll e contagem dos linfócitos usando azul de trypan.

**5 10 15 20 25 5.4.1 Caracterização de moléculas de imunoglobulina com regiões Fc variantes**

Em modalidades preferidas, a caracterização de moléculas compreendendo regiões Fc variantes com afinidades a Fc $\gamma$ R alteradas (p. ex., ligação a Fc $\gamma$ R nula) é feita com um ou mais ensaios com base bioquímica, de preferência de uma maneira de alta produção. Os um ou mais ensaios bioquímicos podem ser qualquer ensaio conhecido na técnica para identificar interação Fc-Fc $\gamma$ R, isto é, ligação específica de uma região Fc a um Fc $\gamma$ R, incluindo, mas não limitando a, um ensaio ELISA, ensaios de ressonância de plasma em superfície, ensaio de imunoprecipitação, cromatografia de afinidade e diálise de equilíbrio. Os ensaios baseados em funcionalidade podem ser qualquer ensaio conhecido na técnica por caracterizar uma ou mais funções celulares efetoras mediadas por Fc $\gamma$ R. Comparação de anticorpos com regiões Fc alteradas da invenção para controlar anticorpos fornece uma medida da extensão da diminuição ou eliminação de interação Fc-Fc $\gamma$ R. Exemplos não limitantes de funções de celulares efetoras que podem ser usadas de acordo com os métodos da invenção, incluem, mas não estão limitados a, citotoxicidade mediada por célula anticorpo-dependente (ADCC), fagocitose anticorpo-dependente, fagocitose, opsonização, opsonofagocitose, ligação celular, formação de roseta, ligação de C1q e citotoxicidade mediada por célula dependente de complemento. Em modalidades preferidas, a

caracterização de moléculas compreendendo regiões de Fc variantes com afinidades de Fc $\gamma$ R alteradas (p. ex., ligação a FcR nula) é feita com um ou mais ensaios com base bioquímica em combinação ou em paralelo com um ou mais ensaios com base em funcionalidade, de preferência de uma maneira de alta produção.

Em algumas modalidades, a caracterização de moléculas compreendendo regiões Fc variantes com afinidades de Fc $\gamma$ R alteradas (p. ex., ligação a FcR nula) compreende: caracterizar a ligação da molécula compreendendo a região Fc variante a um Fc $\gamma$ R (um ou mais), usando um ensaio bioquímico para determinar a interação Fc-Fc $\gamma$ R, de preferência, um ensaio baseado em ELISA seguido pela comparação dos resultados com os resultados do mesmo ensaio obtido com um controle, isto é, anticorpo não modificado. Uma vez que a molécula compreendendo uma região Fc variante foi caracterizada por sua interação com um ou mais Fc $\gamma$ Rs e determinada como tendo ligação nula a um ou mais Fc $\gamma$ Rs, por pelo menos um ensaio com base bioquímica, p. ex., um ensaio de ELISA, a molécula pode ser engenheirada em uma imunoglobulina completa, usando métodos de tecnologia do DNA recombinante padrão conhecidos na técnica e a imunoglobulina compreendendo a região Fc variante expressada em células mamíferas para caracterização bioquímica adicional. A imunoglobulina em que uma região Fc variante da invenção é introduzida (p. ex., substituindo a região Fc da imunoglobulina) pode ser qualquer imunoglobulina incluindo, mas não limitando a, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos biespecíficos, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanizados e anticorpos quiméricos. Em modalidades preferidas, uma região Fc variante é introduzida em uma imunoglobulina específica para o complexo CD3 associado com o TcR humano.

As regiões Fc variantes, de preferência no contexto de uma imunoglobulina, podem ser adicionalmente caracterizadas usando um ou mais

ensaios bioquímicos e/ou um ou mais ensaios funcionais, de preferência de uma maneira de alta produção. Em algumas modalidades alternativas, as regiões Fc variantes não são introduzidas em uma imunoglobulina e são adicionalmente caracterizadas usando um ou mais ensaios com base 5 bioquímica e/ou um ou mais ensaios funcionais, de preferência de uma maneira de alta produção. Os um ou mais ensaios bioquímicos podem ser qualquer ensaio conhecido na técnica por identificar interações Fc-Fc $\gamma$ R, incluindo, mas não limitando a, um ensaio de ELISA, e ensaio baseado em ressonância de plasma de superfície para determinar os parâmetros cinéticos 10 de interação Fc-Fc $\gamma$ R, p. ex., ensaio de BIACore. Os um ou mais ensaios funcionais podem ser qualquer ensaio conhecido na técnica por caracterizar uma ou mais funções celulares efetoras mediadas por Fc $\gamma$ R como conhecido 15 por alguém versado na técnica ou descrito aqui. Em modalidades específicas, as imunoglobulinas compreendendo as regiões Fc variantes são avaliadas em um ensaio de ELISA por ligação a um ou mais Fc $\gamma$ Rs, p. ex., Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIA; seguido por um ou mais ensaios ADCC. Em algumas modalidades, 20 as imunoglobulinas compreendendo as regiões Fc variantes são avaliadas usando um ensaio baseado em ressonância de plasma de superfície, p. ex., BIACore. Para uma discussão detalhada adicional de caracterização de imunoglobulinas compreendendo regiões Fc variantes veja Pub. Ped. Pat. US 25 No. 2005/0064514 A1 e Pub. Ped. Pat. US No. 20050037000 A1.

A imunoglobulina compreendendo as regiões Fc variantes pode ser analisada em qualquer ponto usando um ensaio baseado em ressonância de plasma de superfície, p. ex., BIACore para definir os 25 parâmetros cinéticos das interação Fc-Fc $\gamma$ R, usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica.

Na maioria das modalidades preferidas, a imunoglobulina compreendendo as regiões Fc variantes é caracterizada adicionalmente em um modelo animal para interação com um Fc $\gamma$ R. Modelos animais preferidos para

uso nos métodos da invenção são, por exemplo, camundongos transgênicos expressando Fc $\gamma$ Rs humanos, p. ex., qualquer modelo de camundongo descrito em Patente US No. 5.877.397, que é aqui incorporada como referência em sua totalidade. Camundongos transgênicos para uso nos métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a, camundongos Fc $\gamma$ RIIIA nocautes nus portando Fc $\gamma$ RIIIA humano; camundongos Fc $\gamma$ RIIIA nocautes nus portando Fc $\gamma$ RIIA humano; camundongos Fc $\gamma$ RIIIA nocautes nus portando Fc $\gamma$ RIIB humano e camundongos Fc $\gamma$ RIIIA nocautes nus portando Fc $\gamma$ RIIB humano e Fc $\gamma$ RIIIA humano.

10 **5.4.2 Caracterização *in vitro* e *in vivo***

Vários aspectos das composições farmacêuticas ou dos anticorpos anti-CD3 da invenção são de preferência testados *in vitro*, em um sistema de cultura de células e em organismo modelo animal, tal como um sistema de modelo animal de roedor, para a atividade terapêutica desejada antes do uso em humanos. Por exemplo, ensaios que podem ser usados para determinar se a administração de uma composição farmacêutica específica é indicada, incluem ensaios de cultura de células em que uma amostra de tecido de paciente é cultivada em cultura e exposta a ou posta em contato de outro modo com uma composição farmacêutica e o efeito de tal composição da amostra é observado. A amostra de tecido pode ser obtida por biópsia do paciente. Este teste permite a identificação das bactérias direcionada a tumor mais eficazes terapeuticamente e das moléculas terapêuticas mais eficazes terapeuticamente para cada paciente individual. Em várias modalidades específicas, ensaios *in vitro* podem ser portados com células representativas de tipos celulares envolvidos em um distúrbio autoimune ou inflamatório (p. ex., células T) para determinar se uma composição farmacêutica da invenção tem um efeito desejado em tais tipos celulares.

De acordo com a invenção, ensaios clínicos com indivíduos humanos precisam ser realizados a fim de demonstrar a eficácia terapêutica

e/ou profilática de anticorpos anti-CD3. Estudos *in vitro* e de modelo animal usando anticorpos anti-CD3 podem ser extrapolados para humanos e são suficientes para demonstrar a utilidade profilática e/ou terapêutica dos citados anticorpos anti-CD3.

5 Anticorpos anti-CD3 podem ser testados em sistemas de modelo animal adequados antes do uso em humanos. Tais sistemas de modelo animal incluem, mas não estão limitados a, ratos, camundongos, galinha, vacas, macacos, porcos, cachorros, coelhos, etc. Qualquer sistema animal bem conhecido na técnica pode ser usado. Em uma modalidade específica da 10 invenção, moléculas de ligação a CD3 são testadas em um sistema de modelo de camundongo. Tais sistemas de modelo são amplamente usados e bem conhecidos pelo técnico versado. Moléculas de ligação a CD3 podem ser administradas repetidamente. Vários aspectos do procedimento podem variar. Os citados aspectos incluem o regime temporal de administração de 15 moléculas de ligação a CD3 e se tais agentes são administrados separadamente ou como uma mistura.

A atividade anti-inflamatória de anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção pode ser determinada pelo uso de vários modelos animais experimentais de artrite inflamatória conhecida na 20 técnica e descrita em Crofford L. J. e Wilder R. L. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.*, (eds.), capítulo 30 (Lee e Febiger, 1993). Modelos animais espontâneos e experimentais de artrite reumatóide e doenças 25 reumáticas autoimunes também podem ser usados para avaliar a atividade anti-inflamatória de anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção. Os seguintes são alguns ensaios fornecidos como exemplos e não por limitação.

Os modelos animais de princípio para artrite ou doença inflamatória conhecidos na técnica e amplamente usados incluem: modelos de

rato para artrite induzida por adjuvante, modelos de camundongo e rato para artrite induzida por colágeno e modelos de criceto, coelho e rato para artrite induzida por antígeno, todos descritos em Crofford L. J. e Wilder R. L. “Arthritis and Autoimmunity in Animals”, em Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.*, (eds.), capítulo 30 (Lee e Febiger, 1993), incorporada aqui como referência em sua totalidade. Um artrite induzida por colágeno (CIA) é um modelo animal para a doença autoimune humana de artrite reumatóide (RA) (Trenthorn *et al.*, 1977, *J Exp Med* 146: 857). Esta doenças pode ser induzida em muitas espécies pela administração de colágeno tipo II heterólogo (Courtenay *et al.*, 1980, *Nature* 283: 665 e Cathcart *et al.*, 1986, *Lab Invest* 54: 26). Com respeito a modelos animais de artrite veja, além disso, p. ex., Holmdahl, R., 1999, *Curr Biol* 15: R528-530.

Adicionalmente, modelos animais para doença do intestino inflamatória também podem ser usados para avaliar a eficácia dos anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção (Kim *et al.*, 1992, *Scand J Gastroentrol* 27: 529-537; Strober, 1985, *Dig Dis Sci* 30(12): 3S-10S). Colite ulcerativa e doença de Crohn são doenças intestinais inflamatórias humanas que podem ser induzidas em animais. Polissacarídeos sulfatados incluindo, mas não limitando a amilopectina, carragenano, sulfato de amilopectina e sulfato de dextrano ou irritantes químicos incluindo, mas não limitando a ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) e ácido acético podem ser administrados a animais oralmente para induzir doenças intestinais inflamatórias.

Modelos animais para asma também podem ser usados para avaliar eficácia dos anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção. Um exemplo de um de tal modelo é o modelo de transferência adotiva marinha em que a provocação de aeroalérgeno de camundongos receptores TH1 ou TH2 resulta em migração de células efetoras TH para as

vias respiratórias associadas com uma resposta inflamatória de mucosa de pulmão neutrofílica (TH1) e eosinofílica (TH2) intensas (Cohn *et al.*, 1997, *J Exp Med* 186:1737-1747).

Modelos animais para distúrbios autoimunes também podem ser usados para avaliar a eficácia de anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção. Modelos animais para distúrbios autoimunes tal como diabetes tipo 1, autoimunidade de tireóide, lúpus eritematoso sistêmico e glomerulonefrite foram desenvolvidos (Bluestone *et al.*, 2004, *PNAS* 101: 14622-14626; Flanders *et al.*, 1999, *Autoimmunity* 29: 235-246; Krogh *et al.*, 1999, *Biochimie* 81: 511-515; Foster, 1999, *Semin Nephrol* 19: 12-24).

A eficácia de anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção também pode ser testada em tais modelos de distúrbio autoimune como um modelo de encefalomielite alérgica experimental (EAE). EAE é uma doença autoimune experimental do sistema nervoso central (SNC) (Zamvil *et al.*, 1990, *Ann Rev Immunol* 8: 579) e é um modelo de doença para a patologia autoimune humana, esclerose múltipla (MS). EAE é um exemplo de distúrbio autoimune mediado por célula que é mediado através de células T. EAE é prontamente induzida em espécies mamíferas por imunizações de proteína básica de mielina (MBP) purificada do SNC ou proteolipídeo encefalitogênico (PLP). Camundongos SJL/J são uma cepa suscetível de camundongos (H-2u) e na indução de EAE, esses camundongos desenvolvem uma doença paralítica aguda e um infiltrado celular agudo é identificável dentro do SNC. EAE se desenvolve espontaneamente em camundongos transgênicos para receptor de célula T (TcR) peptídeo-específico MBP1-17 (TgMBP+) de ruído de fundo deficiente em RAG-1 (Lafaille *et al.*, 1994, *Cell* 78: 399).

Adicionalmente, quaisquer ensaios conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para avaliar anticorpos anti-CD3 ou as composições farmacêuticas aqui divulgadas para doenças autoimunes e/ou

inflamatórias.

A toxicidade e/ou eficácia de anticorpos anti-CD3 ou composições farmacêuticas da invenção podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de células ou animais experimentais, p. ex., pela determinação do LD<sub>50</sub> (a dose letal a 50% da população) e do ED<sub>50</sub> (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e ele pode ser expresso como a razão LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Anticorpos anti-CD3 que exibem grandes índices terapêuticos são preferidas. Embora anticorpos anti-CD3 que exibam efeitos colaterais tóxicos possam ser usados, deve-se tomar cuidado para desenhar sistema de distribuição que direcione tais agentes para ao sítio de tecido afetado a fim de minimizar lesão potencial a células não infectadas e desse modo, reduzir efeitos colaterais.

Os dados obtidos de ensaios de cultura de células e estudos animais podem ser usados na formulação de faixa de dosagem de anticorpos anti-CD3 humano para uso em humanos. A dosagem de tais agentes se baseia de preferência em uma faixa de concentrações circulantes que incluem o ED<sub>50</sub> com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar nesta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da rota de administração utilizada. Para qualquer agente usado no método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de concentração de plasma circulante que inclui o IC<sub>50</sub> (isto é, a concentração do composto teste que atinge uma inibição de metade da máxima de sintomas) como determinado em cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinar mais precisamente doses úteis em humanos. Níveis em plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta resolução.

Eficácia em prevenir ou tratar um distúrbio autoimune pode

ser demonstrado, p. ex., pela detecção da habilidade de anticorpos anti-CD3 humano ou composição da invenção em reduzir um ou mais sintomas do distúrbio autoimune, em reduzir contagens de linfócito absolutas médias, em diminuir ativação de célula T, em diminuir proliferação de célula T, em 5 reduzir produção de citocina, ou em modular um ou mais perfis de citocina particulares. A eficácia em tratar diabetes pode ser demonstrada, p. ex., pela detecção da habilidade de anticorpos anti-CD3 humano composição da invenção em reduzir um ou mais sintomas, em preservar resposta de peptídeo C a MMTT, em reduzir o nível de HA1 ou HA1c, em reduzir o requerimento 10 diário de insulina, ou em diminuir a ativação de célula T em tecido da ilhota pancreática. A eficácia em prevenir ou tratar um distúrbio inflamatório pode ser demonstrada, p. ex., pela detecção da habilidade de um anticorpo anti-CD3 em reduzir um ou mais sintomas do distúrbio inflamatório, em diminuir ativação de célula T, diminuir proliferação de célula T, em modular um ou 15 mais perfis de citocina, em reduzir produção de citocina, em reduzir inflamação de uma articulação, órgão ou tecido ou para melhorar a qualidade de vida.

Alterações em atividade de doença inflamatória podem ser avaliadas através de contagens de articulação inchada e dolorida, pontuações 20 globais do paciente e médico para dor e atividade de doença e o ESRICRP. A progressão de lesão articular estrutural pode ser avaliada por pontuação quantitativa de raios-X das mãos, punhos e pés (método Sharp). Alterações em estado funcional em humanos com distúrbios inflamatórios podem ser avaliadas usando o Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ) e alterações 25 em qualidade de vida são avaliadas com o SF-36.

### **5.5 Métodos para monitorar contagens de linfócitos e ligação porcentual**

O efeito de uma ou mais doses de um ou mais anticorpos anti-CD3 humano ou composição em contagens de linfócito de sangue periférico pode ser monitorado/avaliado usando técnicas padrões conhecidas por alguém

versado na técnica. Contagens de linfócito de sangue periférico em um mamífero podem ser determinadas, p. ex., pela obtenção de uma amostra de sangue periférico do citado mamífero, separação dos linfócitos de outros componentes de sangue periférico tal como plasma usando, p. ex., 5 centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) e contagem de linfócitos usando azul de trypan. Contagens de linfócito de sangue periférico em um mamífero podem ser determinadas, p. ex., pela separação dos linfócitos de outros componentes de sangue periférico tal como plasma usando, p. ex., um uso de gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia), marcação 10 de células T com um anticorpos direcionado a um antígeno de célula T tal como CD2, CD3, CD4 e CD8 que estão conjugados a FITC ou ficoeritrina e medição do número de células T por FACS. Adicionalmente, o efeito em um subgrupo particular de células T (p. ex., CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>RO<sup>+</sup>, 15 CD8<sup>+</sup>RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>RA<sup>+</sup>, ou CD8<sup>+</sup>RA<sup>+</sup>) pode ser determinado usando técnicas padrões conhecidas por alguém versado na técnica tal como FACS.

A porcentagem de polipeptídeos CD3 expressos por linfócitos de sangue periférico ligados a anticorpos anti-CD3 antes ou após, ou ambos antes e após a administração de uma ou mais doses de anticorpos anti-CD3 pode ser avaliada usando técnicas padrões conhecidas por alguém versado na 20 técnica. A porcentagem de polipeptídeos CD3 expressos por linfócitos de sangue periférico ligados por anticorpos anti-CD3 pode ser determinada, p. e.x, pela obtenção de amostra de sangue periférico de um mamífero, separação dos linfócitos de outros componentes de sangue periférico tal como plasma usando, p. ex., centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque 25 (Pharmacia) e marcação de células T com uma molécula de ligação a anti-CD3 fora aquela da invenção conjugada a FITC e um anticorpo direcionado a um antígeno de célula T tal como CD3, CD4 ou CD8 que está conjugado a ficoeritrina e determinação do número de células T marcadas com anticorpo de molécula de ligação a anti-CD3 em relação ao número de células T

marcadas com um anticorpo direcionado a um antígeno de célula T usando FACS.

### 5.6 Métodos para produzir anticorpos

Anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3 podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, em particular, por síntese química ou de preferência, por técnicas de expressão recombinante.

Anticorpos policlonais que se ligam imunoespecificamente a um antígeno podem ser produzidos por vários procedimentos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um antígeno humano pode ser administrado a vários animais hospedeiros incluindo, mas não limitando a, coelhos, camundongos, ratos, etc. para induzir a produção de soro contendo anticorpos policlonais específicos para o antígeno humano. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie hospedeira e incluem, mas não estão limitados a, o de Freund (completo e incompleto), géis minerais tal como hidróxido de alumínio, substâncias ativas em superfície tal como lisolecitina, polióis plurônicos, polianions, peptídeos, emulsões oleosas, hemocianinas de limpet de keyhole, dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente úteis tal como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes também são bem conhecidos na técnica.

Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo o uso de hibridoma, tecnologias recombinantes e de visualização de fago, ou uma combinação destas. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas na técnica e ensinados, por exemplo, em Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor and T cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, NY, 1981) (as citadas referências incorporadas como referência em suas

totalidades). O termo “anticorpo monoclonal” como aqui utilizado não está limitado a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. O termo “anticorpo monoclonal” se refere a um anticorpo que é derivado de um único clone, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago e não ao 5 método pelo qual ele é produzido.

Métodos para produzir e triar anticorpos específicos usando tecnologia de hibridoma são rotina e bem conhecidos na técnica. Brevemente, camundongos podem ser imunizados com um antígeno CD3 e uma vez que uma resposta imune seja detectada, p. ex., anticorpos específicos para um 10 antígeno CD3 (de preferência, antígeno CD3 ε) são detectados no soro do camundongo, o baço do camundongo é colhido e esplenócitos isolados. Os esplenócitos são então fusionados por técnicas bem conhecidas com quaisquer células de mieloma adequadas, por exemplo células da linhagem celular SP20 disponível da ATCC. Hibridomas são selecionados e clonados por diluição 15 limitante. Os clones de hibridoma são então avaliados por métodos conhecidos na técnica para células que secretam anticorpos capazes de se ligar a um polipeptídeo da invenção. Fluido ascítico, que geralmente contém altos níveis de anticorpos, pode ser gerado imunização de camundongos com 20 clones de hibridoma positivos.

Consequentemente, a presente invenção fornece métodos para gerar anticorpos pelo cultivo de uma célula de hibridoma que secreta um anticorpo da invenção em que, de preferência, o hibridoma é gerado pela fusão de esplenócitos isolados de um camundongo imunizado com um antígeno CD3 com células de mieloma e então triagem dos hibridomas que 25 resultam da fusão por clones de hibridoma que secretam um anticorpo capaz de se ligar a um antígeno CD3 (de preferência, antígeno CD3 ε).

Fragments de anticorpo que reconhecem抗ígenos CD3 específicos (de preferência, antígeno CD3 ε) podem ser gerados por qualquer técnica conhecida por aqueles versados na técnica. Por exemplo, fragmentos

Fab e F(ab')<sub>2</sub> da invenção podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, usando enzimas tal como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contêm a região variável, a região constante de cadeia leve 5 e o domínio CH1 da cadeia pesada. Adicionalmente, os anticorpos da presente invenção também podem ser gerados usando vários métodos de visualização de fagos conhecidos na técnica.

Em métodos de visualização de fagos, domínios de anticorpo funcional são visualizados na superfície de partículas de fago que portam as 10 sequências polinucleotídicas codificando eles. Em particular, sequências de DNA codificando domínios VH e VL são amplificadas a partir de bibliotecas de cDNA (p. ex., bibliotecas de cDNA humanas ou murinas de tecidos afetados). Os DNAs codificando os domínios VH e VL são recombinados juntos com um ligante scFv por PCR e clonados em um vetor fagomídeo. O 15 vetor é eletroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infectada com fago auxiliar. O fago usado nesses métodos é tipicamente fago filamentoso incluindo fd e M13 e os domínios VH e VL são geralmente fusionados recombinantemente ou ao gene III ou gene VIII do fago. Fago expressando um domínio de ligação 20 antigênica que se liga a um antígeno particular pode ser selecionado ou identificado com antígeno, p. ex., usando antígeno marcado ou antígeno ligado ou capturado em uma superfície sólida ou microesfera. Exemplos de métodos de visualização de fagos que podem ser usados para fazer os 25 anticorpos da presente invenção incluem aqueles divulgados em Brinkman *et al.*, 1995, J Immunol Methods 182: 41-50; Ames *et al.*, 1995, J Immunol Methods 184: 177-186; Kettkeborough *et al.*, 1994, Eur J Immunol 24: 952-958. Persic *et al.*, 1997, Gene 187: 9-18; Burton *et al.*, 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; Pedido PCT No. PCT/GB91/O1 134; Publicação Internacional Nos. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 e WO 97/13844

e Patente US Nos. 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 e 5.969.108; cada uma das quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

5 Como descrito nas referências acima, após a seleção de fago, o as regiões que codificam anticorpo do fago podem ser isoladas e usadas para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos ou qualquer outro fragmento de ligação a antígeno desejado e expressas em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células mamíferas, células de inseto, células vegetais, 10 levedura e bactérias, p. ex., como descrito abaixo. Técnicas para produzir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' e F(ab')2 também podem ser empregadas usando métodos conhecidos na técnica tal como aqueles divulgados em publicação PCT No. WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, BioTechniques 12(6): 864-869; Sawai *et al.*, 1995, AJRI 34: 26-34 e Better *et* 15 *al.*, 1988, Science 240: 1041-1043 (as citadas referências incorporadas como referência em suas totalidades).

Para gerar anticorpos inteiros, iniciadores de PCR incluindo 20 sequências nucleotídicas de VH ou VL, um sítio de restrição e uma sequência flanqueadora para proteger o sítio de restrição podem ser usados para amplificar as sequências de VH ou VL em clones scFv. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas por aqueles versados na técnica, os domínios VH amplificados por PCR podem ser clonados em vetores expressando um região constante de VH, p. ex., a região constante gama 4 humana e os domínios VL amplificados por PCR podem ser clonados em vetores expressando um região constante de VL, p. ex., regiões constantes capa ou lambda humana. De 25 preferência, os vetores para expressar os domínios VH ou VL compreendem um promotor EF-1 $\alpha$ , um sinal de secreção, um sítio de clonagem para o domínio variável, domínios constantes e um marcador de seleção tal como neomicina. Os domínios VH ou VL também podem ser clonados em um vetor

expressando as regiões constantes necessárias. Os vetores de conversão de cadeia pesada e vetores de conversão de cadeia leve são então co-transfектados em linhagens celulares para gerar linhagens celulares estáveis ou transientes que expressam anticorpos completos, p. ex., IgG, usando

5 técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica.

Para alguns usos, incluindo uso *in vivo* de anticorpos em humanos e ensaios de detecção *in vitro*, pode ser preferível usar anticorpos humanos ou químéricos. Anticorpos completamente humanos são particularmente desejáveis para tratamento terapêutico de indivíduos

10 humanos. Anticorpos humanos podem ser feitos por uma variedade de métodos conhecidos na técnica incluindo métodos de visualização de fago descritos acima usando bibliotecas de anticorpo derivadas de sequências de imunoglobulina humana. Veja também, Patente US Nos. 4.444.887 e 4.716.111 e Publicação Internacional Nos. WO 98/46645, WO 98/50433, WO

15 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741; cada uma das quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

Anticorpos humanos também podem ser produzidos usando camundongos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulina humana. Por exemplo, os complexos de gene de imunoglobulina de cadeia pesada e leve humana podem ser introduzidos aleatoriamente ou por recombinação homóloga em células tronco embrionárias de camundongo. Senão, a região variável humana, região constante e região de diversidade podem ser introduzidas em células tronco embrionárias de camundongo além

20 dos gene de cadeia pesada e leve humana. Os genes de imunoglobulina de cadeia pesada e leve de camundongo podem ser tornados não funcionais separadamente ou simultaneamente com a introdução de locos de imunoglobulina humana por recombinação homóloga. Em particular, a deleção homozigótica da região J<sub>H</sub> previne produção de anticorpo endógeno.

25

As células tronco embrionárias modificadas são expandidas e microinjetadas em blastócitos para produzir camundongos quiméricos. Os camundongos quiméricos são então criados para produzir crias homozigóticas que expressam anticorpos humanos. Os camundongos transgênicos são imunizados de uma maneira normal com um antígeno selecionado, p. ex. Todo ou uma porção de um polipeptídeo da invenção. Anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno podem ser obtidos dos camundongos imunizados, transgênicos usando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana abrigados pelos camundongos transgênicos se rearranjam durante diferenciação de célula B e subsequentemente sofrem alteração de classe e mutação somática. Assim, usando tal técnica, é possível produzir anticorpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para um vista geral desta tecnologia para produzir anticorpos humanos, veja Lonberg and Huszar (1995, Int Rev Immunol 13: 10 5 65-93). Para uma discussão detalhada desta tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para produzir tais anticorpos, veja, p. ex., publicação PCT Nos. WO 98/24893, 15 20 25 WO 96/34096 e WO 96/33735 e Patente US Nos. 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 e 5.939.598, que são incorporados como referência aqui em suas totalidades. Além disso, companhias tais como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) e Genpharm (San Jose, CA) podem se comprometer a fornecer anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando tecnologia similar àquela descrita acima.

Um anticorpo químico é uma moléculas em que porções diferentes do anticorpo são derivadas de moléculas de imunoglobulina diferentes. Métodos para produzir anticorpos químicos são conhecidos na técnica. Veja, p. ex., Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies *et al.*, 1989, J Immunol Methods 125: 191-202

e Patente US Nos. 5.807.715, 4.816.567 e 6.331.415, que são incorporadas aqui como referência em suas totalidades.

Um anticorpo humanizado é um anticorpo ou sua variante ou fragmento deste que é capaz de se ligar a um antígeno pré-determinado e que 5 compreende um região estrutural que tem consideravelmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e um CDR que tem consideravelmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina não humana. Um anticorpo humanizado compreende consideravelmente todos e pelo menos um e tipicamente dois, domínios variáveis (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 10 Fabc, Fv) em que todas ou consideravelmente todas as regiões CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana (isto é, anticorpo doador) e todas ou consideravelmente todas as regiões estruturais são aquelas de uma sequência consenso de imunoglobulina humana. De preferência, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos um porção de uma 15 região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de um imunoglobulina humana. Ordinariamente, o anticorpo conterá tanto a cadeia leve assim como pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, de dobra, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. O anticorpo humanizado pode ser selecionado de qualquer 20 classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE e de qualquer isotipo, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Geralmente, o domínio constante é um domínio constante de fixação de complemento onde é desejado que o anticorpo humanizado exiba atividade citotóxica e a classe é tipicamente IgG1. Quando tal atividade citotóxica não é desejável o domínio constante 25 pode ser da classe IgG2. Exemplos de domínios constantes de VL e VH que podem ser usados em certas modalidades da invenção incluem, mas não estão limitados a, C-capas e C-gamma-1 (nG1m) descritos em Johnson *et al.*, (1997) J Infect Dis 176: 1215-1224 e aqueles descritos em Patente US No. 5.824.307. O anticorpo humanizado pode compreender sequências de mais de uma classe

ou isotipo e selecionar domínios constantes particulares para otimizar funções efetoras desejadas está dentro do conhecimento ordinário da técnica. As regiões estruturais e CDR de um anticorpo humanizado não precisam corresponder precisamente às sequências parentais, p. ex., CDR doadora ou 5 estrutural consenso pode ser mutada por substituição, inserção ou deleção de pelo menos um resíduo de modo que o resíduo CDR ou estrutural no sítio não corresponda ao consenso ou ao anticorpo importado. Tais mutações entretanto, não serão extensivas. Geralmente, pelo menos 75% dos resíduos 10 de anticorpo humanizado corresponderão àqueles das sequências FR e CDR parentais, mas frequentemente 90% e da maior preferência mais de 95%. Anticorpo humanizado pode ser produzido usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo, mas não limitando a, enxerto de CDR (Patente Européia No. EP 239.400; publicação Internacional No. WO 91/09967 e Patente US Nos. 5.225.539, 5.530.101 e 5.585.089), folheamento 15 e re-colocação de superfície (*vennering or resurfacing*) (Patentes Européias Nos. EP 592.106 e EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814 e Roguska *et al.*, 1994, PNAS 91: 969-973), embaralhamento de cadeia (Patente US NO. 5.565.332) e técnicas divulgadas em, p. ex., Pat US No. 20 6.407.213, Pat US No. 5.766.886, WO 9317105, Tan *et al.*, J Immunol 169: 1119 25 (2002), Caldas *et al.*, Protein Eng 13(5): 353-60 (2000), Morea *et al.*, Methods 20(3): 267 79 (2000), Baca *et al.*, J Biol Chem 272(16): 10678-84 (1997), Roguska *et al.*, Protein Eng 9(10): 895 904 (1996), Couto *et al.*, Cancer Res 55(23): 5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, Cancer Res 55(8): 25 1717-22 (1995), Sandlu JS, Gene 150(2): 409-10 (1994) e Pedersen *et al.*, J Mol Biol 235(3): 959-73 (1994). Veja também Pub. Patente US No. US 2005/0042664 A1 (24 de fev. De 2005), que é incorporada como referência aqui em sua totalidade. Frequentemente, resíduos estruturais nas regiões estruturais serão substituídos com os resíduos correspondentes do anticorpo

doador de CDR para alterar, de preferência melhorar, a ligação de antígeno. Essas substituições estruturais são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, p. ex., pela modelagem das interações dos resíduos de CDR e estruturais para identificar resíduos estruturais importantes para a ligação de 5 antígeno e comparação de sequência para identificar resíduos estruturais incomuns em posições particulares. (Veja, p. ex., Queen *et al.*, Patente US NO. 5.585.089 e Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323, que são incorporadas aqui como referência em suas totalidades).

Anticorpos de domínio único, por exemplo, anticorpos que não 10 possuem as cadeias leves, podem ser produzidos por métodos bem conhecidos na técnica. Veja Riechmann *et al.*, 1999, J Immuno 231: 25-38; Nuttall *et al.*, 2000 Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muylderman, 2001 J Biotechnol 74(4): 277302; Patente US No. 6.005.079 e Publicação Internacional Nos. WO 94/04678, WO 94/25591 e WO 01/44301, cada uma das quais é 15 incorporada aqui como referência em sua totalidade.

### **5.7 Polinucleotídeos que codificam anticorpos**

A invenção fornece polinucleotídeos que compreendem uma sequência nucleotídica que codifica um anticorpo que se liga imunoespecificamente a um polipeptídeo CD3. A invenção também abrange 20 polinucleotídeos que se hibridizam sob condições de hibridização de estringência baixa, intermediária ou de alta estringência, p. ex., como definido supra, para polinucleotídeos que codificam um anticorpo da invenção.

Os polinucleotídeos podem ser obtidos e a sequência 25 nucleotídica dos polinucleotídeos determinada, por qualquer método conhecido na técnica. A sequência nucleotídica de anticorpos imunoespecíficos para um polipeptídeo CD3 pode ser obtida, p. ex., a partir da literatura ou um banco de dados tal como GenBank. Visto que as sequências de aminoácidos, p. ex., de OKT3 humanizado são conhecidas, sequências nucleotídicas que codificam esses anticorpos podem ser

determinadas usando métodos bem conhecidos na técnica, isto é, códons nucleotídicos conhecidos por codificar aminoácidos particulares são montados de maneira a gerar um ácido nucleico que codifica o anticorpo. Tal polinucleotídeo que codifica o anticorpo pode ser montado a partir de 5 oligonucleotídeos quimicamente sintetizados (p. ex., como descrito em Kutmeier *et al.*, 1994, BioTechniques 17: 242), que brevemente, envolvem a síntese de oligonucleotídeos sobrepostos contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, pareamento e ligação desses oligonucleotídeos e então amplificação do oligonucleotídeos ligados por PCR.

10 Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo pode ser gerado a partir de ácido nucleico de uma fonte adequada. Se o clone contendo um ácido nucleico codificando um anticorpo particular não está disponível, mas a sequência do molécula de anticorpo é conhecida, um ácido nucleico codificando a imunoglobulina pode ser sintetizado 15 quimicamente ou obtido a partir de uma fonte adequada (p. ex., uma biblioteca de cDNA de anticorpo, ou uma biblioteca de cDNA gerada a partir de, ou ácido nucleico, de preferência RNA poli A+, isolado a partir de, qualquer tecido ou células expressando o anticorpo, tal como células de hibridoma selecionadas para expressar um anticorpo da invenção) por 20 amplificação de PCR usando iniciadores sintéticos hibridizáveis às extremidade 3' e 5' da sequência ou pela clonagem usando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência gênica particular para identificar, p. ex., um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo. Ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem 25 então ser clonados em vetores de clonagem replicáveis usando qualquer métodos bem conhecido na técnica.

Uma vez que a sequência nucleotídica do anticorpo seja determinada, a sequência nucleotídica do anticorpo pode ser manipulada usando métodos bem conhecidos na técnica para a manipulação de sequências

nucleotídicas, p. e.x, técnicas de DNA recombinante, mutagênese sítio-dirigida, PCR, etc. (veja, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY e Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, que são ambas incorporadas como referência aqui em suas totalidades), para gerar anticorpos que têm diferentes sequências de aminoácidos, por exemplo para criar substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos.

Em uma modalidade específica, uma ou mais das CDRs é inserida em regiões estruturais usando técnicas de DNA recombinante. As regiões estruturais podem ser de ocorrência natural ou regiões estruturais de consenso e de preferência regiões estruturais humanas (veja, p.e x.. Chothia *et al.*, 1998, J Mol Biol 278: 457-479 para uma listagem de regiões estruturais humanas). De preferência, o polinucleotídeo gerado pela combinação das regiões estruturais e CDRs codifica um antícorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo CD3. De preferência, como discutido *supra*, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas dentro das regiões estruturais e de preferência, as substituições de aminoácidos melhoram a ligação do antícorpo a seu antígeno. Adicionalmente, tais métodos podem ser usados para fazer substituições ou deleções de aminoácidos de um ou mais resíduos de cisteína de região variável que participam de uma ligação dissulfeto intracadeia para gerar moléculas de antícorpo que não possuem uma ou mais ligações dissulfeto intracadeia. Outras alterações ao polinucleotídeo são abrangidas pela presente invenção e estão dentro do conhecimento da técnica.

## 25     **5.8 Expressão recombinante de moléculas da invenção**

Uma vez que uma sequência de ácido nucleico codificando moléculas da invenção (isto é, anticorpos) tenha sido obtida, o vetor para a produção das moléculas pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante usando técnicas bem conhecidas na técnica. Métodos que são

bem conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo as seqüências codificantes para as moléculas da invenção e sinais de controle tradicional e transcrecional apropriadas. Esses métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. (Veja, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY e Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY).

Um vetor de expressão compreendendo a sequência nucleotídica de uma molécula identificada pelos métodos da invenção (isto é, um anticorpo) pode ser transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais (p. ex., eletroporação, transfecção de lipossomos e precipitação de fosfato de cálcio) e as células transfectadas são então cultivadas por técnicas convencionais para produzir as moléculas da invenção. Em modalidades específicas, a expressão das moléculas da invenção é regulada por um promotor constitutivo, induzível ou tecido-específico. Em modalidades específicas, o vetor de expressão é pMGX1303.

As células hospedeiras usadas para expressar as moléculas identificadas pelos métodos da invenção podem ser ou células bacterianas tal como *Escherichia coli*, ou, de preferência, células eucarióticas, especialmente para a expressão de molécula de imunoglobulina recombinante inteira. Em particular, células mamíferas tal como células de ovário de criceto chinês (CHO), em conjunto com um vetor tal como elemento promotor de gene inicial intermediário principal de citomegalovírus humano é um sistema de expressão eficaz para imunoglobulinas (Foecking *et al.*, 1998, 45: 101; Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2).

Uma variedade de sistemas de hospedeiro-vetor de expressão pode ser utilizada para expressar as moléculas identificadas pelos métodos da

invenção. Tais sistemas de hospedeiro-expressão representam veículos pelos quais as sequências codificantes das moléculas da invenção podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências codificantes nucleotídicas apropriadas, expressam as moléculas da invenção *in situ*. Essas incluem, mas não estão limitadas a, microorganismos tal como bactérias (p. ex., *E. coli* e *B. Subtilis*) transformadas com vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA plasmidial ou DNA cosmidial contendo sequências codificantes das moléculas identificadas pelos 5 métodos da invenção, levedura (p. ex., *Saccharomyce Pichi*) transformadas com vetores de expressão em levedura recombinante contendo sequências codificantes das moléculas identificadas pelos métodos da invenção, sistemas de células de inseto infectadas com vetores de expressão viral recombinante (p. ex., baculovírus) contendo as sequências codificantes das moléculas 10 identificadas pelos métodos da invenção, sistemas de células vegetais infectadas com vetores de expressão viral recombinante (p. ex., vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e vírus do mosaico da tabaco (TMV) ou transformadas com vetores de expressão plasmidiais recombinantes (p. ex., plasmídeo Ti) contendo sequências codificantes das moléculas identificadas 15 pelos métodos da invenção; ou sistemas de células mamíferas (p. ex., células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfóides (veja US 5.807.715), células Per C.6 (células retinais humanas desenvolvidas por Crucell) abrigando construções de expressão recombinante contendo promotores 20 derivados do genoma de célula mamíferas (p. ex., promotor de metaloproteína) ou de vírus de mamíferos (p. ex., o promotor tardio de adenovírus; o promotor 25 de 7,5K do vírus da vacina).

Em sistemas bacterianos, vários vetores de expressão pode ser vantajosamente selecionados dependendo do uso de destino para a molécula a ser expressa. Por exemplo, quando uma grande quantidade de tal proteína é

para ser produzida, para a geração de composições farmacêuticas de um anticorpo, vetores que direcionam a expressão de altos níveis de produtos de proteína de fusão que são prontamente purificados podem ser desejáveis. Tais vetores incluem, mas não estão limitados a, vetor de expressão de *E. coli* 5 pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO J 2: 1791), em que a sequência que codifica anticorpo pode estar ligada individualmente no vetor em fase com a região que codifica *lacZ* de modo que uma proteína de fusão seja produzida; vetores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989 J Biol Chem 24: 5503-5509) e semelhantes. Vetores 10 pGEX também podem ser usados para expressar polipeptídeos estranhos como proteínas de fusão com glutationa S-transferase (GST). Em geral, tais proteína de fusão são solúveis e podem facilmente ser purificadas de células lisadas por adsorção e ligação a microesferas de matriz de glutationa-agarose seguida pela eluição na presença de glutationa livre. Os vetores pGEX são 15 desenhados para incluir trombina ou sítios de clivagem de protease de fator Xa de modo que o produto de gene alvo clonado possa ser liberado a partir da unidade GST.

Em um sistema de inseto, vírus de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) é usado como um vetor para expressar 20 genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificante de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (p. ex., o gene de poliedrina) do vírus e colocadas sob controle de um promotor de AcNPV (p. ex., o promotor de poliedrina).

Em células hospedeiras de mamíferos, vários sistemas de 25 expressão baseados em vírus podem ser utilizados. Em casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, a sequência codificante de anticorpo de interesse pode ser ligada a um complexo de controle de transcrição/tradução, p. ex., o promotor tardio e sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode então ser inserido no genomas de adenovírus por

recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção em uma região não essencial do genoma viral (p. ex., região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de imunoglobulina em hospedeiros infectados (p. ex., veja Loogen & Shenk, 1984, PNAS 81: 355-359). Sinais de iniciação específicos também podem ser requeridos para tradução eficiente de sequências codificantes de anticorpo inseridas. Esses sinais incluem o códon de início ATG e sequências adjacentes. Além disso, o códon de início deve estar em fase com a fase de leitura da sequência codificante desejada para garantir tradução do inserto inteiro. Esse códons de 10 início e sinais de controle tradicional exógenos podem ser de uma variedade de origens, tanto naturais como sintéticas. A eficiência de expressão pode ser acentuada pela inclusão de elementos acentuadores de transcrição, terminadores de transcrição apropriados, etc (veja Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol, 153: 51-544).

Além disso, pode ser escolhida uma cepa hospedeira que modula a expressão das sequências inseridas ou modifica e processa o produto gênico da maneira específica desejada. Tais modificações (p. ex., glicosilação) e processamento (p. ex., clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes têm 20 mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-tradicional e modificação de proteínas e produtos gênicos. Sistemas hospedeiros ou linhagens de células apropriados podem ser escolhidos para garantir a modificação e processamento corretos da proteína estranha expressa. Para este fim, células hospedeiras eucarióticas que possuem a maquinaria celular para processamento apropriado do transcrito primário, glicosilação e fosforilação do produto gênico podem ser usadas. Tais células hospedeiras mamíferas incluem, mas não estão limitadas a CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, 25 BT20 e T47D, CRL7030 e Hs578Bst.

Para produção de longa duração, de alto rendimento de proteínas recombinantes, a expressão estável é preferida. Por exemplo, linhagens celulares que expressam estavelmente um anticorpo da invenção podem ser engenheiradas. Em vez de usar vetores de expressão que contêm origens quirais de replicação, células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados (p. ex., promotor, acentuador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.) e um marcador selecionável. Após a introdução do DNA estranho, células engenheiradas podem ser cultivada por 1-2 dias em meios enriquecidos e então são trocadas para meios seletivos. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo em seus cromossomos e cresçam para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandido em linhagens de células. Este método pode ser usado vantajosamente para engenheirar linhagens de células que expressam os anticorpos da invenção. Tais linhagens de células engenheiradas podem ser particularmente úteis na triagem e avaliação de compostos que interagem diretamente ou indiretamente com os anticorpos da invenção.

Vários sistemas de seleção podem ser usados, incluindo, mas não limitando a, genes de timidina quinase de vírus de herpes simples (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, 1992 PNAS 48: 202) e adenina fosforribosiltransferase (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22: 817) podem ser empregados em células tk-, hgprt- ou aprt-, respectivamente. Além disso, resistência antimetabólito pode ser usada como a base de seleção dos seguintes genes: dhfr, que confere resistência a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, PNAS 77: 357; O'Hare *et al.*, 1981, PNAS 78: 1527); gpt, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, PNAS 78: 2072); neo, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Clinical Pharmacy

12: 488-505; Wu e Wu, 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932 e Morgan e Anderson, 1993, Ann Rev Biochem 62: 191-217; maio, 1993 TIB TECH 11(5): 155-215). Métodos comumente conhecidos na técnica de tecnologia de DNA recombinante que podem ser usados são descritos em Ausubel *et al.*, (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY e nos capítulos 12 e 13, Dracopoli *et al.*, (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; Colbere-Garapin *et al.*, 1981, J Mol Biol 150: 1; e hygro, que confere resistência a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30: 147).

Os níveis de expressão de um anticorpo da invenção podem ser aumentados por amplificação de vetor (para uma revisão, veja Bebbington a Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, Nova Iorque, 1987). Quando um marcador no sistema de vetor expressando um anticorpo é amplificável, aumento no nível de inibidor presente em uma cultura de células hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador. Visto que a região amplificada está associada com a sequência nucleotídica do anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse *et al.*, 1983, Mol Cell Biol 3: 257).

A célula hospedeira pode ser co-transfetada com dois vetores de expressão da invenção, o primeiro vetor codificando um polipeptídeo derivado de cadeia pesada e o segundo vetor codificando um polipeptídeo derivado de cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos que permitem expressão equivalente de polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Senão, pode ser usado um único vetor que codifica tanto polipeptídeos de cadeia pesada como leve. Em tais situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de

cadeia pesada livre tóxico (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; Kohler, 1980, PNAS 77: 2197). As sequências codificantes para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genômico.

Uma vez que uma molécula da invenção (isto é anticorpos) 5 tenha sido expressa recombinantemente, ela pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para purificação de polipeptídeos ou anticorpos, por exemplo, por cromatografia (p. ex., troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade para o antígeno específico após Proteína A e cromatografia em coluna de peneira molecular), centrifugação, solubilidade 10 diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de polipeptídeos ou anticorpos.

## **6. EXEMPLOS**

### **6.1 Terapia de anticorpo monoclonal anti-CD3 para pacientes tipo 1**

Pacientes: Quarenta pacientes com diabetes tipo 1 são 15 recrutados para participação de acordo com os seguintes critérios: entre 7 e 20 anos de idade, dentro de 6 semanas de diagnóstico de acordo com os critérios da Associação de Diabetes Americana e confirmação da presença de anti-GAD65, anti-ICA512 e/ou autoanticorpos anti-insulina. Os pacientes permanecem sob o cuidado de seus médicos pessoais durante o curso do 20 estudo.

Pacientes elegíveis são aleatoriamente designados para um grupo controle e um grupo de tratamento com anticorpo anti-CD3 humano. Após a randomização, amostras sanguíneas são tomadas para estabelecer 25 níveis de HbA<sub>1c</sub> basais, uma resposta de peptídeo C pré-tratamento a um MMTT é estabelecida em um FPIR para IGTT pré-tratamento é realizado. Pacientes em ambos os grupos são hospitalizados para receber ou um curso de tratamento de 6 dias do anticorpo monoclonal anti-CD3 humano hOKT3γ1(ala-ala) ou placebo. O anticorpo é administrado intravenosamente na seguinte dosagem: 17 µg/m<sup>2</sup> no dia 1, 34,334,3 µg/m<sup>2</sup> no dia 2, 69 µg/m<sup>2</sup>

no dia 3, 137,6 µg/m<sup>2</sup> no dia 4 e 275,3 µg/m<sup>2</sup> nos dias 5 e 6. Senão, o anticorpo pode ser administrado intravenosamente na seguinte dosagem: 1,6 µg/kg/dia no dia 1; 3,2 µg/kg/dia no dia 2; 6,5 µg/kg/dia no dia 3; 13 µg/kg/dia no dia 4 e 26 µg/kg/dia nos dias 5 até 14. Em estudos de aumento progressivo de dose, o tratamento pode ser, p. ex., 1,42 µg/kg/dia no dia 1; 5,7 µg/kg/dia no dia 2; 11 µg/kg/dia no dia 3; 26 µg/kg/dia no dia 4 e 45,4 µg/kg/dia nos dias 5 até 14. Em estudos subsequentes, a terapia é alterada para aumentar a dosagem e/ou diminuir o curso de tempo de tratamento. Por exemplo, em estudos subsequentes aos pacientes pode ser administrado um tratamento de 4 dias: 6,4 µg/kg/dia no dia 1; 13 µg/kg/dia no dia 2 e 26 µg/kg/dia nos dias 3 e 4; durante estudos de aumento progressivo de dose adicionais, o tratamento pode ser de 8 µg/kg/dia no dia 1; 16 µg/kg/dia no dia 1 e 32 µg/kg/dia nos dias 3 e 4.

Durante estudos iniciais a dosagem de anticorpo nos primeiros tr~es dias de tratamento é administrada através de infusão lenta IV por 20 horas para monitorar reações adversas. Estudos subsequentes diminuirão o tempo de administração e/ou dividirão a dosagem em 2 até 4 partes equivalentes a serem administradas como injeções bolus uniformemente distribuídas no curso de 12 horas. Pacientes no grupo controle sofrem testes metabólicos e imunológicos, mas não recebem anticorpos monoclonais. Pacientes são monitorados durante todo o estudo para efeitos imunossupressivos do anticorpo monoclonal anti-CD3 humano hOKT3γ1(ala-ala).

Pacientes são monitorados por 18 meses após o tratamento. A função de célula β é determinada a cada 6 meses no caso de tolerância a glicose prejudicada e a cada 12 meses no caso de tolerância a glicose normal. Permite-se que pacientes tenham um dieta normal e permaneçam sob cuidado de seus médicos pessoais durante toda a duração do estudo. Ensaios imunológicos são repetidos em intervalos de 6 meses. Terapia de insulina será

dada à pacientes conforme direcionado por seus médicos pessoais.

A função de célula  $\beta$  será analisada de acordo com as alterações dos níveis de peptídeo C conforme medido por radioimunoensaio. Após amostrar serem tiradas para peptídeo C e glicose basais, aos pacientes é dada uma refeição mista. Os níveis de peptídeo C são medidos em amostras tomadas após 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240. A resposta de peptídeo C ao teste de tolerância a refeição mista (MMTT) é expressa como a área total sob a curva de resposta (AUC). Um alteração na resposta é considerada como tendo ocorrido se a resposta diferir por mais de 7,5 por cento da resposta na entrada do estudo. As respostas de peptídeo C dos pacientes a MMTT são continuamente monitoradas 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses e 18 meses após o tratamento. Senão, a função de célula  $\beta$  é avaliada por FPIR a IGTT. Níveis de insulina sérica são medidos por uma modificação de um método de radioimunoensaio de anticorpo duplo usando tirosina monoiodetada A14-insulina marcada (Amersham Pharmacia). FPIR é calculada como a soma de níveis de insulina em 1 e 3 minutos após uma carga de glicose (0,5 g/kg). Níveis de hemoglobina glicosilada são medidos por teste de inibição de aglutinação de látex.

Monitoramento imunológico: O nível de autoanticorpo contra GAD65, IA2/ICA512 e insulina são medidos com ensaios de radioligação como conhecido na técnica (p. ex., Woo *et al.*, 2000, J Immunol Methods 244: 91-103). Genotipagem de HLA-DQA e HLA-DQB é realizada por sequenciamento direto de polimorfismos do exon 2 após amplificação por PCR. O nível de citocinas no soro após a administração do anticorpo monoclonal é medido por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). A produção de anticorpos anti-idiotípicos é monitorada por ensaio de ELISA usando hOKT3 $\gamma$ 1(ala-ala) ligado em placa ou por citometria de fluxo para medir bloqueio de ligação de hOKT3 $\gamma$ 1(ala-ala)-FITC a CD3.

Análise estatística: Análise de dados será conduzida em função

de célula beta residual, nível de autoanticorpo, nível de citocina e nível de hemoglobina glicosilada. Uma análise de  $\chi^2$  será realizada para testar o efeito de tratamento com fármaco antes e após administração de fármaco. A comparação entre o grupo controle e o grupo de tratamento será feita com o teste U de Mann-Whitney.

## 6.2 Terapia de anticorpo monoclonal anti-CD3 em indivíduos predispostos a diabetes tipo 1

Pacientes: Triagem de indivíduos com predisposição para desenvolver diabetes tipo 1 é baseada em relação de primeiro ou segundo grau com um diabético tipo 1 diagnosticado; um nível de glicose em jejum prejudicado; uma resposta de glicose a OGTT prejudicada; a presença de autoanticorpos séricos contra GAD65, contra IA2/ICA512 e/ou contra insulina; ou produção de insulina prejudicada após MMTT, OGTT, IGTT ou procedimento de grampo de glicose em duas fase como determinado por resposta de peptídeo C ou FPIR. Pacientes que foram diagnosticados com diabetes tipo 1 de acordo com os critérios estabelecidos pela Associação de Diabetes Americana por um médico, ou que de outro modo satisfazem os citados critérios, são excluídos deste estudo.

Pacientes selecionados para o estudo são aleatoriamente colocados em dois grupo de tamanhos iguais. Os protocolos de tratamento e monitoramento clínico são conforme descrito na seção 6.1. Adicionalmente, terapia de anticorpo pode ser ajustada em relação à função de célula  $\beta$  residual, isto é, pacientes com mais função de célula  $\beta$  prejudicada como determinado por resposta de peptídeo C ou FPIR receberão uma dose total maior de anticorpo monoclonal anti-CD3. Por exemplo, dados dois pacientes com respostas de peptídeo C de 40 e 110 pmol/mL/240min, ao paciente com resposta prejudicada será dada a maior das duas dosagens testada, p. ex., 1,42  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  no dia 1; 5,7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  no dia 2; 11  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  no dia 3; 26  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  no dia 4 e 45,4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  nos dias 5 até 14.

Pacientes são monitorados por 18 meses após o tratamento. A função de célula  $\beta$  é determinada a cada 6 meses no caso de tolerância a glicose prejudicada e a cada 12 meses no caso de tolerância a glicose normal. Permite-se que pacientes tenham um dieta normal e permaneçam sob cuidado de seus médicos pessoais durante toda a duração do estudo. Ensaios imunológicos são repetidos em intervalos de 6 meses. Terapia de insulina será dada à pacientes conforme direcionado por seus médicos pessoais.

### **6.3 Terapia de anticorpo monoclonal anti-CD3 em esclerose múltipla**

Pacientes: Pacientes com esclerose múltipla reincidente-remitente ou progressiva secundária, confirmados de acordo com critérios de Poser e/ou McDonald são incluídos neste estudo. Critérios de seleção primária também incluem pelo menos duas exacerbações documentadas nos últimos dois anos, idade de 18 ou acima e pontuação EDSS basal entre 0 e 5.

Os pacientes selecionados são aleatoriamente designados em um grupo de tratamento e um grupo controle. Protocolos de tratamento são como delineados na seção 6.1. Todos os pacientes permanecem sob o cuidado de seus médicos pessoais durante toda a duração do estudo e recebem monitoramento neurológico equivalente em pontos de tempo equivalentes.

Monitoramento de MS: Exames neurológicos são programadas antes do tratamento para estabelecer valores basais e subsequentemente a cada três meses por um total de 36 meses. A avaliação clínica do paciente é realizada por dois neurologistas para monitorar aumentos na frequência, duração e/ou gravidade de ataques e/ou monitorar aumentos em pontuação EDSS. Adicionalmente, varreduras de MRI acentuadas por gadolinio são realizadas para obter medição basal de volume e/ou número de lesões cerebrais e espinhais e são repetidas a cada três meses por um total de 36 meses. Pacientes permanecem sob o cuidado de médicos pessoais) durante o curso do estudo. Pacientes com reincidência são tratados com Avonex e reexaminados em intervalos mensais por um período de pelo menos 6 meses.

Um aumento de um ponto na EDSS que persiste por pelo menos dois exames neurológicos programados indica progressão de desabilidade. A eficácia do tratamento é avaliada de acordo com o tempo da primeira reincidência, taxa de reincidência e acúmulo de desabilidade física permanente. A comparação será feita entre o grupo de tratamento e o grupo controle. A extensão e número de lesões ativas em MRI também será registrada e comparada.

## 7. EQUIVALENTES

Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar usando não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas aqui. Tais equivalentes destinam-se a serem abrangidos pelas seguintes reivindicações.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionadas neste relatório descritivo são aqui incorporadas como referência no relatório descritivo na mesma extensão conforme se cada publicação, patente ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado aqui como referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Macrogenics, Inc.

<120> **Métodos para o tratamento de distúrbios autoimunes usando anticorpos monoclonais imunossupressores com toxicidade reduzida**

<130> 13783-105002

<140>

<141>

<150> 60/813,908

<151> 2006-06-14

<150> 60/871,361

<151> 2006-12-21

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequencia Artificial

<220>

<223> região variável de Okt3vl de cadeia leve humanizada

<400> 1

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

<210> 2

<213> Seqüênciá artifício

<220>

<223> Domínio variável de cadeia leve de REI

<400> 2

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gta - domínio variável de cadeia leve de um Dkt3vl  
humanizado

<400> 3

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

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

**<213> Sequência artificial**

&lt;220&gt;

<223> gLC - domínio variável de cadeia leve de um Okt3vl  
humanizado

&lt;400&gt; 4

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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Região variável de Okt3vh de cadeia pesada humanizada

&lt;400&gt; 5

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	Tyr
						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	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
						50		55			60				
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	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	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
							100			105				110	
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									
						115									

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

<213> Secuencia artificial

4220

<223> domínio variável de cadeia leve de KOL

5400 6

```

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

```

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gH - domínio variável de cadeia pesada de um Okt3vh  
humanizado

<400> 7

<210> 8  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> gHA - domínio variável de cadeia pesada de um Okt3vh humanizado

<400> 8  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1               5               10               15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
20               25               30  
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35               40               45  
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val  
50               55               60  
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Lys Ser Lys Ser Thr Ala Phe  
65               70               75               80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85               90               95  
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100              105              110  
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 9  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> gHG - domínio variável de cadeia pesada de um Okt3vh  
humanizado

<400> 9  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1               5               10               15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
20               25               30  
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35               40               45  
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val  
50               55               60  
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe  
65               70               75               80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
85               90               95  
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100              105              110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 10  
<211> 699  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de nucleotídeo da cadeia leve de um OKT3  
humanizado

<400> 10  
atgggatgga gctgttatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60  
atccagatga cccagtctcc ttctttctcg tctgtttctg tcggagacag agtcacaatc 120  
acatgttctg cttcttagctc tgcgtttcac atgaacttgt accaggac acctggaaag 180  
gctcctaagg ggtggatcta cgacacatct aagtcgttt ctggagtccc ttcttagatcc 240  
tctggttctg gctctggaaac agactacaca ttcacaatct cttctctcca acctgaggac 300  
atcgctacat actactgccaa acagtggctc agcaatctt tcacattcg acagggaaaca 360  
aagctgcaga tcacaagaac tggggggcgc cggctgtct tcatacttccc gccatctgtat 420  
gaggcaggta aatctggaaac tgccctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 480  
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gcccctccaat cgggttaactc ccaggagagt 540  
gtcacagagc agacacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 600  
aaagcagact acgagaaaaca caaatctac gcctgcgaag tcaccatca gggcctgagc 660  
tcgccccgtca caaagagctt caacagggga gagtgtag 699

<210> 11  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Sequência de aminoácidos da cadeia leve de um  
OKT3 humanizado

<400> 11  
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15  
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
20 25 30  
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val  
35 40 45  
Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg  
50 55 60  
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
65 70 75 80  
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu  
85 90 95  
Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn  
100 105 110  
Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Val

115	120	125
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
130	135	140
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
145	150	155
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
165	170	175
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
180	185	190
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
195	200	205
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
210	215	220
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	

<210> 12

<211> 1407

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de nucleotídeos da cadeia pesada de um  
OKT3 humanizado

<400> 12

```

atgggatgga gctgttatcat ccttttcttg gtagcaacag ctacagggtgt ccactcccaag 60
gttcagctgg tgcagtctgg aggaggagtc gtccagcctg gaaggtccct gagactgtct 120
tgttaaggctt ctggatacac cttcaactaga tacacaatgc actgggtcag acaggctcct 180
ggaaaggggac tcgagtggtat tggatacatt aatccctagca gaggttatac taactacaat 240
cagaaggtga aggacagatt cacaatttct agagacaatt ctaagaatac agccttcctg 300
cagatggact cactcagacc tgaggatacc ggagtctatt ttgtgtctag atattacgt 360
gaccactact gtctggacta ctggggccaa ggtaccccggt tcaccgttag ctcagcttcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gtcgtctgtt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtgaaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cggtcacacc ttcccggtctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccg tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttaa gcccaaatct 720
tgtgacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aggccgcggg aggaccatca 780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 840
acatgcgtgg tggtgacgt gaccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
aaagggcagg cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccggga tgagctgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
ggaaacgtct tctcatgttc cgtgatgtcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1407

```

<210> 13  
<211> 468  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de um  
OKT3 humanizado

<400> 13  
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1               5               10               15  
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
20               25               30  
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35               40               45  
Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50               55               60  
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn  
65               70               75               80  
Gln Lys Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
85               90               95  
Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val  
100              105              110  
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp  
115              120              125  
Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
130              135              140  
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
145              150              155              160  
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165              170              175  
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180              185              190  
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195              200              205  
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
210              215              220  
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
225              230              235              240  
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
245              250              255  
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
260              265              270  
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
275              280              285  
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
290              295              300  
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
305              310              315              320  
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
325              330              335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
340 345 350  
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
355 360 365  
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
370 375 380  
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
385 390 395 400  
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
405 410 415  
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
420 425 430  
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
435 440 445  
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
450 455 460  
Ser Pro Gly Lys  
465

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo humano anti-CD3 que tem pelo menos 50% de ligação reduzida a pelo menos um Fc $\gamma$ R em relação a um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de ser para a 5 preparação de um medicamento para tratar, diminuir a progressão ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune em um paciente diagnosticado com o dito distúrbio, em que a administração do dito medicamento resulta em sintomas reduzidos de liberação de citocina em 10 relação a uma administração equivalente de OKT3 de murino, e em que menos do que 9000  $\mu$ g/m<sup>2</sup>, ou o equivalente farmacológico de menos do que 9000  $\mu$ g/m<sup>2</sup> de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) intravenosamente administrado, é 15 administrado no dito curso de tratamento.

2. Uso de um anticorpo humano anti-CD3 que tem pelo menos 50% de ligação reduzida a pelo menos um Fc $\gamma$ R em relação a um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de ser para a 20 preparação de um medicamento para prevenir ou retardar o início de um distúrbio autoimune em um paciente predisposto ao mesmo, mas não diagnosticado com o dito distúrbio, em que a administração do dito medicamento resulta em sintomas reduzidos de liberação de citocina em 25 relação a uma administração equivalente de OKT3 de murino, e em que menos do que 9000  $\mu$ g/m<sup>2</sup>, ou o equivalente farmacológico de menos do que 9000  $\mu$ g/m<sup>2</sup> de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala) intravenosamente administrado, é administrado no dito curso de tratamento.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado 25 pelo fato de que o anticorpo humano anti-CD3 tem pelo menos 50% de ligação reduzida a cada Fc $\gamma$ R em relação a um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo não liga detectavelmente a nenhum Fc $\gamma$ R.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo tem pelo menos 50% de ligação reduzida a C1q.

5 6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo não liga detectavelmente a C1q.

7. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo anti-CD3 é quimérico ou humanizado.

10 8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é uma versão humanizada ou quimerizada de OKT3, Leu-4, 500A2, CLB-T3/3, M291, YTH 12.5 ou BMA030.

9. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é aglicosilado.

15 10. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo tem um domínio Fc tendo uma modificação de aminoácido, em que o dito domínio Fc modificado não se liga a nenhum FcγR.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é OKT3γ1 ala-ala humanizado.

20 12. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é ChAgyCD3 ou visilizumab.

13. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento compreende a administração de doses do dito anticorpo pelo menos por 4 dias consecutivos.

25 14. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o dito curso de tratamento compreende a administração de doses do dito anticorpo em não mais do que 14 dias consecutivos.

15. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que no dito curso de tratamento o dito anticorpo é administrado em 4 dias consecutivos, seguido por 3 dias consecutivos em que nenhum anticorpo

é administrado, seguido por 4 dias consecutivos em que anticorpo é administrado, e assim por diante até que o número total de doses seja administrado.

16. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento compreende um regime de dosagem que compreende doses de quantidades crescentes do dito anticorpo pelo menos nos 3 dias iniciais do dito curso de tratamento.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as ditas doses aumentam 2 vezes a cada dia pelo menos nos 3 dias iniciais do dito curso de tratamento.

18. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito regime de dosagem é de 5 dias ou menos.

19. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dose no dia 1 é de aproximadamente  $51 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , a dose no dia 2 é de aproximadamente  $103 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , a dose no dia 3 é de aproximadamente  $207 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , a dose no dia 4 é de aproximadamente  $413 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , e a dose nos dias subsequentes é de aproximadamente  $826 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou o equivalente farmacológico da administração intravenosa destas quantidades de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala).

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito regime de dosagem é de 6 dias ou menos.

21. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dose no dia 1 é de aproximadamente  $17 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , a dose no dia 2 é de aproximadamente  $34,3 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , a dose no dia 3 é de aproximadamente  $69 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , a dose no dia 4 é de aproximadamente  $137 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , e a dose nos dias subsequentes é de aproximadamente  $275 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ou o equivalente farmacológico da administração intravenosa destas quantidades de OKT3 $\gamma$ 1 (ala-ala).

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo

fato de que o dito regime de dosagem é de 6 dias ou menos.

23. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito curso de tratamento alcança um revestimento e modulação de receptor de célula T combinados de pelo menos 50%.

5 24. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é intravenosamente administrado.

25. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é administrado em uma infusão em um período de pelo menos 18 horas.

10 26. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita administração resulta em níveis de anticorpo humano anti-CD3 livre que não excedem 200 ng/ml.

15 27. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a redosagem do dito paciente com uma segunda rodada do dito curso de tratamento pelo menos 2 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

20 28. Uso de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a dita segunda rodada do dito curso de tratamento é administrada pelo menos 3 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

29. Uso de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o paciente é redosado a cada dois anos.

30. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dita administração está em combinação com a 25 administração de um imunossupressor.

31. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune é a diabetes Tipo 1.

32. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune é a esclerose múltipla.

33. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito paciente é redosado se a dose diária média de insulina diminuiu em 50% ou mais pelo menos 2 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

5           34. Uso de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato de que o dito paciente é redosado se autoanticorpos contra um ou mais抗ígenos de célula da ilhota são detectados no dito paciente pelo menos 2 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

10          35. Uso de acordo com a reivindicação 31 caracterizado pelo fato de que o dito paciente é redosado se células T específicas do antígeno de célula da ilhota são detectadas no dito paciente pelo menos 2 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

15          36. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito paciente é redosado se a massa de célula  $\beta$  diminui em 50% ou mais no dito paciente pelo menos 2 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

20          37. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito paciente é redosado se a incidência de episódios hipoglicêmicos ou de cetoacidose aumenta em 1 ou mais incidentes por dia no dito paciente pelo menos 2 anos depois da administração inicial do dito curso de tratamento.

25          38. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento resulta em um aumento na dose diária média de insulina de não mais do que 0,2 U/kg/dia seis meses depois da administração do dito tratamento.

39. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento resulta em um HA1c de menos do que 7,5% um ano depois do dito tratamento.

40. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo

fato de que o dito tratamento resulta em uma resposta de peptídeo C à MMTT doze meses depois do dito tratamento, isto é, pelo menos 90% da resposta de peptídeo C ao MMTT no dito paciente antes do dito tratamento.

41. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento resulta em um aumento no número total ou área total de lesões como determinado pela MRI em não mais do que 10% doze meses depois do tratamento.

42. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento não resulta em nenhum aumento no número total ou área total de lesões em relação aos níveis de pré-tratamento como determinado pela MRI doze meses depois do tratamento.

43. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento não resulta em nenhum aumento na contagem de EDSS durante os doze meses a seguir do tratamento.

44. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é administrado intramuscular ou subcutaneamente.

45. Uso de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita administração está em combinação com a administração de insulina.

46. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dita administração não resulta em doenças linfoproliferativas induzidas por EBV ou contagens de linfócito menores do que 1000 linfócitos/ $\mu$ l de soro.

47. Uso de um anticorpo humano anti-CD3 que tenha pelo menos 50% de ligação reduzida a pelo menos um Fc $\gamma$ R do que um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de ser para preparação de um medicamento para tratar, diminuir a progressão, ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio autoimune em um paciente

diagnosticado com o dito distúrbio autoimune, em que dito medicamento é cronicamente administrado ao dito paciente, e em que a dita administração resulta em sintomas reduzidos de liberação de citocina em relação a uma administração equivalente de OKT3 de murino.

5           48. Uso de um anticorpo humano anti-CD3 que tem pelo menos 50% de ligação reduzida a pelo menos um Fc $\gamma$ R do que um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para prevenir ou retardar o início de um distúrbio autoimune em um paciente predisposto ao mesmo, mas não  
10 diagnosticado com o dito distúrbio autoimune, em que o dito medicamento é cronicamente administrado ao dito paciente, e em que dita administração resulta em sintomas reduzidos de liberação de citocina em relação a uma administração equivalente de OKT3 de murino.

15           49. Uso de acordo com a reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune é a diabetes Tipo 1.

50. Uso de acordo com a reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune é a esclerose múltipla.

20           51. Uso de acordo com a reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que o dito paciente foi administrado com um curso de 6 a 20 dias de tratamento com os ditos anticorpos humanos anti-CD3 antes da dita administração crônica.

25           52. Uso de acordo com as reivindicações 1, 2, 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune é psoríase, artrite reumatóide, lúpus, doença do intestino inflamatória (IBD), colite ulcerativa, doença de Crohn, esclerose múltipla, efeitos de transplante de órgão ou doença do enxerto vs. hospedeiro (GVHD).

53. Uso de um anticorpo humano anti-CD3 que tem pelo menos 50% de ligação reduzida a pelo menos um Fc $\gamma$ R em relação a um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de

ser para a preparação de um medicamento para tratar, diminuir a progressão, ou melhorar um ou mais sintomas de esclerose múltipla em um paciente diagnosticado com esclerose múltipla, em que a dita administração resulta em sintomas reduzidos de liberação de citocina em relação a uma administração 5 equivalente de OKT3 de murino.

54. Uso de um anticorpo humano anti-CD3 que tenha pelo menos 50% de ligação reduzida a pelo menos um Fc $\gamma$ R em relação a um anticorpo com um domínio Fc do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para prevenir ou retardar o início 10 de esclerose múltipla em um paciente predisposto à mesma, mas não diagnosticado com esclerose múltipla, em que a dita administração resulta em sintomas reduzidos de liberação de citocina em relação a uma administração equivalente de OKT3 de murino.

	1	10	20	30	40	50	60
Okt3v1	QIVLTQSPAIMSAASPGKEVITMTCASS-	SYSYMWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGWPA					
REI	DIGMTQSPSSLSASVGDRVTITCOASDIIKYLNWYQQTPGKA <del>P</del> KLIYEASNLOAGVPS						
gLA	.....	<u>SA.S-SVS.M.</u>	.....	.....	.....	.....	DL.K.AS.....
gLC	.....	<u>SA.S-SVS.M.</u>	.....	.....	.....	.....	<u>RW</u> . DL.K.AS.....
	70	80	90	100	108		
Okt3v1	HFRGSGSGTYSLTISGM	EAEDAATYYCQWMISSNPETFGSGTKLEINR	(SEQ ID NO:1)				
REI	RFSGSGSGTDYTFITISSLQ	PEDIATYYCQYOSLPYTFGQGTLQITR	(SEQ ID NO:2)				
gLA	.....	<u>MS.N.E.</u>	.....	.....	.....	.....	(SEQ ID NO:3)
gLC	.....	.....	.....	.....	.....	.....	(SEQ ID NO:4)

FIG. 1A

1	10	20	30	40	50	a	60
Okt3vh	QWQLQQSGAELARP GAS YKMSCKASGGYTFTRYTMHWKQRP GQGLEWIGYINPSRGYIYN						
KOL	QWQLVESGGGVWQGRSLRLCSSSGFIFSSYAMYYWRQAPGKGLEWAIIWQDGSDQHVA						
gH	..... <u>YI</u> . <u>IR.IH</u> .....						<u>Y.NPSRGYIYN</u>
gHA	..... <u>Q</u> ..... <u>KA</u> . <u>YI.R.IH</u> .....						<u>IGY.NPSRGYIYN</u>
gHG	..... <u>Q</u> ..... <u>KA</u> . <u>YI.R.IH</u> .....						<u>IGY.NPSRGYIYN</u>
70	80	abc	90	100	abcd	efghi	110
Okt3vh	QKEKDKATLTTDKSSSTAYHQSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCL.....						DYMGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:5)
KOL	DSVKGRTTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGYYFCARDGGHFCSSASCEGPDYMGQGTPTVSS						(SEQ ID NO:6)
gH	QKE.D.....						YDDHHYL.....
gHA	QK.Q..... <u>I.K.S.A</u> .....						<u>A.Y</u> .....
gHG	QK.D..... <u>A</u> .....						<u>A</u> .....

FIG. 1B

**Sequência nucleotídica de cadeia leve de OKT3y1**

```

ATGGGATGGAGCTGTATCATGCCCTTCCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCACACTCCGACATCCA
GATGACCCAGTCTCCCTCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTTACATGAACCTGGTACCGAGACACCTGGAA
CTTCTAGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCT
GATCTACGACACATCTAAGCTGGCTCTGGAGTCCCCTCTGGAGTCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCT
CAGACTACACATTCAAACTCAGAACATCTCTCTCCAAACCTGAGGACATCGCTACATACTACTGCACACAG
TGGTCTAGCAATCCTTCAACATTGGACAGGGAAACAAAGCTGCAGATCACAAAGAACTGTGGGG
CGCCGCTGTCTCATCTTCCGCACTCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAACTGCCTCTGTTGTTG
TGCCCTGCTGAATAACTCTATCCCGAGGGCAAAGTACAGTGGAGGTGATAACGCCCTCC
AATCGGGTAACTCCCAGGAGGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCCGTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTGCCCCGTGACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAG

```

**FIG. 2A****Seqüência de aminoácidos de cadeia leve de OKT3y1**

```

MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSAVYQDRVTITCSASSSVSYMNVWYQQTP
GKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSRGSGSGTDYTFISSLQPEDIAFYCQQWSSNPFTF
GQGTKLQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDKDSTSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

```

**FIG. 2B**

**Seqüência nucleotídica de cadeia pesada de OKT3γ1(ala-ala)**

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTTCA  
 GCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGAGTCGTCAGCCTGGAAAGGTCCCTGAGACTGTCTTGTAAAGC  
 TTCTGGATACACCTTCACTAGATAACAATGCACTGGGTCAAGACAGGCTCCTGGAAAGGGACTC  
 GAGTGGATTGGATACATTAATCCTAGCAGAGGTATACTAACTACAATCAGAAGGTGAAGGACAG  
 ATTACAATCTAGAGACAATTCTAAGAATAACAGCCTTGCAGATGGACTCACTCAGACCTGA  
 GGATACCGGAGTCTATTGGTAGATATTACGATGACCACACTGTCTGGACTACTGGGCC  
 AAGGTACCCCGGTACCGTGAGCTCAGCTTCCACCAAGGGCCATGGTCTTCCCCCTGGCAC  
 CCTCTCCAAGAGCACCCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC  
 CCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCCCTGACCAAGCGGGGTGCACACCTTCCC  
 CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTT  
 GGGCACCCAGACACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA  
 GTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCCCAGCACCTGAGGCCGCG  
 GAGGACCATCAGTCTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCC  
 TGAGGTACATCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTA  
 CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGGAGCAGTACAACAGCAC  
 GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA  
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAG  
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCGACGACATGCCGTGGAGTGGAGAGC  
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTC  
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACTGCTTCTCATGCT  
 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACCGCAGAAGAGCCTCCCTGTCTCCGGTAA  
 ATGA

**FIG. 2C**

**Seqüência de aminoácidos de cadeia pesada de OKT3γ1(ala-ala)**

MGWSIILFLVATATGVHSQVQLVSGGGVVQPGRLSLSCKASGYTFTRYTMHWV  
 RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVY  
 FCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD  
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGGSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
 IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEAL  
 HNHYTQKSLSPGK

**FIG. 2D**

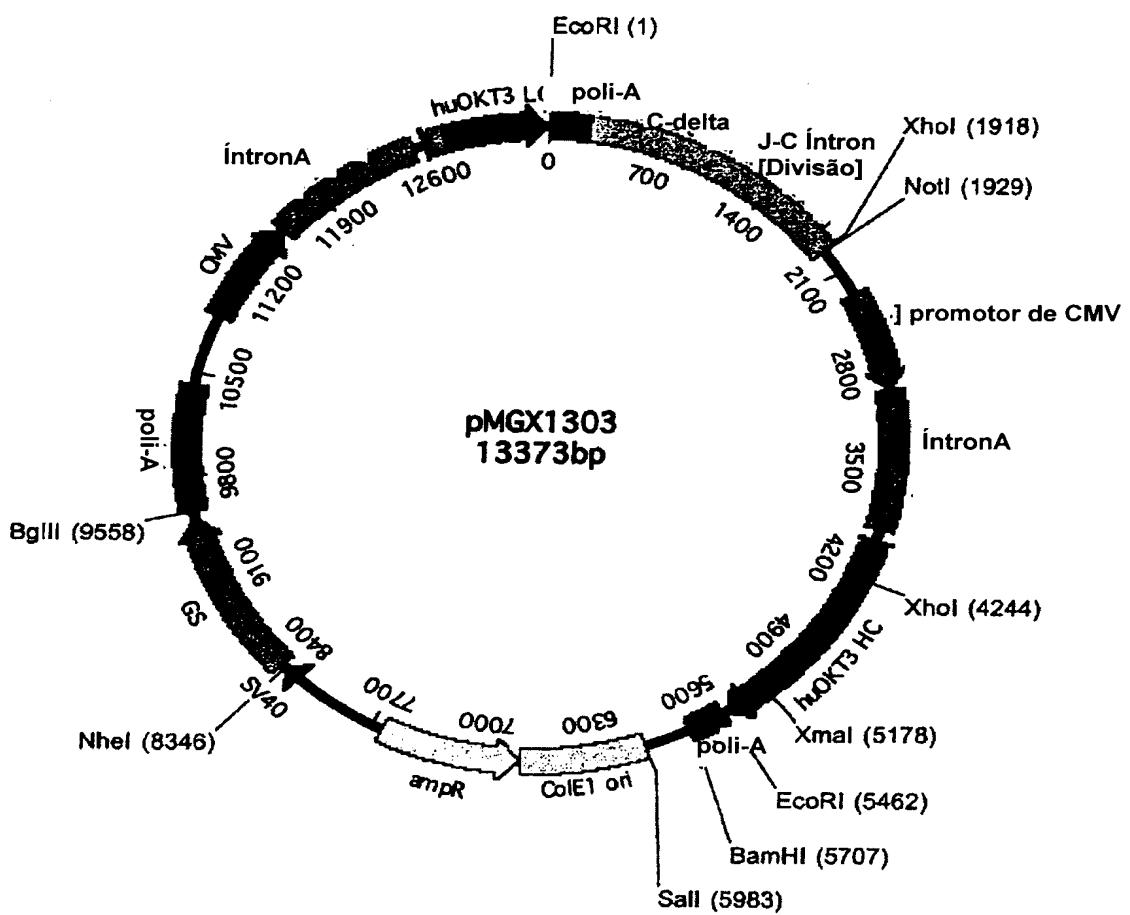


FIG. 4

## RESUMO

### **“USO DE UM ANTICORPO HUMANO ANTI-CD3”**

A presente invenção fornece métodos de tratar, prevenir, diminuir a progressão, ou melhorar os sintomas de doenças imunológicas mediadas pela célula T, particularmente doenças autoimunes (por exemplo, diabetes autoimune (isto é, diabetes tipo 1 ou diabetes melito dependente de insulina (IDDM)) e esclerose múltipla) através do uso de anticorpos humanos anti-CD3. Os anticorpos da invenção são preferivelmente usados em regimes de dosagem de dose baixa, regimes de dosagem crônica ou regimes que envolvem a redosagem depois de um certo período de tempo. Os métodos da invenção fornecem a administração de anticorpos que especificamente se ligam à subunidade épsilon dentro do complexo CD3 humano. Tais anticorpos modulam a interação de aloantígeno/receptor de célula T e, assim, regulam a citotoxicidade mediada pela célula T associada com distúrbios autoimunes. Adicionalmente, os métodos da invenção fornecem o uso de anticorpos humanos anti-CD3 modificados tal que eles exibem função efetora reduzida ou eliminada e ativação de célula T quando comparado com anticorpos humanos anti-CD3 não modificados.