República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020018539-6 A2

(22) Data do Depósito: 22/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/12/2020

(54) Título: ANTICORPOS CONTRA MICA E/OU MICB E USOS DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/05/2018 US 62/667,170; 23/03/2018 US 62/647,556.

(71) Depositante(es): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY.

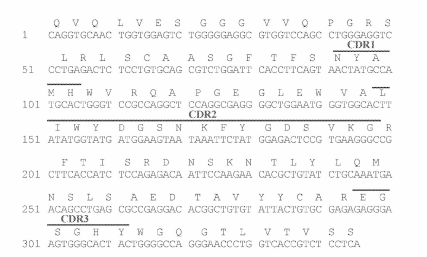
(72) Inventor(es): MICHELLE RENEE KUHNE; ALAN J. KORMAN; HAICHUN HUANG; YIMING YIN; ROBERT F. GRAZIANO; NATALIE A. BEZMAN; PAVEL STROP; RICHARD Y. HUANG; GUODONG CHEN; MOHAN SRINIVASAN; PETER SUNG KEUN LEE; GAMZE OZLEM CAMDERE.

(86) Pedido PCT: PCT US2019023693 de 22/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/183551 de 26/09/2019

(85) Data da Fase Nacional: 11/09/2020

(57) Resumo: ANTICORPOS CONTRA MICA E/OU MICB E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a anticorpos que se ligam especificamente a MICA/B humano e métodos de uso dos mesmos. Em alguns aspectos, a descrição é direcionada a métodos de tratamento de um câncer em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo anti-MICA/B.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS CONTRA MICA E/OU MICB E USOS DOS MESMOS".**

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS ENVIADA ELETRONICAMENTE VIA EFS-WEB

[001] O conteúdo da listagem de sequência enviada eletronicamente em arquivo de texto ASCII (Nome: 3338_101PC02_Seqlisting_ST25.txt; Tamanho: 154.660 bytes; e Data de Criação: 18 de março de 2019) depositado com o pedido é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA DESCRIÇÃO

[002] O complexo principal de histocompatibilidade relacionado com a cadeia de classe I A e B (MICA/B) são proteínas de superfície celular altamente polimórficas relacionadas com glicoproteínas de MHC classe I. Elas contêm três domínios extracelulares (α1, α2 e α3), uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática e atuam como ligante para estimular um receptor de ativação, NKG2D, expresso em células NK, γδ T, CD8+ αβ T e NKT. Normalmente, MICA/B são expressos constitutivamente em baixos níveis nas células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e mieloides. No entanto, eles são regulados positivamente ou expressos de novo em condições de estresse, como durante a carcinogênese, infecções, resposta a danos no DNA e em condições autoimunes. Como tal, a expressão de MICA/B serve como um sinal de estresse celular, e o envolvimento de NKG2D por MICA/B ativa células NK e coestimula células T, resultando em funções efetoras imunes, como citotoxicidade e produção de citocinas. Bauer, Science 1999; 285: 727-9. Diefenbach *et al*., Nat Immunol. 2000; 1: 119-26. Groh *et al*., Nat Immunol. 2001; 2: 255-60. As células tumorais, no entanto, têm mecanismos para prevenir a resposta mediada por NKG2D pela clivagem de MICA/B da superfície celular, resultando na redução da densidade de superfície de MICA/B e na geração de MI-

CA/B solúvel (sMICA/B), que subregula NKG2D em células efetoras citotóxicas. Groh *et al*., Nature 2002; 419: 734-8. Salih, J. Immunol. 2002; 169: 4098-4102. Em células tumorais, o domínio α3 de MICA/B interage com uma dissulfeto isomerase/chaperona, proteína 5 do retículo endoplasmático (ERp5), para induzir uma mudança conformacional que permite a clivagem de MICA/B por proteases incluindo desintegrina e metaloproteinases, ADAM10 e ADAM17. Kaiser, Nature 2007; 447: 482-6.

[003] Atualmente, cerca de 100 alelos MICA que codificam 79 variantes de proteínas e 40 alelos de MICB que codificam 26 variantes de proteínas foram identificados (European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) Immuno Polymorphism Database: https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt /hla/stats.html (acessado em 08 de dezembro de 2017)). A expressão de MICA/B foi relatada em uma ampla gama de tipos de tumor, com alta expressão associada a mau prognóstico. Spear, Cancer Immunity 2013; 13. Ghadially *et al*., Br. J. Cancer 2017; 116: 1208-17. Uma vez que a exposição prolongada a altas concentrações de sMICA demonstrou reduzir a atividade de NKG2D em células T CD8 e NK, a geração de sMICA/B foi considerada um mecanismo de escape imune do tumor. Groh *et al*., Nat. Immunol. 2001; 2: 255-60. Salih, J. Immunol. 2002; 169: 4098-4102. As proteínas sMICA/B foram identificadas em muitos tipos de tumor humano, incluindo melanoma, pulmão, cólon, ovário, mama, próstata e mieloma. Zhang *et al*., Sei. Adv. 2017; 3: e1602133. Os níveis de sMICA correlacionados com baixa sobrevida em pacientes com melanoma metastático tratados com anticorpo anti-CTLA-4, ipilimumabe. Koguchi, Cancer Res. 2015; 75: 5084-92. Além disso, os pacientes com melanoma que respondem ao ipilimumabe mostraram gerar anticorpos anti-MICA/B induzidos pela terapia; alguns desses pacientes experimentaram diminuições nos níveis de sMICA e demonstraram evidência clíni-

ca de atividade antitumoral. Zhang *et al*., Sei. Adv. 2017; 3: e1602133. Jinushi, PNAS. 2006; 103: 9190-9195.

[004] A extensão em que os vírus e tumores desenvolveram mecanismos para evitar a detecção por NKG2D indica que estratégias terapêuticas para restaurar ou realçar a ativação dependente de NKG2D de células NK e T podem ser benéficas. Portanto, há uma necessidade de gerar e selecionar anticorpos anti-MICA/B que se liguem à região proximal ao sítio de ligação ERp5 em MICA/B e/ou reter MICA/B na superfície celular para que ela possa se engajar produtivamente em NKG2D, levando à atividade antitumoral realçada em pacientes.

SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

[005] Um aspecto da presente descrição é direcionado a um anticorpo que se liga especificamente à sequência A relacionada ao polipeptídeo de MHC humana classe I (MICA) e/ou sequência B relacionada ao polipeptídeo de MHC humana classe I (MICB), compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL); em que a VH compreende uma região determinante de complementaridade VH (CDR) 1, uma VH-CDR2 e uma VH-CDR3 e a VL compreende uma VL-CDR1, uma VL-CDR2 e uma VL-CDR3; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37 e 47. Em algumas modalidades, a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36 e 46. Em algumas modalidades, a VH-CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35 e 45. Em algumas modalidades, a VL-CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8, 18, 28, 38 e 48. Em algumas modalidades, a VL-CDR2 compreende uma

sequência de aminoácidos uma vez selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 9, 19, 29, 39 e 49. Em algumas modalidades, a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40 e 50.

[006] Em algumas modalidades, (a) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 6, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 7, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 8, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 9, e a VL - CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 10; (b) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 15, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 16, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 17, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 18, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 19, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 20; (c) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 25, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 26, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 27, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 28, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 29, e a VL-CDR3 compreende o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 30; (d) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 35, a VH-

CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 36, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 37, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 38, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39, e a VL-CDR3 compreende o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 40; ou (e) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 45, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 46, a VH-CDR3 compreende o conjunto de sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 47, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 48, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 49, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 50.

[007] Em algumas modalidades, o anticorpo tem uma ou mais propriedades selecionadas do grupo que consiste em: (a) o anticorpo inibe a liberação de MICA por uma célula tumoral; (b) o anticorpo aumenta a MICA ligada à membrana em uma célula tumoral; (c) o anticorpo reduz o nível de MICA solúvel no soro de um paciente; (d) o anticorpo media ADCC e/ou ADCP realçado; (e) o anticorpo media o processamento e/ou apresentação cruzada do antígeno realçado por uma célula; (f) o anticorpo inibe o crescimento tumoral e/ou metástase; (g) o anticorpo reduz o volume do tumor; (h) o anticorpo aumenta a sobrevida livre de progressão; (i) o anticorpo aumenta a sobrevida global; e (j) qualquer combinação dos mesmos.

[008] Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca

de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32 e 42. Em algumas modalidades, a VH compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32 e 42.

[009] Em algumas modalidades, a VL compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34 e 44. Em algumas modalidades, a VL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de o grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34 e 44.

[0010] Em algumas modalidades, (a) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4; (b) a VH compreende o conjunto de sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 12 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 14; (c) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 22 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 24; (d) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 32 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34; ou (e) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 42 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 44.

[0011] Em algumas modalidades, (a) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 58 e uma cadeia leve que compreende a sequên-

cia de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60; (b) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60; (c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 62, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 64; (d) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 66, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 68; ou (e) o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 70, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 72.

[0012] Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo um ou mais resíduos de aminoácidos de MICA humana selecionados do grupo que consiste em G254, D255, L257, Y264, W267 e qualquer combinação dos mesmos correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo G254, D255, L257, Y264 e W267 correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo resíduos de aminoácidos W150-M163 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo resíduos de aminoácidos Y231-T238 correspondentes a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de

hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo na MICA humana compreendendo os resíduos de aminoácidos D255-Q265 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o epítopo compreende resíduos de aminoácidos W253-W267 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo L201-N220 correspondente à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo T238-Q252 correspondente a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo L201-N220 e T238-Q252 correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo R240, Q241, D242, V244 e R279 correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo P258, G260, G262 e Y264 correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo na MICA humana compreendendo pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256,

L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo pelo menos dois resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo pelo menos quatro resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo pelo menos seis resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X.

[0013] Em algumas modalidades, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste em uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3, uma IgG4 ou uma variante das mesmas. Em algumas modalidades, o anticorpo não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante na cadeia pesada e em que a região constante compreende uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58.

[0014] Outro aspecto da presente descrição é direcionado a um anticorpo para a sequência A relacionada com o polipeptídeo de clas-

se I humano (MICA) e/ou sequência B relacionada com o polipeptídeo de classe I humano (MICB), compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL); em que a VH compreende uma região determinante de complementaridade VH (CDR) 1, uma VH-CDR2 e uma VH-CDR3 e a VL compreende uma VL-CDR1, uma VL-CDR2 e uma VL-CDR3; em que a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 6, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 8, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 9 e a VL-CDR3 compreende o aminoácido sequência apresentada em SEQ ID NO: 10; e em que o anticorpo não é fucosilado. Em algumas modalidades, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante na cadeia pesada que compreende uma mutação G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo o aminoácido sequência apresentada em SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 130 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60. Em algumas modalidades, o anticorpo não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo é hipofucosilado.

[0015] Alguns aspectos da presente descrição são direcionados a

um anticorpo que se liga especificamente à sequência A relacionada ao polipeptídeo de MHC humana classe I (MICA) e/ou sequência B relacionada ao polipeptídeo de MHC humana classe I (MICB), compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60, em que o anticorpo é não fucosilado.

[0016] Em algumas modalidades, o anticorpo é produzido por uma linhagem celular que reduziu ou eliminou a expressão de fucosiltransferase.

[0017] Alguns aspectos da presente descrição são direcionados a um polinucleotídeo ou um conjunto de polinucleotídeos que codificam um anticorpo aqui descrito. Outros aspectos da presente descrição são direcionados a um vetor ou um conjunto de vetores compreendendo o polinucleotídeo ou conjunto de polinucleotídeos. Outros aspectos da presente descrição são direcionados a uma célula hospedeira que compreende o anticorpo, polinucleotídeo ou conjunto de polinucleotídeos ou vetor.

[0018] Alguns aspectos da presente descrição são direcionados a um imunoconjugado que compreende o anticorpo e um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em uma citotoxina, um fármaco não citotóxico, um agente radioativo, um segundo anticorpo, uma enzima, um agente antineoplásico e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a citotoxina é selecionada a partir do grupo que consiste em dolastatina, monometil auristatina E (MMAE), maitansina, duocarmicina, caliqueamicina, pirrolobenzodiazepina, duocarmicina, centanamicina, SN38, doxorrubicina, um derivado desta, um análogo sintético da mesma e qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, a citotoxina compreende Citotoxina A. Em algumas modalidades,

[0019] Alguns aspectos da presente descrição são direcionados a composições farmacêuticas que compreendem o anticorpo, polinucleotídeo ou conjunto de polinucleotídeos, vetor ou conjunto de vetores ou imunoconjugado e um excipiente farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende um segundo anticorpo. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo liga-se especificamente a uma proteína selecionada do grupo que consiste em PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-8, IL-2, CD96, VISTA, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CD27, GITR e qualquer combinação dos mesmos.

[0020] Alguns aspectos da presente descrição são direcionados ao método de tratamento de um câncer em um indivíduo em necessidade, compreendendo a administração ao indivíduo do anticorpo, polinucleotídeo ou conjunto de polinucleotídeos, vetor ou conjunto de vetores, célula hospedeira, imunoconjugado, ou a composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o câncer compreende um tumor. Em algumas modalidades, o método compreende a administração ao indivíduo de uma segunda terapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína selecionada de Coestimulador de células T induzíveis (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), NKG2A, CD27, CD96, Proteína Relacionada ao TNFR Induzida por Glicocorticoide (GITR) e Mediador de Entrada do Vírus do Herpes (HVEM), Morte Programada-1 (PD-1), Ligante de Morte Programada-1 (PD-L1), Atenuador de Linfócitos CTLA-4, B e T (BTLA), Imunoglobulina de células T e domínio-3 de mucina (TIM-3), Receptor de adenosina A2a do gene de ativação de linfócitos (A2aR), receptor G1 semelhante à lectina de células exterminadoras (KLRG-1), receptor de células exterminadoras naturais 2B4 (CD244), CD160, imunorreceptor de células T com domí-

nios Ig e ITIM (TIGIT) e receptor para Supressor de domínio V Ig de ativação de células T (VISTA), KIR, TGFβ, IL-10, IL-8, IL-2, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CEACAM-1, CD52, HER2 e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma quantidade eficaz de IL-10 peguilada, IL-10-Fc ou IL-2 peguilada. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende um agente quimioterápico para câncer, radiação, um agente que ativa células imunes inatas e/ou um agente que realça a sobrevivência de células T NK e/ou CD8+.

[0021] Outras características e vantagens da presente descrição serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e exemplos que não devem ser interpretados como limitantes. O conteúdo de todas as referências citadas, incluindo artigos científicos, relatórios de jornais, entradas do GenBank, patentes e pedidos de patentes citados ao longo deste pedido são expressamente incorporados neste documento por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[0022] As FIGs. 1A-1D são alinhamentos de sequência do anticorpo MICA.36 anti-MICA/B (19G6), região variável de cadeia pesada (FIGs. 1A-1B; nucleotídeo: SEQ ID NO: 1; aminoácido: SEQ ID NO: 2) e região variável da cadeia leve (FIGs. 1C-1D; nucleotídeo: SEQ ID NO: 3; aminoácido: SEQ ID NO: 4). As FIGs. 1A e 1C mostram as sequências de nucleotídeos e as sequências de aminoácidos correspondentes para MICA.36 (19G6), região variável de cadeia pesada (FIG. 1A) e região variável da cadeia leve (FIG. 1C). As FIGs. 1B e 1D mostram as sequências da linha germinativa em relação às sequências MICA.36 (19G6) (“entrada”) para a região variável de cadeia pesada (FIG. 1B) e região variável da cadeia leve (FIG. 1D). As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) determinadas pela numeração de Kabat são marcadas por linhas horizontais e marcadas em

conformidade (FIGs. 1A-1D).

[0023] As FIGs. 2A-2F são alinhamentos de sequência do anticorpo anti-MICA/B MICA.52 (16A5), região variável de cadeia pesada (FIGs. 2A-2B; nucleotídeo: SEQ ID NO: 11; aminoácido: SEQ ID NO: 12), região variável de cadeia leve 1 (FIGs. 2C-2D; nucleotídeo: SEQ ID NO: 13; aminoácido: SEQ ID NO: 14) e região variável de cadeia leve 2 (FIGs. 2E-2F; nucleotídeo: SEQ ID NO: 127 ; aminoácido: SEQ ID NO: 128). As FIGs. 2A, 2C e 2E mostram as sequências de nucleotídeos e as sequências de aminoácidos correspondentes para o anticorpo anti-MICA/B 16A5, região variável de cadeia pesada (FIG. 2A) e regiões variáveis da cadeia leve 1 (MICA.52) e 2 (MICA. 53) (FIGs. 2C e 2E, respectivamente). As FIGs. 2B, 2D e 2F mostram as sequências da linha germinativa em relação às sequências MICA.52 ou MICA.53 (16A5) (“entrada”) para a região variável de cadeia pesada (FIG. 2B) e regiões variáveis da cadeia leve 1 e 2 (FIGs. 2D e 2F). As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) determinadas pela numeração de Kabat são marcadas por linhas horizontais e marcadas em conformidade (FIGs. 2A-2F).

[0024] As FIGs. 3A-3D são alinhamentos de sequência do anticorpo anti-MICA/B MICA.54 (24G11), região variável de cadeia pesada (FIGs. 3A-3B; nucleotídeo: SEQ ID NO: 21; aminoácido: SEQ ID NO: 22) e região variável da cadeia leve (FIGs. 3C-3D; nucleotídeo: SEQ ID NO: 23; aminoácido: SEQ ID NO: 24). As FIGs. 3A e 3C mostram as sequências de nucleotídeos e as sequências de aminoácidos correspondentes para o anticorpo anti-MICA/B MICA.54 (24G11), região variável de cadeia pesada (FIG. 3A) e região variável da cadeia leve (FIG. 3C). As FIGs. 3B e 3D mostram as sequências da linha germinativa em relação às sequências MICA.54 (24G11) (“entrada”) para a região variável de cadeia pesada (FIG. 3B) e região variável da cadeia leve (FIG. 3D). As Regiões Determinantes de Complementaridade

(CDRs) determinadas pela numeração de Kabat são marcadas por linhas horizontais e marcadas em conformidade (FIGs. 3A-3D).

[0025] As FIGs. 4A-4D são alinhamentos de sequência do anticorpo anti-MICA/B MICA.2 (3F5), região variável de cadeia pesada (FIGs. 4A-4B; nucleotídeo: SEQ ID NO: 31; aminoácido: SEQ ID NO: 32) e região variável da cadeia leve (FIGs. 4C-4D; nucleotídeo: SEQ ID NO: 33; aminoácido: SEQ ID NO: 34). As FIGs. 4A e 4C mostram as sequências de nucleotídeos e as sequências de aminoácidos correspondentes para o anticorpo anti-MICA/B MICA.2 (3F5), região variável de cadeia pesada (FIG. 4A) e região variável da cadeia leve (FIG. 4B). As FIGs. 4B e 4D mostram as sequências da linha germinativa em relação às sequências MICA.2 (3F5) (“entrada”) para a região variável de cadeia pesada (FIG. 4B) e região variável da cadeia leve (FIG. 4D). As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) determinadas pela numeração de Kabat são marcadas por linhas horizontais e marcadas em conformidade (FIGs. 4A-4D).

[0026] As FIGs. 5A-5D são alinhamentos de sequência do anticorpo anti-MICA/B 71C2, região variável de cadeia pesada (FIGs. 5A-5B; nucleotídeo: SEQ ID NO: 41; aminoácido: SEQ ID NO: 42) e região variável da cadeia leve (FIGs. 5C-5D; nucleotídeo: SEQ ID NO: 43; aminoácido: SEQ ID NO: 44). As FIGs. 5A e 5C mostram as sequências de nucleotídeos e as sequências de aminoácidos correspondentes para o anticorpo anti-MICA/B 71C2, região variável de cadeia pesada (FIG. 5A) e região variável da cadeia leve (FIG. 5B). As FIGs. 5B e 5D mostram as sequências da linha germinativa em relação às sequências 71C2 (“entrada”) para a região variável de cadeia pesada (FIG. 5B) e a região variável da cadeia leve (FIG. 5D). As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) determinadas pela numeração de Kabat são marcadas por linhas horizontais e marcadas em conformidade (FIGs. 5A-5D).

[0027] As FIGs. 6A-6H são representações gráficas da cinética de afinidade de ligação dos anticorpos anti-MICA/B: MICA.36 (FIGs. 6A-6D) e MICA.38 (FIGs. 6E-6H) para os alelos MICA MICA*002 (FIGs . 6A e 6E), MICA*004 (FIGs. 6B e 6F), MICA*008 (FIGs. 6C e 6G) e MICA*009 (FIGs. 6D e 6H) conforme medido pela ressonância de plasmônio superficial (SPR).

[0028] As FIGs. 6I-6L são representações gráficas da cinética de afinidade de ligação dos anticorpos anti-MICA/B: MICA.2 (FIG. 6I), 16A5 (FIG. 6J), 19G6 (FIG. 6K) e 71C2 (FIG. 6L) para os alelos MICA MICA*002, MICA*004, MICA*008 e MICA*009 conforme medido por SPR usando o instrumento Biacore 3000.

[0029] As FIGs. 7A-7G são representações gráficas da atividade de ligação específica de MICA.36 a antígenos de MICA/B expressos por células *in vitro*, analisadas com gráficos de Scatchard. A FIG. 7 A é uma curva padrão de concentração de anticorpo titulada (eixo x; anticorpo nM) plotada contra as contagens associadas por minuto (eixo y; CPM). As FIGs 7B-7F mostram a ligação específica, a ligação total e a ligação não específica (NSB) de MICA.36 a MICA*008 humano (FIG. 7B), MICB*005 humano (FIG. 7C) e MICA/B de macaco cinomolgo (clones # 4 e # 6) (FIGs. 7D-7E) superexpresso em células de ovário de hamster chinês (CHO); e MICA/B humana expressa endogenamente em células 786-O (FIG. 7F) e células SW480 (FIG. 7G).

[0030] As FIGs. 8A-8N mostram a afinidade de ligação de anticorpos MICA/B para alelos comuns de MICA ou MICB expressos em várias linhagens celulares usando classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). As FIGs. 8A, 8D, 8F, 8H, 8J e 8L mostram a ligação de 19G6 (8A), 24G11 (FIG. 8D), 71C2 (FIG. 8F), 16A5 (FIGs. 8H e 8J, dois subclones) e MICA.2 (FIG. 8L) para antígenos de MICA/B MICA*002 (triângulos), MICA*004 (triângulos invertidos), MICA*008 (losangos abertos), MICA*009 (quadrados preenchidos), MI-

CA*010 (círculos preenchidos) e MICB (quadrados abertos) expresso na superfície das células de CHO em concentrações crescentes de anticorpos. As FIGs. 8B, 8E, 8G, 8I, 8K e 8M mostram a ligação de 19G6 (8B), 24G11 (FIG. 8E), 71C2 (FIG. 8G), 16A5 (FIGs. 8I e 8K) e MICA.2 (FIG. 8M) para linhagens celulares 786-O (quadrados), A2058 (triângulos), HeLa (triângulos invertidos) e RPMI-8226 (círculos) que expressam MICA. As FIGs. 8C e 8N mostram a reatividade cruzada de 19G6 (FIG. 8C) e MICA.2 (FIG. 8N) para a MICA/B de macaco cinomolgo expresso na superfície dos clones de células de CHO #4 e #6 em comparação com um controle negativo (CHO).

[0031] As FIGs. 9A-9F mostram os resultados do mapeamento de epítopos usando espectrometria de massa (MS) de permuta de hidrogênio/deutério (HDX) para vários anticorpos anti-MICA/B. As FIGs. 9A-9E são representações gráficas de HDX diferencial de MICA mediante a interação de mAbs MICA.2 (FIG. 9A), MICA.39 (FIG. 9B), MICA.40 (FIG. 9C), MICA.36 não fucosilado com Fc contendo G236A (FIG. 9D) e MICA.36 (FIG. 9E) conforme medido usando espectrometria de massa. A FIG. 9F é um diagrama de fita da estrutura cristalina da MICA humana ligada ao receptor de células exterminadoras naturais (NKG2D), em que o epítopo MICA.36 mapeado é destacado.

[0032] As FIGs. 10A-10F mostram os resultados do mapeamento de epítopos usando exibição de levedura para vários anticorpos anti-MICA/B. As FIGs. 10A-10C mostram os epítopos individuais para MICA.36 (FIG. 10A), MICA.2 (FIG. 10B) e 24G11 (FIG. 10C). As FIGs. 10D-10F mostram os mesmos epítopos sobrepostos em diagramas de fita da estrutura cristalina de MICA ligada a NKG2D para MICA.2 (FIG. 10D), MICA.36 (FIG. 10E) e 24G11 (FIG. 10F).

[0033] As FIGs. 11A-11D são representações gráficas de níveis de superfície MICA ou MICB medidos pela intensidade máxima de fluorescência em células LLC (FIG. 11A), células E.G7-Ova (FIG. 11B) e

células B16 (FIGs. 11C e 11D) ectopicamente expressando MICA (FIGs. 11A-11C) ou MICB (FIG. 11D) após a exposição a concentrações crescentes do anticorpo MICA.36 anti-MICA/B (não fucosilado, variante G236A; triângulos invertidos) em comparação com a exposição a um isótipo controle (círculos), conforme medido por FACS.

[0034] As FIGs. 12A-12D são representações gráficas da concentração de MICA/B solúvel presente no sobrenadante de uma cultura de células, conforme medido por ELISA, para células LLC (FIG. 12A), células E.G7-Ova (FIG. 12B), e Células B16 (FIG. 12C) e células de CHO (FIG. 12D) que expressam ectopicamente MICA/B (FIGs. 12A-12C) ou antígeno MICA*008 recombinante (FIG. 12D) após exposição a concentrações crescentes de anticorpo MICA.36 anti-MICA/B (não fucosilado, variante G236A; triângulos invertidos) em comparação com a exposição a um controle de isótipo (círculos).

[0035] As FIGs. 13A-13E são representações gráficas dos níveis de superfície de MICA/B na superfície de linhagens celulares humanas que expressam MICA/B endogenamente. A localização de superfície de MICA/B foi medida pela intensidade máxima de fluorescência usando FACS na superfície de células SW480 (FIG. 13A), células HeLa (FIG. 13B), células HCT-116 (FIG. 13C), células 786-O (FIG. 13D), e células A2058 (FIG. 13E) após a exposição a concentrações crescentes do anticorpo MICA.36 anti-MICA/B (não fucosilado, variante G236A; triângulos invertidos) em comparação com a exposição a um controle de isótipo (círculos).

[0036] As FIGs. 14A-14C são representações gráficas de concentrações de MICA/B solúvel no meio de cultura de linhagens celulares humanas que expressam MICA/B endogenamente, conforme medido por ELISA no meio de células HeLa cultivadas (FIG. 14A; expressando MICA*008), HCT Células -116 (FIG. 14B) e células 786-O (FIG. 14C) após a exposição a concentrações crescentes do anticorpo MICA.36

anti-MICA/B (não fucosilado, variante G236A; triângulos invertidos) em comparação com a exposição para um controle de isótipo (círculos).

[0037] A FIG. 15A é uma representação gráfica do nível de fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) após cultura com concentrações crescentes de MICA.36 IgG1 (círculos), MICA.36 IgG1 G236A (quadrados fechados), MICA.36 IgG1 não fucosilado (NF; triângulos invertidos), e MICA.36-IgG1-NF-G236A (triângulos) ou um controle de isótipo (hIgG1, quadrados abertos). A FIG. 15B é uma representação gráfica de apresentação cruzada de antígeno medida pela porcentagem de células T CD8 em proliferação após cultura com concentrações crescentes de MICA.36 IgG1 (triângulos invertidos), MICA.36 IgG1 NF (círculos), MICA.36 IgG1 G236A (quadrados fechados), MICA .36-IgG1-NF-G236A (triângulos) ou um controle de isótipo (quadrados abertos).

[0038] As FIGs. 16A e 16B são ilustrações gráficas da porcentagem de lise específica de células Raji que expressam MICA/B (FIG. 16A) e células A375 (FIG. 16B) após a exposição a concentrações crescentes de MICA.36 NF G236A (triângulos), MICA. 36 IgG1 (triângulos invertidos), MICA.36 IgG1 NF (círculos), MICA.36 IgG1 G236A (quadrados fechados) ou um controle de isótipo (quadrados abertos).

[0039] As FIGs. 17A e 17B ilustram os efeitos *in vivo* da administração de anticorpo MICA.36 anti-MICA/B NF G236A na área total do tumor (FIG. 17A) e os níveis séricos de MICA/B solúvel (FIG. 17B) em camundongos induzidos a desenvolver tumores no pulmão.

[0040] As FIGs. 18A e 18B mostram os resultados de dois estudos de escalonamento de dose em camundongos induzidos a desenvolver tumores no pulmão, medindo o tamanho total dos tumores após a administração de doses variadas (10 mg/kg (mpk), 3 mpk, 1 mpk ou 0,3 mpk) do anticorpo MICA.36 anti-MICA/B NF G236A ou um controle de isótipo.

[0041] FIGs. 19A-19E mostram os resultados da administração de um anticorpo anti-MICA/B sozinho ou em combinação com um anticorpo anti-PD-1 para camundongos transgênicos MICA apresentando tumores EG7-MICA. As FIGs. 19A e 19B são representações gráficas da média (FIG. 19A) e da mediana (FIG. 19B) do volume do tumor em camundongos administrados com controle de isótipo (círculos fechados), MICA.36 mIgG2a e controle de isótipo mIgG1 (quadrados), MICA.36 mIgG1 D265A e isótipo mIgG2a (triângulos), mIgG1 D265A anti-PD-1 e isótipo mIgG2a (triângulos invertidos), MICA.36 mIgG2a e mIgG1 D265A anti-PD-1 (diamantes), ou MICA.36 mIgG1 D265A e mIg D265A anti-PD-1 (círculos abertos). A FIG. 19C é uma representação gráfica da porcentagem calculada de inibição do crescimento tumoral (TGI %) para cada grupo de tratamento: 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG1 (círculos), 10 mg/kg de MICA.36 mIgG1 D265A e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (quadrados), 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (triângulos), 10 mg/kg MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 (triângulos invertidos) e 10 mg/kg de MICA.36 mIgG1 D265A e 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 (losangos). A FIG. 19D mostra a sobrevivência livre de progressão (PFS %) para camundongos transgênicos apresentando tumores EG7-MICA após tratamento com controle duplo 10 mg/kg de isótipo mIgG1 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (círculos), 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG1 (quadrados), 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (triângulos invertidos), ou 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg mIgG1 D265A anti-PD-1 (diamantes). A FIG. 19E mostra a concentração de MICA solúvel no soro de camundongos transgênicos com tumores EG7-MICA após o tratamento com um controle de isótipo, MICA.36 mIgG2a, MICA.36 mIgG1 D265A, mIgG1 D265A anti-PD-1, MICA.36 mIgG2a e mIgG1 D265A anti-PD-1, ou MICA.36 mIgG1

D265A e mIgG1 D265A anti-PD-1.

[0042] As FIGs. 20A-20D mostram os resultados dos efeitos *in vivo* de anticorpos anti-MICA/B em camundongos transgênicos B6-MICA com tumores EG7-MICA/B. As FIGs. 20A e 20B são representações gráficas do volume médio (FIG. 20A) e mediano (FIG. 20B) do tumor em camundongos tratados com 20 mg/kg de isótipo mIgG2a (círculos), 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a controle (quadrados), 10 mg/kg de mIgG2a anti-CTLA-4 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (triângulos), ou 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de mIgG2a anti-CTLA-4 (invertido triângulos). A FIG. 20C mostra a porcentagem calculada de inibição do crescimento tumoral (TGI %) para cada grupo de tratamento: 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (círculos), 10 mg/kg de mIgG2a anti-CTLA-4 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (quadrados), e 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de mIgG2a anti-CTLA-4 (triângulos). A FIG. 20D mostra a sobrevivência livre de progressão (PFS %) para camundongos transgênicos com tumores EG7-MICA/B após tratamento com 20 mg/kg de isótipo mIgG2a (círculos), 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a controle (quadrados), 10 mg/kg de mIgG2a anti-CTLA-4 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (triângulos), ou 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de mIgG2a anti-CTLA-4 (triângulos invertidos).

[0043] As FIGs. 21A-21D mostram os resultados dos efeitos *in vivo* de anticorpos anti-MICA/B em camundongos transgênicos B6-MICA injetados por via subcutânea com células tumorais EG7-MICA/B. As FIGs. 21A e 21B são representações gráficas do volume médio (FIG. 21A) e mediano (FIG. 21B) do tumor em camundongos tratados com 10 mg/kg de isótipo mIgG1 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (círculos), 10 mg/kg de MICA. 36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG1 (quadrados), 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 e 10 mg/kg de isótipo

mIgG2a (triângulos), ou 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de mIgG1 anti-PD-1 de isótipo mIgG2a (triângulos invertidos). A FIG. 21C é uma representação gráfica da porcentagem calculada de inibição do crescimento tumoral (TGI %) para cada grupo de tratamento: 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG1 (círculos), 10 mg/kg de anti-PD-1A e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (quadrados) e 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 (triângulos). A FIG. 21D mostra a sobrevivência livre de progressão (PFS %) para camundongos transgênicos injetados por via subcutânea com células tumorais EG7-MICA após tratamento com 10 mg/kg de isótipo mIgG1 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (círculos), 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg de isótipo mIgG1 (quadrados), 10 mg/kg de mIgG1 D265A anti-PD-1 e 10 mg/kg de isótipo mIgG2a (triângulos), ou 10 mg/kg de MICA.36 mIgG2a e 10 mg/kg mIgG1 D265A anti-PD-1 (triângulos invertidos).

[0044] As FIGs. 22A-22C mostram os resultados do mapeamento de epítopos usando cocristalografia de raios X. A FIG. 22A é uma representação de superfície do domínio α3 de MICA com resíduos de epítopo mostrados em preto e os resíduos de superfície restantes mostrados em cinza. As FIGs. 22B e 22C mostram duas orientações do Fab MICA.36 (representação da fita) em complexo com o domínio α3 da MICA (representação da superfície, como mostrado na FIG. 22A). O epítopo MICA.36 no domínio α3 de MICA é mostrado em preto, e os resíduos restantes do domínio α3 de MICA são mostrados em cinza.

[0045] As FIGs. 23A-23B mostram a afinidade de ligação de anticorpos anti-MICA/B para alelos comuns de MICA expressos em células de CHO usando FACS. A FIG. 23B mostra os mesmos dados que na FIG. 23A, mas com um eixo Y diferente para os anticorpos recombinantes MICA.5, MICA.6 e MICA.7 e o controle de isótipo.

[0046] As FIGs. 24A-24B mostram a afinidade de ligação de anticorpos anti-MICA/B para MICA expresso endogenamente em células RPMI-8226 usando FACS. A FIG. 24B mostra os mesmos dados que na FIG. 24A, mas com um eixo Y diferente para Ab2, Ab28, Ab29, o controle de isótipo e os sobrenadantes (“sobrenadante”) das linhagens celulares de CHO que expressam anticorpos recombinantes MICA.5, MICA.6 e MICA.7.

[0047] A FIG. 25 mostra os níveis séricos de MICA/B solúvel em camundongos transgênicos B6-MICA 72 horas e 168 horas após a administração do anticorpo MICA.36-mIgG2a a 1 mg/kg ou 10 mg/kg ou controle de isótipo.

[0048] A FIG. 26 mostra os resultados da análise de PK de sMICA em camundongos transgênicos B6-MICA após dosados com sMICA e anticorpo MICA.36-mIgG2a ou controle de isótipo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA DESCRIÇÃO

[0049] A presente descrição se refere a anticorpos e seus fragmentos de ligação a antígeno que se ligam especificamente à sequência A relacionada ao polipeptídeo de MHC classe I (MICA) e/ou à sequência B relacionada ao polipeptídeo de MHC classe I (MICB) (“anticorpos anti-MICA/B”). Em algumas modalidades, a MICA é MICA humana. Em algumas modalidades, a MICB é a MICB humana. Outros aspectos da presente descrição se referem a métodos de tratamento de um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a MICA e/ou MICB. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um câncer e o anticorpo anti-MICA/B trata o câncer no indivíduo.

I. Termos

[0050] Para que a presente descrição possa ser mais facilmente compreendida, certos termos são definidos primeiro. Definições adici-

onais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

[0051] É de notar que o termo “um” ou “uma” entidade refere-se a uma ou mais dessas entidades; por exemplo, “uma sequência de nucleotídeos” é entendida como representando uma ou mais sequências de nucleotídeos. Como tais, os termos “um” (ou “uma”), “um ou mais” e “pelo menos um” podem ser usados indistintamente aqui.

[0052] Além disso, “e/ou”, onde aqui usado, deve ser considerado como descrição específica de cada um dos dois recursos ou componentes especificados com ou sem o outro. Assim, o termo “e/ou” conforme usado em uma frase como “A e/ou B” aqui se destina a incluir “A e B”, “A ou B”, “A” (sozinho) e “B” (sozinho). Da mesma forma, o termo “e/ou”, conforme usado em uma frase como “A, B e/ou C”, pretende abranger cada um dos seguintes aspectos: A, B e C; A, B ou C; A ou C; A ou B; B ou C; A e C; A e B; B e C; A (sozinho); B (sozinho); e C (sozinho).

[0053] Entende-se que, sempre que os aspectos são aqui descritos com a linguagem “compreendendo”, também são fornecidos aspectos análogos descritos em termos de “consistindo em” e/ou “consistindo essencialmente em”.

[0054] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica ao qual esta descrição está relacionada. Por exemplo, o Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; e o Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, fornecem um dicionário geral de muitos dos termos usados nesta descrição.

[0055] Unidades, prefixos e símbolos são indicados em seu formulário aceito Système International de Unites (SI). Os intervalos numéri-

cos incluem os números que definem o intervalo. Salvo indicação em contrário, as sequências de nucleotídeos são escritas da esquerda para a direita na orientação 5' para 3'. As sequências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita na orientação amino para carbóxi. Os títulos fornecidos aqui não são limitações dos vários aspectos da descrição, que podem ser obtidos por referência à especificação como um todo. Consequentemente, os termos definidos imediatamente abaixo são definidos de forma mais completa por referência ao relatório descritivo em sua totalidade.

[0056] O termo “cerca de” é aqui usado para significar aproximadamente, a grosso modo, em torno ou nas regiões de. Quando o termo “cerca de” é usado em conjunto com um intervalo numérico, ele modifica esse intervalo estendendo os limites acima e abaixo dos valores numéricos apresentados. Em geral, o termo “cerca de” pode modificar um valor numérico acima e abaixo do valor declarado por uma variação de, por exemplo, 10 por cento, para cima ou para baixo (maior ou menor).

[0057] O termo “sequência A relacionada com o polipeptídeo de MHC classe I” ou “MICA”, quando aqui usado, refere-se a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) não clássico classe I. O termo “sequência B relacionada com o polipeptídeo de MHC classe I” ou “MICB”, quando aqui usado, refere-se a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) não clássico classe I. O termo “MICA/B”, quando aqui usado, refere-se a MICA e/ou MICB.

[0058] MICA é uma proteína glicosilada e polimórfica expressa naturalmente que geralmente está ancorada à membrana celular. A clivagem da MICA ligada à membrana por metaloproteinases da matriz e a ADAM proteinase libera uma forma solúvel de MICA na matriz extracelular. MICA é um ligante para NKG2D, que é um receptor expresso

na superfície das células exterminadoras naturais (NK), células T CD8 e células T γδ. A expressão de MICA é induzida em células saudáveis durante o estresse, e MICA atua como um sinal para induzir a citólise mediada por células NK e T da célula que expressa MICA. Efetivamente, a MICA atua como um sinal de "*kill me*" para as células durante o estresse. A MICA é expressa por uma variedade de células tumorais.

[0059] O termo "MICA" inclui quaisquer variantes ou isoformas de MICA que são naturalmente expressas por células, incluindo, mas não se limitando a células tumorais. Consequentemente, os anticorpos aqui descritos podem reagir de forma cruzada com MICA de outras espécies além da humana (por exemplo, MICA cinomolga). Alternativamente, os anticorpos podem ser específicos para MICA humana e não exibem qualquer reatividade cruzada com outras espécies. MICA ou quaisquer variantes e isoformas da mesma, podem ser isoladas de células ou tecidos que os expressam naturalmente ou ser produzidas de forma recombinante usando técnicas bem conhecidas na técnica e/ou aquelas aqui descritas.

[0060] MICA humana (SEQ ID NO: 51) consiste em 332 aminoácidos. Foram identificadas pelo menos duas isoformas adicionais de MICA humana. A isoforma 1, conhecida como MICA1 (UniProt ID No. Q29983-1; SEQ ID NO: 109) consiste em 383 aminoácidos. A isoforma 2, conhecida como MICA2 (UniProt ID No. Q29983-2; SEQ ID NO: 88) consiste em 287 aminoácidos. MICA2 não tem resíduos de aminoácidos 109-204 em relação à sequência de aminoácidos de MICA1.

[0061] Abaixo estão as sequências de aminoácidos das três isoformas de MICA humana conhecidas.

(A) MICA Humana (SEQ ID NO: 51): MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSG-FLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-

TRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-
DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRRTVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPD-
GNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAGCCYFCYYYFLCPLL

(B) Isoforma 1 de MICA humana (UniProt ID No. Q29983-1; SEQ ID NO: 109):

MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFL-
TEVHLDGQPFLRCDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-
TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-
TRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-
DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLP-
DGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEG-
PELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA

(C) Isoforma 2 de MICA humana (UniProt ID No. Q29983-2; SEQ ID NO: 88):

MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSL-
RYNLTVLSWDGSVQSGFLTEVHLDGQPFLRCDRQK-
CRAKPQGQWAEDVLGNKTW-
DRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEVPPMVNVTRSEASEGNITVT-
CRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWV
ATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTH-
PVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCK-
KKTSAAEGPEL-
VSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA

[0062] A sequência de sinal de MICA corresponde aos aminoácidos 1-23 (sublinhados). Assim, as isoformas maduras de MICA, MICA1 e MICA2 consistem nos aminoácidos 24 a 332, 383 ou 287, respecti-

vamente. O domínio extracelular de MICA humana madura consiste nos aminoácidos 24-307 da SEQ ID NO: 51 e tem a sequência de aminoácidos:
EPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLTEVHLDGQPFLRCDRQKCRAK-
PQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKD-
QKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEW-
TMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQEL-
RRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNI-
TLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEE-
QRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHW (SEQ ID NO: 89).

[0063] Existem vários alelos MICA (MICA) conhecidos. Em algumas modalidades, a MICA é MICA*002 (também referido aqui como o alelo MICA*002), que tem a sequência de aminoácidos:
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSGDGSVQSG-
FLAEVHLDGQPFLRCDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-
TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-
TRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-
DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLP-
DGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEG-
PELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGT
(SEQ ID NO: 110).

[0064] Em algumas modalidades, a MICA é MICA*004 (também referido aqui como o antígeno MICA*004), que tem a sequência de aminoácidos:
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSG-
FLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-
TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-
TRSSQHFYYDGELFLSQNVETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-

DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRRVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASSFYPRNITLSTRQDGVSLSHDTQQWGDVLPD-
GNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEG-
PELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
(SEQ ID NO: 111).

[0065] Em algumas modalidades, a MICA é MICA*008 (também referido aqui como o antígeno MICA*008), que tem a sequência de aminoácidos:
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSG-
FLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-
TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-
TRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-
DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRRTVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPD-
GNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCC (SEQ ID NO: 112).

[0066] Em algumas modalidades, a MICA é MICA*009 (também referido aqui como o antígeno MICA*009), que tem a sequência de aminoácidos:
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSG-
FLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-
TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-
TRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-
DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRTVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLP-
DGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEG-
PELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGT
(SEQ ID NO: 113).

[0067] Em algumas modalidades, a MICA é MICA*009 (também referido aqui como o antígeno MICA*009), que tem a sequência de aminoácidos:
MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLPYNLTVLSWDGSVQSG-
FLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRE-
TRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS-
TRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKE-
DAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRTVPPMVNVTR-
SEASEGNITVTCRASSFYPRNIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPD-
GNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV-
PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEG-
PELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
(SEQ ID NO: 114).

[0068] Existem muitos alelos diferentes de MICA humana conhecidos na técnica, incluindo setenta e três ou mais alelos MICA. Veja, Frigoul e Lefranc, *Recent Res. Develop. Human Genet*. 3: 95-145 (2005). Os anticorpos descritos na presente descrição podem se ligar a um ou mais alelos MICA. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B se ligam especificamente a um único alelo MICA. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B se ligam com alta afinidade a um ou mais alelos MICA e com baixa afinidade a outros alelos MICA. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B se ligam a um ou mais alelos MICA selecionados do grupo que consiste em MICA*002, MICA*004, MICA*008 e MICA*009. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B se ligam com alta afinidade para MICA*004, MICA*008 e MICA*009 e, opcionalmente, com baixa afinidade para MICA*002.

[0069] A proteína MICA cinomolga compreende a seguinte sequência de aminoácidos (incluindo uma sequência de sinal):
ELHSLRYNVTVLSRDGSVQSGFLAEGHLDGQLFLLYDRQK-

CRARPQGEWSEDVLGAKTWDTETGDLTENGKDLRMTLA-
HIKGQKGGLHSLQEIKVCEIHEDNSTGGLRHFYYDGELFLSQNLET-
QEWTELQSSRAQTLALNIRNFWKEDTMKTKTHYRAVQADCLK-
KLQQYLESGVAVRRTAPPMVNVTHSEASEGNITVTCRASGFYPR-
NIALTWRQDGVSLNHNAQQWGGILPDQNGTYQTWVATRIRQGEE-
QRFACYMEHSGNHSTHPVPS (SEQ ID NO: 90; UniProt ID No. Q2MGE0).

[0070] MICB é uma proteína glicosilada e polimórfica expressa naturalmente que geralmente está ancorada à membrana celular. A clivagem da MICB ligada à membrana libera uma forma solúvel de MICB na matriz extracelular. MICB é um ligante para NKG2D e atua como um sinal para induzir a citólise mediada por células NK e T da célula que expressa MICB. MICB atua como um sinal de "*kill me*" para células durante o estresse e é expressa por uma variedade de células tumorais. O termo "MICB" inclui quaisquer variantes ou isoformas de MICB que são naturalmente expressas por células, incluindo, mas não se limitando a células tumorais.

[0071] Os anticorpos aqui descritos podem apresentar reação cruzada com MICB de outras espécies que não a humana (por exemplo, MICB cinomolga). Alternativamente, os anticorpos podem ser específicos para MICB humana e não exibem qualquer reatividade cruzada com outras espécies. MICB ou quaisquer variantes e isoformas dos mesmos, podem ser isolados de células ou tecidos que os expressam naturalmente ou ser produzidos de forma recombinante usando técnicas bem conhecidas na técnica e/ou aquelas aqui descritas.

[0072] MICB humana (SEQ ID NO: 132) consiste em 383 aminoácidos (UniProt ID No. Q29980), tendo a sequência de aminoácidos abaixo:

MGLGRVLLFLAVAFPFAPPAAAAEPHSLRYNLMVLSQDESVQSG-
FLAEGHLDGQPFLRYD

RQKRRAKPQGQWAEDVLGAKTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKD-
QKGGLHSLQEIRVCE
IHEDSSTRGSRHFYYDGELFLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAMN-
VTNFWKEDAMKTKTHY
RAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRTVPPMVNVTCSEVSEGNI-
TVTCRASSFYPRNITLTWR
QDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRIRQGEE-
QRFTCYMEHSGNHGTHPVPSGKV
LVLQSQRTDFPYVSAAMPCFVIIIILCVPCCKKKTSAAEGPELVS-
LQVLDQHPVGTGDHR
DAAQLGFQPLMSATGSTGSTEGA

[0073] Isoformas adicionais de MICB humana foram identificadas. A isoforma 2 de MICB (UniProt ID No. Q29980-2) tem a seguinte sequência de aminoácidos:

MGLGRVLLFLAVAFPFAPPAAAAEPHSLRYNLMVLSQDESVQSG-
FLAEGHLDGQPFLRYD
RQKRRAKPQGQWAEDVLGAKTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKD-
QKGVPQSSRAQTLAM
NVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRTV-
PPMVNVTCSEVSEGNITV
TCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNG-
TYQTWVATRIRQGEEQRFTCY
MEHSGNHGTHPVPSGKVLVLQSQRTDFPYVSAAMPCFVIIIILCV-
PCCKKKTSAAEGPEL
VSLQVLDQHPVGTGDHRDAAQLGFQPLMSATGSTGSTEGA (SEQ ID NO:133).

[0074] O termo “anticorpo” refere-se, em algumas modalidades, a uma proteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável de cadeia pesada

(aqui abreviada como VH) e uma região constante de cadeia pesada (aqui abreviada como CH). Em alguns anticorpos, por exemplo, anticorpos IgG de ocorrência natural, a região constante de cadeia pesada é composta por uma articulação e três domínios, CH1, CH2 e CH3. Em alguns anticorpos, por exemplo, anticorpos IgG de ocorrência natural, cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da cadeia leve é composta por um domínio (aqui abreviado como CL). As regiões VH e VL podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada VH e VL é composto por três CDRs e quatro FRs, organizados do terminal amino ao terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico. Uma cadeia pesada pode ter a lisina de terminal C ou não. A menos que especificado de outra forma aqui, os aminoácidos nas regiões variáveis são numerados usando o sistema de numeração de Kabat e aqueles nas regiões constantes são numerados usando o sistema EU.

[0075] Um “anticorpo IgG”, por exemplo, um anticorpo humano IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, quando aqui usado, tem, em algumas modalidades, a estrutura de um anticorpo IgG de ocorrência natural, ou seja, tem o mesmo número de cadeias pesadas e leves e ligações dissulfeto como um anticorpo IgG de ocorrência natural da mesma subclasse. Por exemplo, um anticorpo anti-MICA/B IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4

consiste em duas cadeias pesadas (HCs) e duas cadeias leves (LCs), em que os dois HCs e LCs estão ligados pelo mesmo número e localização de pontes dissulfeto que ocorrem em anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de ocorrência natural, respectivamente (a menos que o anticorpo tenha sofrido mutação para modificar as pontes dissulfeto).

[0076] Os anticorpos tipicamente se ligam especificamente ao seu antígeno cognato com alta afinidade, refletida por uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-5} a 10^{-11} M ou menos. Qualquer K_D maior do que cerca de 10^{-4} M é geralmente considerada como indicando ligação não específica. Quando aqui usado, um anticorpo que “se liga especificamente” a um antígeno refere-se a um anticorpo que se liga ao antígeno e a antígenos substancialmente idênticos com alta afinidade, o que significa ter uma K_D de 10^{-7} M ou menos, 10^{-8} M ou menos, 5×10^{-9} M ou menos, ou entre 10^{-8} M e 10^{-10} M ou menos, mas não se liga com alta afinidade a antígenos não relacionados. Um antígeno é “substancialmente idêntico” a um determinado antígeno se exibir um alto grau de identidade de sequência com o determinado antígeno, por exemplo, se exibir pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência do antígeno dado. A título de exemplo, um anticorpo que se liga especificamente à MICA/B humana pode, em algumas modalidades, também ter reatividade cruzada com antígenos de MICA/B de certas espécies de primatas (por exemplo, MICA/B cinomolga), mas não pode apresentar reação cruzada com antígenos de MICA/B de outras espécies ou com um antígeno diferente de MICA/B.

[0077] Uma imunoglobulina pode ser de qualquer um dos isótipos comumente conhecidos, incluindo, mas não se limitando a IgA, IgA secretora, IgG e IgM. O isótipo IgG é dividido em subclasses em certas espécies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em humanos e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos. Em algumas modalidades, os anticorpos

anti-MICA/B aqui descritos são do subtipo IgG1. As imunoglobulinas, por exemplo, IgG1, existem em vários alótipos, que diferem entre si em no máximo alguns aminoácidos. “Anticorpo” inclui, a título de exemplo, anticorpos de ocorrência natural e não natural; anticorpos monoclonais e policlonais; anticorpos quiméricos e humanizados; anticorpos humanos e não humanos e anticorpos totalmente sintéticos.

[0078] O termo “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo, quando aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, MICA/B humana). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de tamanho natural. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo, por exemplo, um anticorpo anti-MICA/B aqui descrito, incluem (i) um fragmento Fab (fragmento de clivagem de papaína) ou um fragmento monovalente semelhante consistindo nos domínios V_L, V_H, LC e CH1; (ii) um fragmento F(ab’)2 (fragmento de clivagem de pepsina) ou um fragmento bivalente semelhante compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios V_H e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios V_L e V_H de uma única subdivisão de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al*., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste em um domínio VH ; (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada e (vii) uma combinação de dois ou mais CDRs isolados que podem ser opcionalmente unidos por um ligante sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam feitos como uma única cadeia de proteína na qual a V_L e as regiões V_H emparelham para formar moléculas monovalentes

(conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); veja, por exemplo, Bird *et al*. (1988) Science 242: 423-426; e Huston *et al*. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 85: 5879-5883). Esses anticorpos de cadeia simples também se destinam a ser abrangidos pelo termo “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica e os fragmentos são rastreados quanto à utilidade da mesma maneira que os anticorpos intactos. As porções de ligação ao antígeno podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de imunoglobulinas intactas.

[0079] Um “anticorpo biespecífico” ou “anticorpo bifuncional” é um anticorpo híbrido artificial com dois pares de cadeia pesada/leve diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos, incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol*. 79: 315-321 (1990); Kostelny *et al*., *J. Immunol*. 148, 1547-1553 (1992).

[0080] O termo “anticorpo monoclonal”, quando aqui usado, refere-se a um anticorpo de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais compreendidos na população são substancialmente semelhantes e se ligam ao (s) mesmo (s) epítopo (s) (por exemplo, os anticorpos exibem uma especificidade e afinidade de ligação única), exceto para possíveis variantes que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estando presentes em quantidades menores. O modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. O termo “anticorpo monoclonal humano” refere-se a um anticorpo de uma população de anticorpos substanci-

almente homogêneos que apresentam uma única especificidade de ligação e que tem regiões constantes variáveis e opcionais derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal transgênico não humano, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve fundido a uma célula imortalizada.

[0081] O termo “anticorpo humano recombinante”, quando aqui usado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir deles, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatórios recombinantes e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a junção de sequências de genes de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes compreendem regiões variáveis e constantes que utilizam determinadas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana codificadas pelos genes da linha germinativa, mas incluem rearranjos e mutações subsequentes que ocorrem, por exemplo, durante a maturação do anticorpo. Como conhecido na técnica (veja, por exemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech*. 23 (9): 1117-1125), a região variável contém o domínio de ligação ao antígeno, que é codificado por vários genes que se reorganizam para formar um anticorpo específico para um antígeno estranho. Além do rearranjo, a re-

gião variável pode ser ainda modificada por múltiplas mudanças de aminoácidos únicos (referidas como mutação somática ou hipermutação) para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno estranho. A região constante mudará em resposta posterior a um antígeno (ou seja, permuta de isótipo). Portanto, as moléculas de ácido nucleico rearranjadas e mutadas somaticamente que codificam os polipeptídeos de imunoglobulina de cadeia leve e cadeia pesada em resposta a um antígeno não podem ter identidade de sequência com as moléculas de ácido nucleico originais, mas em vez disso serão substancialmente idênticas ou semelhantes (ou seja, têm pelo menos 80 % de identidade).

[0082] Um anticorpo “humano” (HuMAb) refere-se a um anticorpo possuindo regiões variáveis nas quais ambas as regiões de estrutura e CDR são derivadas a partir de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo “anticorpo humano”, quando aqui usado, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências estruturais humanas. Os termos anticorpos “humanos” e anticorpos “totalmente humanos” são usados como sinônimos.

[0083] Um anticorpo “humanizado” refere-se a um anticorpo no qual alguns, a maioria ou todos os aminoácidos fora dos domínios CDR de um anticorpo não humano são substituídos pelos aminoácidos

correspondentes derivados de imunoglobulinas humanas. Em algumas modalidades de uma forma humanizada de um anticorpo, alguns, a maioria ou todos os aminoácidos fora dos domínios CDR foram substituídos por aminoácidos de imunoglobulinas humanas, enquanto alguns, a maioria ou todos os aminoácidos dentro de uma ou mais regiões CDR estão inalterados. Pequenas adições, deleções, inserções, substituições ou modificações de aminoácidos são permissíveis, desde que não anulem a capacidade do anticorpo de se ligar a um antígeno particular. Um anticorpo “humanizado” retém uma especificidade antigênica semelhante à do anticorpo original.

[0084] Um “anticorpo quimérico” refere-se a um anticorpo em que as regiões variáveis são derivadas de uma espécie e as regiões constantes são derivadas de outra espécie, como um anticorpo em que as regiões variáveis são derivadas de um anticorpo de camundongo e as regiões constantes são derivadas de um anticorpo humano.

[0085] Quando aqui usado, “isótipo” refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE) que é codificado pelos genes da região constante de cadeia pesada.

[0086] “Alótipo” refere-se a variantes de ocorrência natural dentro de um grupo de isótipo específico, cujas variantes diferem em alguns aminoácidos (veja, por exemplo, Jefferis *et al*. (2009) *mAbs* 1:1). Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser de qualquer alótipo. Quando aqui usado, os anticorpos referidos como isótipo “IgG1f”, “IgG1.1f” ou “IgG1.3f” são IgG1, IgG1.1 não efetivo e anticorpos IgG1.3 não efetivos, respectivamente, do alótipo “f”, isto é, tendo 214R, 356E e 358M de acordo com o índice EU como em Kabat.

[0087] As frases “um anticorpo que reconhece um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são aqui utilizadas indistintamente com o termo “um anticorpo que se liga especificamente a um

antígeno".

[0088] Um "anticorpo isolado", quando aqui usado, pretende referir-se a um anticorpo que está substancialmente livre de outras proteínas e material celular.

[0089] Quando aqui usado, um anticorpo que "liga MICA/B" destina-se a referir-se a um anticorpo que interage com MICA/B, por exemplo, em ensaios de ligação usando células de CHO transfectadas com células tumorais que expressam MICA/B ou MICA/B humana, com uma EC_{50} de cerca de 25 μg/mL ou menos, cerca de 23 μg/mL ou menos, cerca de 20 μg/mL ou menos, cerca de 15 μg/mL ou menos, cerca de 10 μg/mL ou menos, cerca de 5 μg/mL ou menos, cerca de 3 μg/mL ou menos, cerca de 2 μg/mL ou menos, cerca de 1 μg/mL ou menos, cerca de 0,5 μg/mL ou menos, cerca de 0,45 μg/mL ou menos, cerca de 0,4 μg/mL ou menos, cerca de 0,35 μg/mL ou menos, ou cerca de 0,3 μg/mL ou menos, em métodos reconhecidos pela técnica, por exemplo, os ensaios de ligação baseados em FACS aqui descritos. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de cerca de 200 nM ou menos, cerca de 175 nM ou menos, cerca de 160 nM ou menos, cerca de 150 nM ou menos, cerca de 125 nM ou menos, cerca de 110 nM ou menos, cerca de 100 nM ou menos cerca de 80 nM ou menos, cerca de 75 nM ou menos, cerca de 60 nM ou menos, cerca de 50 nM ou menos, cerca de 40 nM ou menos, cerca de 35 nM ou menos, cerca de 30 nM ou menos, cerca de 25 nM ou menos, cerca de 20 nM ou menos, cerca de 15 nM ou menos, cerca de 10 nM ou menos, cerca de 9 nM ou menos, cerca de 8 nM ou menos, cerca de 7 nM ou menos, cerca de 6 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 4 nM ou menos, cerca de 3 nM ou menos, cerca de 2 nM ou menos, cerca de 1,9 nM ou menos, cerca de 1,8 nM ou menos, cerca de 1,7 nM ou menos, cerca de 1,6 nM ou menos,

cerca de 1,5 nM ou menos, cerca de 1,4 nM ou menos, cerca de 1,3 nM ou menos, cerca de 1,2 nM ou menos, cerca de 1,1 nM ou menos, cerca de 1,0 nM ou menos, cerca de 0,9 nM ou menos, cerca de 0,8 nM ou menos, cerca de 0,7 nM ou menos, cerca de 0,6 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,4 nM ou menos, cerca de 0,3 nM ou menos, cerca de 0,2 nM ou menos, ou cerca de 0,1 nM ou menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga à MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de menos do que cerca de 10 nM. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga à MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de menos do que cerca de 5 nM. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga à MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de menos de cerca de 1,5 nM. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga à MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de cerca de 1 nM ou menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga à MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de cerca de 0,5 nM ou menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de cerca de 0,3 nM ou menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga à MICA/B humana expressa em, por exemplo, células de CHO, com uma EC_{50} de cerca de 0,2 nM ou menos.

[0090] Quando aqui usado, um anticorpo que “inibe, previne ou reduz a liberação de MICA/B” por uma célula, por exemplo, uma célula tumoral, destina-se a referir-se a um anticorpo que inibe, previne ou reduz a liberação de MICA/B solúvel da superfície da célula. Sem estarem ligados a um mecanismo, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos reduzem a quantidade de MICA/B que é liberada, por exemplo, por clivagem, no plasma como MICA/B solúvel. Em algumas modalidades,

o anticorpo aumenta a MICA/B ligada à membrana na superfície da célula. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aumenta a retenção de MICA/B de superfície em uma célula transfectada com MICA/B humana em uma EC_{50} de retenção de MICA/B de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,85 nM ou menos, cerca de 0,8 nM ou menos, cerca de 0,75 nM ou menos, cerca de 0,7 nM ou menos, cerca de 0,65 nM ou menos, cerca de 0,6 nM ou menos, cerca de 0,55 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,45 nM ou menos, cerca de 0,4 nM ou menos, cerca de 0,35 nM ou menos, cerca de 0,3 nM ou menos, cerca de 0,25 nM ou menos, cerca de 0,2 nM ou menos, cerca de 0,15 nM ou menos, ou cerca de 0,1 nM ou Menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aumenta a retenção de MICA/B de superfície em uma célula transfectada com MICA/B humana em pelo menos cerca de 1,2 vezes, pelo menos cerca de 1,3 vezes, pelo menos cerca de 1,4 vezes, pelo menos cerca de 1,5 vezes, pelo menos cerca de 1,6 vezes, pelo menos cerca de 1,7 vezes, pelo menos cerca de 1,8 vezes, pelo menos cerca de 1,9 vezes, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 2,1 vezes, pelo menos cerca de 2,2 vezes, pelo menos cerca de 2,3 vezes, pelo menos cerca de 2,4 vezes, pelo menos cerca de 2,5 vezes, pelo menos cerca de 2,75 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 3,5 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 4,5 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 7,5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes ou pelo menos cerca de 20 vezes.

[0091] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B reduz os níveis de MICA/B solúvel (sMICA/B) no soro do paciente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B reduz a liberação de MICA/B solúvel de células transfectadas com MICA/B humana em uma IC_{50} de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de

1 nM ou menos, cerca de 0,7 nM ou menos, cerca de 0,6 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,45 nM ou menos, cerca de 0,4 nM ou menos, cerca de 0,35 nM ou menos, cerca de 0,3 nM ou menos, cerca de 0,25 nM ou menos, cerca de 0,2 nM ou menos, cerca de 0,19 nM ou menos, cerca de 0,18 nM ou menos, cerca de 0,17 nM ou menos, cerca de 0,16 nM ou menos, cerca de 0,15 nM ou menos, cerca de 0,14 nM ou menos, cerca de 0,13 nM ou menos, cerca de 0,12 nM ou menos, cerca de 0,11 nM ou menos, cerca de 0,1 nM ou menos, cerca de 0,09 nM ou menos, cerca de 0,08 nM ou menos, cerca de 0,07 nM ou menos, cerca de 0,06 nM ou menos, cerca de 0,05 nM ou menos, cerca de 0,04 nM ou menos, cerca de 0,03 nM ou menos, cerca de 0,02 nM ou menos, ou cerca de 0,01 nM ou menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B reduz a liberação de MICA/B de células transfectadas com MICA humana em cerca de 0,9 vez ou menos, cerca de 0,85 vez ou menos, cerca de 0,8 vez ou menos, cerca de 0,75 vez ou menos, cerca de 0,7 vez ou menos, cerca de 0,65 vez ou menos, cerca de 0,6 vez ou menos, cerca de 0,55 vez ou menos, cerca de 0,5 vez ou menos, cerca de 0,45 vez ou menos, cerca de 0,4 vez ou menos, cerca de 0,35 vez ou menos, cerca de 0,3 vez ou menos, cerca de 0,25 vez ou menos, cerca de 0,2 vez ou menos, cerca de 0,15 vez ou menos, cerca de 0,1 vez ou menos, ou cerca de 0,05 ou menos. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode reduzir MICA/B solúvel no soro de um indivíduo em, por exemplo, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 % ou pelo menos cerca de 90 %.

[0092] O termo “eliminar” ou “eliminação”, quando aqui usado, refere-se à liberação de MICA/B solúvel da superfície de uma célula que expressa MICA/B. MICA/B é expressa como uma proteína transmem-

brana, que está localizada na superfície celular. A clivagem dentro do domínio extracelular libera uma porção de MICA/B no plasma, que é referido aqui como “MICA/B solúvel” ou “sMICA/B”.

[0093] Uma “função efetora” refere-se à interação de uma região Fc de anticorpo com um receptor ou ligante Fc, ou um evento bioquímico que resulte daí. As “funções efetoras” exemplares incluem ligação C1q, citotoxicidade dependente do complemento (CDC), ligação ao receptor Fc, funções efetoras mediadas por FcγR, como ADCC e fagocitose mediada por células dependente de anticorpos (ADCP) e regulação negativa de um receptor de superfície celular (por exemplo, o receptor de células B; BCR). Essas funções efetoras geralmente a região Fc a ser combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo).

[0094] Um “receptor Fc” ou “FcR” é um receptor que se liga à região Fc de uma imunoglobulina. Os FcRs que se ligam a um anticorpo IgG compreendem receptores da família FcγR, incluindo variantes alélicas e formas de junção alternativo desses receptores. A família FcγR consiste em três receptores ativadores (FcγRI, FcγRIII e FcγRIV em camundongos; FcγRIA, FcγRIIA e FcγRIIIA em humanos) e um receptor inibidor (FcγRIIB). Várias propriedades de FcγRs humanos são conhecidas na técnica. A maioria dos tipos de células efetoras inatas coexpressam um ou mais FcγR de ativação e o inibidor FcγRIIB, enquanto células exterminadoras naturais (NK) expressam seletivamente um receptor Fc de ativação (FcγRIII em camundongos e FcγRIIIA em humanos), mas não o inibidor FcγRIIB em camundongos e humanos. A IgG1 humana liga-se à maioria dos receptores Fc humanos e é considerada equivalente à IgG2a de murino no que diz respeito aos tipos de receptores Fc ativadores aos quais se liga.

[0095] Uma “região Fc” (região cristalizável do fragmento) ou “domínio Fc” ou “Fc” refere-se à região de terminal C de cadeia pesada de

um anticorpo que media a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo a ligação a receptores de Fc localizados em várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efetoras) ou para o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico. Assim, uma região Fc compreende a região constante de um anticorpo excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina de região constante (por exemplo, CH1 ou CL). Nos isótipos de anticorpos IgG, IgA e IgD, a região Fc compreende dois fragmentos de proteína idênticos, derivados do segundo (CH2) e terceiro (CH3) domínios constantes das duas cadeias pesadas do anticorpo; As regiões Fc de IgM e IgE compreendem três domínios constantes de cadeia pesada (domínios CH 2-4) em cada cadeia polipeptídica. Para IgG, a região Fc compreende domínios de imunoglobulina CH2 e CH3 e a articulação entre os domínios CH1 e CH2. Embora a definição dos limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possa variar, conforme definido aqui, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é definida para se estender a partir de um resíduo de aminoácido D221 para IgG1, V222 para IgG2, L221 para IgG3 e P224 para IgG4 para o terminal carbóxi de cadeia pesada, em que a numeração está de acordo com o índice EU como em Kabat. O domínio CH2 de uma região Fc de IgG humana se estende do aminoácido 237 ao aminoácido 340, e o domínio CH3 está posicionado no lado de terminal C de um domínio CH2 em uma região Fc, isto é, se estende do aminoácido 341 ao aminoácido 447 ou 446 (se o resíduo de lisina de terminal C estiver ausente) ou 445 (se os resíduos de glicina e lisina de terminal C estiverem ausentes) de uma IgG. Quando aqui usado, a região Fc pode ser um Fc de sequência nativa, incluindo qualquer variante alotípica ou um Fc variante (por exemplo, um Fc de ocorrência não natural).

[0096] Uma “região Fc de sequência nativa” ou “Fc de sequência nativa” compreende uma sequência de aminoácidos que é idêntica à

sequência de aminoácidos de uma região Fc encontrada na natureza. As regiões Fc humanas de sequência nativa incluem uma região Fc de IgG1 humana de sequência nativa; região Fc de IgG2 humana de sequência nativa; região Fc de IgG3 humana de sequência nativa; e região Fc de IgG4 humana de sequência nativa, bem como suas variantes de ocorrência natural. A sequência nativa Fc inclui os vários alótipos de Fcs (veja, por exemplo, Jefferis *et al*. (2009) mAbs 1: 1).

[0097] O termo “epítopo” ou “determinante antigênico” refere-se a um sítio em um antígeno (por exemplo, MICA) ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo se liga especificamente, por exemplo, conforme definido pelo método específico usado para identificá-lo. Os epítopos podem ser formados a partir de aminoácidos contíguos (geralmente um epítopo linear) ou de aminoácidos não contíguos justapostos pela duplicação terciária de uma proteína (geralmente um epítopo conformacional). Os epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente, mas nem sempre, retidos na exposição a solventes desnaturantes, enquanto os epítopos formados por duplicação terciária são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo inclui tipicamente pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Métodos para determinar quais epítopos estão ligados por um determinado anticorpo (ou seja, mapeamento de epítopo) são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, imunomanchamento e ensaios de imunoprecipitação, em que peptídeos sobrepostos ou contíguos (por exemplo, de MICA) são testados quanto à reatividade com um determinado anticorpo (por exemplo, anticorpo anti-MICA/B). Os métodos de determinação da conformação espacial de epítopos incluem técnicas na técnica e aquelas descritas aqui, por exemplo, cristalografia de raios x, cocristalografia de raios x, análise mutacional de antígeno, ressonância magnética nuclear bidimensional e HDX-MS (veja, por

exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, GE Morris, Ed. (1996)).

[0098] O termo “mapeamento de epítopo” refere-se ao processo de identificação dos determinantes moleculares para o reconhecimento do antígeno-anticorpo.

[0099] O termo “liga-se ao mesmo epítopo” com referência a dois ou mais anticorpos significa que os anticorpos se ligam ao mesmo segmento de resíduos de aminoácidos, conforme determinado por um determinado método. As técnicas para determinar se os anticorpos se ligam ao “mesmo epítopo em MICA” com os anticorpos aqui descritos incluem, por exemplo, métodos de mapeamento de epítopos, tais como análises de raios x de cristais de antígeno: complexos de anticorpos que fornecem resolução atômica do epítopo e espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Outros métodos monitoram a ligação do anticorpo a fragmentos de antígeno ou variações mutadas do antígeno, onde a perda de ligação devido a uma modificação de um resíduo de aminoácido na sequência de antígeno é frequentemente considerada uma indicação de um componente de epítopo. Além disso, métodos computacionais combinatórios para mapeamento de epítopos também podem ser usados. Estes métodos baseiam-se na capacidade do anticorpo de interesse para isolar por afinidade peptídeos curtos específicos de bibliotecas combinatórias de peptídeos de apresentação em fago. Espera-se que os anticorpos com a mesma V_H e V_L ou as mesmas sequências CDR1, 2 e 3 se liguem ao mesmo epítopo.

[00100] Os anticorpos que “competem com outro anticorpo pela ligação a um alvo” referem-se a anticorpos que inibem (parcialmente ou completamente) a ligação do outro anticorpo ao alvo. Se dois anticorpos competem entre si pela ligação a um alvo, ou seja, se e em que medida um anticorpo inibe a ligação do outro anticorpo a um alvo, po-

de ser determinado usando experimentos de competição conhecidos, por exemplo, análise por ressonância de plasmônio superficial BIACORE® (SPR). Em algumas modalidades, um anticorpo compete com e inibe a ligação de outro anticorpo a um alvo em pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 100 %. O nível de inibição ou competição pode ser diferente dependendo de qual anticorpo é o “anticorpo bloqueador” (isto é, o anticorpo frio que é incubado primeiro com o alvo). Os ensaios de competição podem ser conduzidos como descrito, por exemplo, em Ed Harlow e David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 ou no Capítulo 11 de “Using Antibodies” por Ed Harlow e David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Dois anticorpos “competem entre si” se os anticorpos se bloquearem em ambos os sentidos em pelo menos 50 %, isto é, independentemente de um ou outro anticorpo ser contatado primeiro com o antígeno no experimento de competição.

[00101] Os ensaios de ligação competitiva para determinar se dois anticorpos competem ou competem cruzadamente para ligação incluem: competição para ligação a células que expressam MICA/B, por exemplo, por citometria de fluxo, tal como descrito nos Exemplos. Outros métodos incluem: SPR (por exemplo, BIACORE®), radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoensaio enzimático direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche (veja, Stahli *et al*., Methods in Enzymology 9: 242 (1 983)); EIA de biotina-avidina direto de fase sólida (veja, Kirkland *et al*., *J. Immunol*. 137: 3614 (1986)); ensaio de marcação direta de fase sólida, ensaio em sanduíche de marcação direta de fase sólida (veja, Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcação direta de fase sólida usando 1-125 marcação (veja, Morel *et al*., *Mol. Immunol*. 25 (1): 7 (1988)); EIA biotina-avidina direto de fase sólida (Cheung *et al*., *Virology* 176: 546 (1990));

e RIA marcado direto. (Moldenhauer *et al*., *Scand. J. Immunol*. 32:77 (1990)).

[00102] Quando aqui usado, os termos “ligação específica”, “ligação seletiva”, “liga-se seletivamente” e “liga-se especificamente” referem-se à ligação do anticorpo a um epítopo em um antígeno predeterminado. Normalmente, o anticorpo (i) se liga a uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de aproximadamente menos do que 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos do que 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda menor quando determinado por, por exemplo, tecnologia de ressonância de plasmônio superficial (SPR) em um instrumento BIACORE® 2000 usando o antígeno predeterminado, por exemplo, MICA ou MICB humana recombinante, como analisado e o anticorpo como ligante, ou análise de Scatchard de ligação do anticorpo às células positivas para o antígeno, e (ii) liga-se ao antígeno predeterminado com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior do que sua afinidade para a ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) diferente do antígeno predeterminado ou um antígeno. Consequentemente, um anticorpo que “se liga especificamente à MICA/B humana” refere-se a um anticorpo que se liga a MICA/B humana solúvel ou ligado a células com uma K_D de 10^{-7} M ou menos, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda mais baixo. Um anticorpo que “reage de forma cruzada com MICA/B cinomolga” refere-se a um anticorpo que se liga a MICA/B cinomolga com uma K_D de 10^{-7} M ou menos, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda menor. Em algumas modalidades, esses anticorpos que não apresentam reação cruzada com MICA/B de uma espécie não humana exibem ligação essencialmente indetectável contra essas proteínas em ensaios de ligação padrão.

[00103] O termo “k_{assoc}” ou “k_a”, quando aqui usado, destina-se a referir-se à taxa de associação de uma interação específica anticorpo-

antígeno, enquanto o termo “k_{dis}” ou “k_d”, quando aqui usado, se destina a referir-se à taxa de dissociação de uma interação particular anticorpo-antígeno. O termo “K_D”, quando aqui usado, pretende referir-se à constante de dissociação, que é obtida a partir da relação de k_d para k_a (isto é, k_d/k_a) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores de K_D para anticorpos podem ser determinados usando métodos bem apresentados na técnica. Os métodos disponíveis para determinar a K_D de um anticorpo incluem ressonância de plasmônio superficial, um sistema biossensor, como um sistema BIACORE® ou citometria de fluxo e análise de Scatchard.

[00104] Quando aqui usado, o termo “elevada afinidade” para um anticorpo IgG refere-se a um anticorpo com uma K_D de 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M ou menos, ou 10^{-10} M ou menos para um antígeno alvo. No entanto, a ligação de “alta afinidade” pode variar para outros isótipos de anticorpo. Por exemplo, a ligação de “alta afinidade” para um isótipo IgM refere-se a um anticorpo com uma K_D de 10^{-10} M ou menos, ou 10^{-8} M ou menos.

[00105] O termo “EC_{50}” no contexto de um ensaio *in vitro* ou *in vivo* usando um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, refere-se à concentração de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que induz uma resposta que é 50 % da resposta máxima, ou seja, a meio caminho entre a resposta máxima e a linha de base.

[00106] O termo “ocorrência natural”, quando aqui usado, quando aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, um polipeptídeo ou sequência polinucleotídica que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem no laboratório é de ocorrência natural.

[00107] Um “polipeptídeo” refere-se a uma cadeia compreendendo pelo menos dois resíduos de aminoácidos ligados consecutivamente, sem limite superior no comprimento da cadeia. Um ou mais resíduos de aminoácidos na proteína podem conter uma modificação, como, mas não se limitando a, glicosilação, fosforilação ou formação de ligação dissulfeto. Uma “proteína” pode compreender um ou mais polipeptídeos.

[00108] O termo “molécula de ácido nucleico”, quando aqui usado, pretende incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples ou dupla e pode ser cDNA.

[00109] “Substituições conservadoras de aminoácidos” referem-se a substituições de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais ramificadas em beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Em algumas modalidades, um resíduo de aminoácido não essencial previsto em um anticorpo anti-MICA/B é substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Os métodos de identificação de substituições conservadoras de nucleotídeos e aminoácidos que não eliminam a ligação ao antígeno são bem conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Brummell *et al*., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al*. *Pro-*

tein Eng. 12 (10): 879-884 (1999); e Burks *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)).

[00110] Para ácidos nucleicos, o termo “homologia substancial” indica que dois ácidos nucleicos, ou sequências designadas dos mesmos, quando idealmente alinhados e comparados, são idênticos, com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriadas, em pelo menos cerca de 80 % dos nucleotídeos, pelo menos cerca de 90 % a 95 %, ou pelo menos cerca de 98 % a 99,5 % dos nucleotídeos. Alternativamente, existe homologia substancial quando os segmentos hibridizarão sob condições de hibridização seletiva, com o complemento da fita.

[00111] Para polipeptídeos, o termo “homologia substancial” indica que dois polipeptídeos, ou suas sequências designadas, quando idealmente alinhados e comparados, são idênticos, com inserções ou deleções de aminoácidos apropriadas, em pelo menos cerca de 80 % dos aminoácidos, pelo menos cerca de 90 % a 95 %, ou pelo menos cerca de 98 % a 99,5 % dos aminoácidos.

[00112] A porcentagem de identidade entre duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (ou seja, % de homologia = # de posições idênticas/# total de posições x 100), levando em consideração o número de lacunas e o comprimento de cada lacuna, que precisa ser introduzida para o alinhamento ideal das duas sequências. A comparação de sequências e a determinação da porcentagem de identidade entre duas sequências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos não limitantes abaixo.

[00113] A porcentagem de identidade entre duas sequências de nucleotídeos pode ser determinada usando o programa GAP no pacote de software GCG (disponível em worldwideweb.gcg.com), usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de lacuna de 40, 50, 60, 70 ou 80

e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. A porcentagem de identidade entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos também pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (CABIOS, 4: 11- 17 (1989)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol*. (48): 444-453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em http: //www.gcg. com), usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[00114] As sequências de ácido nucleico e de proteína aqui descritas podem ainda ser usadas como uma “sequência de consulta” para realizar uma pesquisa em bancos de dados públicos para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Essas pesquisas podem ser realizadas usando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, *et al*. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. As pesquisas de nucleotídeos do BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, pontuação = 100, comprimento da palavra = 12 para obter sequências de nucleotídeos homólogas às moléculas de ácido nucleico aqui descritas. As pesquisas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteína aqui descritas. Para obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul *et al*., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser

usados. Consulte worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov.

[00115] Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado de células ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é “isolado” ou “tornado substancialmente puro” quando purificado de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares (por exemplo, as outras partes do cromossoma) ou proteínas, por técnicas padrão, incluindo alcalino/Tratamento SDS, bandas CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outros bem conhecidos na técnica. Veja, F. Ausubel, *et al*., Ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, New York (1987).

[00116] Os ácidos nucleicos, por exemplo, cDNA, podem ser mutados, de acordo com técnicas padrão para fornecer sequências de genes. Para sequências de codificação, essas mutações podem afetar a sequência de aminoácidos conforme desejado. Em particular, as sequências de DNA substancialmente homólogas a ou derivadas de V, D, J, constante, mudanças e outras sequências descritas aqui são consideradas (em que “derivado” indica que uma sequência é idêntica ou modificada de outra sequência).

[00117] O termo “vetor”, quando aqui usado, pretende referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a uma alça de DNA de fita dupla circular na qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos com uma origem de replicação bacteriana e vetores epissomais de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos

não episssomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e, assim, são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Tais vetores são aqui referidos como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente, “vetores de expressão”). Em geral, os vetores de expressão úteis em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. Na presente especificação, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados indistintamente, uma vez que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. No entanto, também estão incluídas outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus com replicação defeituosa, adenovírus e vírus adenoassociados), que desempenham funções equivalentes.

[00118] O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente “célula hospedeira”), quando aqui usado, destina-se a referir-se a uma célula que compreende um ácido nucleico que não está naturalmente presente na célula e pode ser uma célula na qual um vetor de expressão foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos se destinam a se referir não apenas à célula em questão em particular, mas à progênie de tal célula. Como certas modificações podem ocorrer nas gerações seguintes devido a mutações ou influências ambientais, tal progênie não pode, de fato, ser idêntica à célula-mãe, mas ainda está incluída no escopo do termo “célula hospedeira”, quando aqui usado.

[00119] Uma “resposta imune” é como entendida na técnica e geralmente se refere a uma resposta biológica dentro de um vertebrado contra agentes estranhos ou anormais, por exemplo, células cancerosas, cuja resposta protege o organismo contra esses agentes e doenças causadas por eles. Uma resposta imune é mediada pela ação de uma ou mais células do sistema imunológico (por exemplo, um linfócito

T, linfócito B, célula exterminadora natural (NK), macrófago, eosinófilo, mastócito, célula dendrítica ou neutrófilo) e macromoléculas solúveis produzida por qualquer uma dessas células ou do fígado (incluindo anticorpos, citocinas e complemento) que resulta em direcionamento seletivo, ligação, dano, destruição e/ou eliminação do corpo do vertebrado de patógenos invasores, células ou tecidos infectados com patógenos, células cancerosas ou outras células anormais, ou, em casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais. Uma reação imune inclui, por exemplo, ativação ou inibição de uma célula T, por exemplo, uma célula T efetora, uma célula Th, uma célula $CD4^+$, uma célula T $CD8^+$ ou uma célula Treg, ou ativação ou inibição de qualquer outra célula do sistema imunológico, por exemplo, célula NK.

[00120] Um “imunomodulador” ou “imunorregulador” refere-se a um agente, por exemplo, um agente direcionado a um componente de uma via de sinalização que pode estar envolvido na modulação, regulação ou modificação de uma resposta imune. “Modular”, “regular” ou “modificar” uma resposta imune refere-se a qualquer alteração em uma célula do sistema imune ou na atividade de tal célula (por exemplo, uma célula T efetora, como uma célula Th1). Tal modulação inclui estimulação ou supressão do sistema imunológico que pode se manifestar por um aumento ou diminuição no número de vários tipos de células, um aumento ou diminuição na atividade dessas células ou quaisquer outras alterações que podem ocorrer dentro do sistema imunológico. Ambos os imunomoduladores inibidors e estimuladores foram identificados, alguns dos quais podem ter função realçada em um microambiente tumoral. Em algumas modalidades, o imunomodulador tem como alvo uma molécula na superfície de uma célula T. Um “alvo imunomodulador” ou “alvo imunorregulador” é uma molécula, por exemplo, uma molécula de superfície celular, que é direcionada para

ligação por e cuja atividade é alterada pela ligação de uma substância, agente, fração, composto ou molécula. Os alvos imunomoduladores incluem, por exemplo, receptores na superfície de uma célula (“receptores imunomoduladores”) e ligantes de receptor (“ligantes imunomoduladores”).

[00121] “Imunoterapia” refere-se ao tratamento de um indivíduo que sofre de, ou em risco de contrair ou sofrer recorrência de uma doença, por um método que compreende induzir, aumentar, suprimir ou de outra forma modificar o sistema imunológico ou uma resposta imunológica.

[00122] “Terapia imunoestimulante” ou “terapia imunoestimuladora” refere-se a uma terapia que resulta no aumento (indução ou realce) de uma resposta imune em um indivíduo para, por exemplo, tratar o câncer.

[00123] “Potenciar uma resposta imune endógena” significa aumentar a eficácia ou potência de uma resposta imune existente em um indivíduo. Este aumento na eficácia e potência pode ser alcançado, por exemplo, superando os mecanismos que suprimem a resposta imune do hospedeiro endógeno ou estimulando os mecanismos que aumentam a resposta imune do hospedeiro endógeno.

[00124] Células “T efetoras” (“T_{eff}”) referem-se a células T (por exemplo, células T $CD4^+$ e $CD8^+$) com atividades citolíticas, bem como células T auxiliares (Th), por exemplo, células Th1, cujas células secretam citocinas e ativam e direcionam outras células imunes, mas não inclui células T reguladoras (células Treg). Certos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos ativam células T_{eff}, por exemplo, células T_{eff} $CD4^+$ e $CD8^+$ e células Th1.

[00125] Uma capacidade aumentada de estimular uma resposta imune ou o sistema imunológico pode resultar de uma atividade agonista realçada de receptores coestimuladores de células T e/ou uma

atividade antagonista aumentada de receptores inibidores. Um aumento da capacidade de estimular uma resposta imune ou o sistema imune pode ser refletido por um aumento do EC_{50} ou nível máximo de atividade em um ensaio que mede uma resposta imune, por exemplo, um ensaio que mede mudanças na liberação de citocina ou quimiocina, citolítico atividade (determinada diretamente nas células alvo ou indiretamente por meio da detecção de CD107a ou granzimas) e proliferação. A capacidade de estimular uma resposta imune ou a atividade do sistema imune pode ser aumentada em pelo menos 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 vezes, 3 vezes, 5 vezes ou mais.

[00126] Quando aqui usado, o termo “ligado” refere-se à associação de duas ou mais moléculas. A ligação pode ser covalente ou não covalente. A ligação também pode ser genética (ou seja, fundida de forma recombinante). Tais ligações podem ser alcançadas usando uma ampla variedade de técnicas reconhecidas na técnica, tais como conjugação química e produção de proteína recombinante.

[00127] Quando aqui usado, “administrar” refere-se à introdução física de uma composição compreendendo um agente terapêutico a um indivíduo, usando qualquer um dos vários métodos e sistemas de liberação conhecidos por aqueles versados na técnica. Diferentes vias de administração para os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos incluem intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, espinhal ou outras vias de administração parenteral, por exemplo, por injeção ou infusão. A frase “administração parenteral”, quando aqui usada, significa modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e inclui, sem limitação, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, injeção e infusão intradérmica, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intraesternal, bem

como eletroporação *in vivo*. Alternativamente, um anticorpo aqui descrito pode ser administrado por uma via não parenteral, tal como uma via de administração tópica, epidérmica ou mucosa, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou tópica. A administração também pode ser realizada, por exemplo, uma vez, uma pluralidade de vezes e/ou durante um ou mais períodos prolongados.

[00128] Quando aqui usado, o termo “resposta mediada por células T” refere-se a uma resposta mediada por células T, incluindo células T efetoras (por exemplo, células $CD8^+$) e células T auxiliares (por exemplo, células $CD4^+$). As respostas mediadas por células T incluem, por exemplo, citotoxicidade e proliferação de células T.

[00129] Quando aqui usado, o termo “resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL)” refere-se a uma resposta imune induzida por células T citotóxicas. As respostas de CTL são mediadas principalmente por células T $CD8^+$.

[00130] Quando aqui usada, a frase “inibe o crescimento de um tumor” inclui qualquer diminuição mensurável no crescimento de um tumor, por exemplo, a inibição do crescimento de um tumor em pelo menos cerca de 10 %, por exemplo, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 99 % ou 100 %. Em algumas modalidades, a inibição do crescimento do tumor é medida como a porcentagem de inibição do crescimento do tumor (TGI %). A TGI % pode ser determinada calculando a TGI em dat “t” calculado a partir de todos os animais de tratamento de acordo com a fórmula: $[1-((T_t/T_0)/(C_t/C_0))]/[(C_t-C_0)/C_t\ ] * 100$ [Fórmula 1], onde T_t = tamanho do tumor individual do animal tratado no tempo 't', T_0 = tamanho do tumor individual do animal tratado na primeira medição, C_t = tamanho médio dos tumores dos animais controle no tempo 't', C_0 =

tamanho médio do tumor de animais controle na primeira medição.

[00131] Quando aqui usado, “câncer” refere-se a um amplo grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais no corpo. A divisão celular desregulada pode resultar na formação de tumores malignos ou células que invadem os tecidos vizinhos e podem metastatizar para partes distantes do corpo através do sistema linfático ou corrente sanguínea.

[00132] Os termos “tratar”, “tratando” e “tratamento”, quando aqui usados, referem-se a qualquer tipo de intervenção ou processo realizado em, ou administrando um agente ativo ao, indivíduo com o objetivo de reverter, aliviar, melhorar, inibir, ou desacelerar ou prevenir a progressão, desenvolvimento, gravidade ou recorrência de um sintoma, complicação, condição ou indícios bioquímicos associados a uma doença ou aumento da sobrevida geral. O tratamento pode ser de um indivíduo com uma doença ou de um indivíduo que não tem uma doença (por exemplo, para profilaxia).

[00133] O termo “dose eficaz” ou “dosagem eficaz” é definido como uma quantidade suficiente para atingir ou pelo menos parcialmente atingir um efeito desejado. Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” ou “dosagem terapeuticamente eficaz” de uma fármaco ou agente terapêutico é qualquer quantidade da fármaco que, quando usado sozinho ou em combinação com outro agente terapêutico, promove a regressão da doença evidenciada por uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença, um aumento na frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença, um aumento na sobrevida geral (o período de tempo desde a data do diagnóstico ou o início do tratamento para uma doença, como câncer, em que os pacientes diagnosticados com a doença ainda estão vivos), ou uma prevenção de deficiência ou deficiência devido à aflição da doença. Uma quantidade ou dosagem terapeuticamente eficaz de uma fármaco inclui uma “quantidade profi-

laticamente eficaz” ou uma “dosagem profilaticamente eficaz”, que é qualquer quantidade da fármaco que, quando administrada sozinha ou em combinação com outro agente terapêutico a um indivíduo em risco de desenvolver uma doença ou de sofrer uma recorrência da doença, inibe o desenvolvimento ou a recorrência da doença. A capacidade de um agente terapêutico para promover a regressão da doença ou inibir o desenvolvimento ou recorrência da doença pode ser avaliada usando uma variedade de métodos conhecidos pelo médico experiente, como em seres humanos durante os ensaios clínicos, em sistemas de modelo animal preditivos de eficácia em humanos, ou através do ensaio da atividade do agente em ensaios *in vitro*.

[00134] A título de exemplo, um agente anticâncer é uma fármaco que promove a regressão do câncer em um indivíduo. Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz da fármaco promove a regressão do câncer ao ponto de eliminar o câncer. “Promover a regressão do câncer” significa que a administração de uma quantidade eficaz da fármaco, sozinha ou em combinação com um agente antineoplásico, resulta em uma redução no crescimento ou tamanho do tumor, necrose do tumor, uma diminuição na gravidade de pelo menos um sintoma de doença, um aumento na frequência e duração dos períodos livres de sintomas da doença, um aumento na sobrevida geral, uma prevenção de deficiência ou incapacidade devido à aflição da doença ou de outra forma a melhoria dos sintomas da doença no paciente. Além disso, os termos “eficaz” e “eficácia” em relação a um tratamento incluem tanto a eficácia farmacológica quanto a segurança fisiológica. A eficácia farmacológica refere-se à capacidade da fármaco de promover a regressão do câncer no paciente. A segurança fisiológica se refere ao nível de toxicidade ou outros efeitos fisiológicos adversos no nível celular, de órgão e/ou organismo (efeitos adversos) resultantes da administração da fármaco.

[00135] A título de exemplo para o tratamento de tumores, uma quantidade ou dosagem terapeuticamente eficaz do fármaco inibe o crescimento celular ou tumoral em pelo menos cerca de 20 %, em pelo menos cerca de 40 %, em pelo menos cerca de 60 % ou em pelo menos cerca de 80 % em relação aos indivíduos não tratados. Em algumas modalidades, uma quantidade ou dosagem terapeuticamente eficaz da fármaco inibe completamente o crescimento celular ou tumoral, ou seja, inibe o crescimento celular ou tumoral em 100 %. A capacidade de um composto para inibir o crescimento do tumor pode ser avaliada usando os ensaios descritos *infra*. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade do composto para inibir o crescimento celular, tal inibição pode ser medida *in vitro* por ensaios conhecidos do clínico versado. Em algumas modalidades aqui descritas, a regressão do tumor pode ser observada e continuar por um período de pelo menos cerca de 20 dias, pelo menos cerca de 40 dias ou pelo menos cerca de 60 dias.

[00136] O termo “paciente” inclui seres humanos e outros mamíferos que recebem tratamento profilático ou terapêutico.

[00137] Quando aqui usado, o termo “indivíduo” inclui qualquer animal humano ou não humano. Por exemplo, os métodos e composições aqui descritos podem ser usados para tratar um indivíduo com câncer. O termo “animal não humano” inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, como primatas não humanos, ovelhas, cães, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

[00138] O termo dose ou dosagem “com base no peso”, como aqui referido, significa que uma dose que é administrada a um paciente é calculada com base no peso do paciente. Por exemplo, quando um paciente com 60 kg de peso corporal requer 3 mg/kg de um anticorpo anti-MICA/B, pode-se calcular e usar a quantidade apropriada do anticorpo anti-MICA/B (ou seja, 180 mg) para administração.

[00139] O uso do termo “dose fixa” em relação às combinações aqui descritas significa que dois ou mais anticorpos diferentes (por exemplo, anticorpo anti-MICA/B e um segundo anticorpo, por exemplo, um anticorpo PD-1 ou PD-L1) estão presentes na composição ou administrados separadamente em quantidades ou proporções (fixas) particulares entre si. Em algumas modalidades, a dose fixa é baseada no peso (por exemplo, mg) dos anticorpos. Em algumas modalidades, a dose fixa é baseada na concentração (por exemplo, mg/ml) dos anticorpos. Em algumas modalidades, a relação dos dois anticorpos (por exemplo, anti-MICA/B e anti-PD1 ou anti-PD-L1) é de pelo menos cerca de 1:1, cerca de 1:2, cerca de 1:3, cerca de 1:4, cerca de 1:5, cerca de 1:6, cerca de 1:7, cerca de 1:8, cerca de 1:9, cerca de 1:10, cerca de 1:15, cerca de 1:20, cerca de 1:30, cerca de 1:40, cerca de 1:50, cerca de 1:60, cerca de 1:70, cerca de 1:80, cerca de 1:90, cerca de 1:100, cerca de 1:120, cerca de 1:140, cerca de 1:160, cerca de 1:180, cerca de 1:200, cerca de 200:1, cerca de 180:1, cerca de 160:1, cerca de 140:1, cerca de 120:1, cerca de 100:1, cerca de 90:1, cerca de 80:1, cerca de 70:1, cerca de 60:1, cerca de 50:1, cerca de 40:1, cerca de 30:1, cerca de 20:1, cerca de 15:1, cerca de 10:1, cerca de 9:1, cerca de 8:1, cerca de 7:1, cerca de 6:1, cerca de 5:1, cerca de 4:1, cerca de 3:1, or cerca de 2: 1 mg do primeiro anticorpo (por exemplo, anticorpo anti-MICA/B) para mg do segundo anticorpo. Por exemplo, uma relação de 2:1 de um anticorpo anti-MICA/B e um anticorpo anti-PD-1, como nivolumabe, pode significar que um frasco ou uma injeção pode conter cerca de 480 mg do anticorpo anti-MICA/B e 240 mg do anticorpo anti-PD-1, ou cerca de 2 mg/ml do anticorpo anti-MICA/B e 1 mg/ml do anticorpo anti-PD-1.

[00140] O uso do termo “dose plana” em relação aos métodos e dosagens aqui descritos significa uma dose que é administrada a um paciente sem levar em conta o peso ou a área de superfície corporal

(BSA) do paciente. A dose fixa, portanto, não é fornecida como uma dose de mg/kg, mas sim como uma quantidade absoluta do agente (por exemplo, o anticorpo anti-MICA/B). Por exemplo, uma pessoa de 60 kg e uma pessoa de 100 kg receberiam a mesma dose de um anticorpo (por exemplo, 480 mg de um anticorpo anti-MICA/B).

[00141] Quando aqui usados, os termos “ug” e “uM” são usados indistintamente com “µg” e “µM”, respectivamente.

[00142] Vários aspectos aqui descritos são descritos em mais detalhes nas seguintes subseções.

II. Anticorpos MICA/B anti-humana

[00143] São aqui descritos anticorpos, por exemplo, anticorpos totalmente humanos, que são capazes de se ligar especificamente à sequência A/B relacionada ao polipeptídeo de MHC classe I (MICA/B) e inibir, prevenir ou reduzir a liberação de MICA/B por células tumorais, desse modo aumentando a retenção de MICA/B na superfície das células tumorais. Por exemplo, os anticorpos ligam-se especificamente a MICA/B humana e, mais especificamente, a um domínio particular (por exemplo, o domínio α3) dentro do domínio extracelular de MICA humana. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam especificamente a MICA/B, reduzindo assim o nível de MICA/B no soro, enquanto os anticorpos aumentam o nível de MICA/B ligado à membrana. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B apresentam reação cruzada com MICA/B de um ou mais primatas não humanos, como MICA/B cinomolga. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam especificamente ao domínio α3 de MICA/B humana e ao domínio α3 de MICA/B cinomolga. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam a MICA/B humana com alta afinidade.

[00144] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos exibem uma ou mais das seguintes propriedades funcionais:

(a) ligação a MICA/B humana ligada à membrana;

(b) ligação à MICA/B de cino ligada à membrana;

(c) redução do nível de MICA/B solúvel no soro de um indivíduo;

(d) aumento da MICA/B ligada à membrana em uma célula tumoral;

(e) inibir, prevenir ou reduzir a liberação de MICA/B por uma célula tumoral;

(f) mediação do processamento e/ou apresentação cruzada do antígeno realçado por uma célula;

(g) mediar ADCC e/ou ADCP realçado;

(h) inibir o crescimento tumoral e/ou metástase;

(i) redução do volume do tumor;

(j) aumentar a sobrevida livre de progressão;

(k) aumentar a sobrevida global; e

(l) qualquer combinação dos mesmos.

[00145] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos se ligam a MICA/B humana com alta afinidade, por exemplo, com uma K_D de 10^{-6} M ou menos, 10^{-7} M ou menos, 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M ou menos, 10^{-10} M ou menos, 10^{-11} M ou menos, 10^{-12} M ou menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, ou 10^{-9} M a 10^{-7} M. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a MICA/B humana, por exemplo, conforme determinado por Ressonância de Plasmônio Superficial, por exemplo usando BIACORE™ (por exemplo, conforme descrito nos Exemplos), com uma K_D de 10^{-6} M ou menos, 10^{-7} M ou menos, 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M (1 nM) ou menos, 10^{-10} M ou menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, 10^{-9} M a 10^{-7} M ou 10^{-8} M a 10^{-7} M. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B se liga a sMICA/B humana, por exemplo, conforme determinado por ELISA, por exemplo, um kit MICA/B ELISA, por exemplo, ABCAM ab100592, com uma EC_{50} de 100 nM ou menos, 10

nM ou menos, 1 nM ou menos, 100 nM a 0,01 nM, 100 nM a 0,1 nM, 100 nM a 1 nM, ou 10 nM a 1 nM, ou 10 ug/mL ou menos, 5 ug/mL ou menos, 1 ug/mL ou menos, 0,9 ug/mL ou menos, 0,8 ug/mL ou menos, 0,7 ug/mL ou menos, 0,6 ug/mL ou menos, 0,5 ug/mL ou menos, 0,4 ug/mL ou menos, 0,3 ug/mL ou menos, 0,2 ug/mL ou menos, 0,1 ug/mL ou menos, 0,05 ug/mL ou menos, ou 0,01 ug/mL ou menos. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos se ligam a MICA/B cino, por exemplo, com uma K_D de 10^{-6} M ou menos, 10^{-7} M ou menos, 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M ou menos, $10^{-}10$ M ou menos, 10^{-11} M ou menos, 10^{-12} M ou menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, ou 10^{-9} M a 10^{-7} M. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B se liga a MICA/B de cino solúvel, por exemplo, conforme determinado por BIACORE™ (por exemplo, conforme descrito nos Exemplos), com uma K_D de 10^{-6} M ou menos, 10^{-7} M ou menos, 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M (1 nM) ou menos, 10^{-10} M ou menos, 10^{-12} M a 10^{-7} M, 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M, 10^{-9} M a 10^{-7} M, ou 10^{-8} M a 10^{-7} M. Os anticorpos anti-MICA/B podem se ligar à sMICA/B cinomolga, por exemplo, com uma EC_{50} de 100 nM ou menos, 10 nM ou menos, 100 nM a 0,01 nM, 100 nM a 0,1 nM, 100 nM a 1 nM, ou 10 nM a 1 nM, por exemplo, como medido por ELISA (por exemplo, conforme descrito nos Exemplos).

[00146] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente à MICA/B humana com uma K_D de cerca de 5 x 10-4 M ou menos, cerca de 1 x 10-4 M ou menos, 5 x 10-5 M ou menos, cerca de 1 x 10-5 M ou menos, cerca de 1 x 10^{-6} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-7} M ou menos, ou cerca de 1 x 10^{-8} M ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA humano MICA*002 com uma K_D de cerca de 1 x 10^{-4} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-5} M ou menos, 1 x 10^{-6} M ou menos,

cerca de 1 x 10^{-7} M ou menos, ou cerca de 1 x 10^{-8} M ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA humano MICA*004 com uma K_D de cerca de 1 x 10^{-4} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-5} M ou menos, 1 x 10^{-6} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-7} M ou menos, ou cerca de 1 x 10^{-8} M ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA humano MICA*008 com uma K_D de cerca de 1 x 10^{-4} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-5} M ou menos, 1 x 10^{-6} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-7} M ou menos, ou cerca de 1 x 10^{-8} M ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA humano MICA*009 com uma K_D de cerca de 1 x 10^{-4} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-5} M ou menos, 1 x 10^{-6} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-7} M ou menos, ou cerca de 1 x 10^{-8} M ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICB humano MICB*005 com uma K_D de cerca de 1 x 10^{-4} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-5} M ou menos, 1 x 10^{-6} M ou menos, cerca de 1 x 10^{-7} M ou menos, ou cerca de 1 x 10^{-8} M ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore).

[00147] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente à MICA/B humana com uma taxa de constante de associação (k_a) de pelo menos cerca de 1 x 10^3 ms^{-1}, pelo menos cerca de 5 x 10^3 ms^{-1}, pelo menos cerca de 1 x 10^4 ms^{-1}, pelo menos cerca de 5 x 10^4 ms^{-1}, pelo menos cerca de 1 x 10^5 ms^{-1}, pelo menos cerca de 5 x 10^5 ms^{-1}, ou pelo menos cerca de 1 x 10^6 ms^{-1}, em que k_a é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore).

[00148] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente à MICA/B humana com uma taxa de constante de dissociação (k_d) de cerca de 0,1 s^{-1} ou menos, 0,05 s^{-1} ou menos, 0,01 s^{-1} ou menos, 5 x 10^{-3} s^{-1} ou menos, 1 x 10^{-3} s^{-1} ou menos, 5 x 10^{-4} s^{-1} ou menos, 1 x 10^{-4} s^{-1} ou menos, 5 x 10^{-5} s^{-1} ou menos, ou 1 x 10^{-5} s^{-1} ou menos, em que K_D é medida por análise por ressonância de plasmônio superficial (Biacore).

[00149] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente a MICA/B. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a MICA e MICB. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA*002. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA*004. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA*008. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA*009. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga especificamente ao alelo MICA*002, ao alelo MICA*004, ao alelo MICA*008 e ao alelo MICA*009. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga ao alelo MICA*002 com uma afinidade maior do que o alelo MICA*004, o alelo MICA*008 ou o alelo MICA*009. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga ao alelo MICA*004 com uma afinidade maior do que o alelo MICA*002, o alelo MICA*008 ou o alelo MICA*008. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga ao alelo MICA*008 com uma afinidade maior do que o alelo MICA*002, o alelo MICA*004 ou o alelo MICA*009. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga ao alelo MICA*009 com uma afinidade maior do que o alelo MICA*002, o alelo MICA*004 ou o alelo MICA*008.

[00150] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região va-

riável da cadeia leve (VL); em que a VH compreende uma região determinante de complementaridade V_H (CDR) 1 (VH-CDR1), uma VH-CDR2 e uma VH-CDR3 e a VL compreende uma VL-CDR1, uma VL-CDR2 e uma VL-CDR3; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37 e 47. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37 e 47. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos conforme apresentado em SEQ ID NO: 7.

[00151] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36 e 46. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36 e 46. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR2 compreendendo o aminoácido sequência conforme apresentado na SEQ ID NO: 6.

[00152] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo

menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35 e 45. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35 e 45. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos como apresentado na SEQ ID NO: 5.

[00153] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8, 18, 28, 38 e 48. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8, 18, 28, 38 e 48. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos como apresentado na SEQ ID NO: 8.

[00154] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 9, 19, 29, 39 e 49. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que

consiste em SEQ ID NOs: 9, 19, 29, 39 e 49. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos como apresentado na SEQ ID NO: 9.

[00155] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40 e 50. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40 e 50. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos como apresentado na SEQ ID NO: 10.

[00156] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 6, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 8, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 9, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B é hipofucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo de referência compreendendo uma VH-CDR1 que com-

preende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 6, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 8, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 9, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo de referência compreendendo uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 6, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 8, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 9, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 10.

[00157] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 15, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 16, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 18, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 19, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B é hipofucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-

MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA humana com um anticorpo de referência compreendendo uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 15, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentado na SEQ ID NO: 16, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 18, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 19, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 20.

[00158] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 25, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 26, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 27, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 28, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 29, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B é hipofucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA humana com um anticorpo de referência compreendendo uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 25, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentado em SEQ ID NO: 26, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 27, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 28, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de ami-

noácidos apresentada em SEQ ID NO: 29, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 30.

[00159] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 35, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 36, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 37, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 38, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 39, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B é hipofucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA humana com um anticorpo de referência compreendendo uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 35, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 36, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 37, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 38, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 39, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 40.

[00160] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 45, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 46, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 47, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de ami-

noácidos apresentada em SEQ ID NO: 48, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 49, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 50. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B não é fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B é hipofucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA humana com um anticorpo de referência compreendendo uma VH-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 45, uma VH-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentado em SEQ ID NO: 46, uma VH-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 47, uma VL-CDR1 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 48, uma VL-CDR2 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 49, e uma VL-CDR3 que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 50.

[00161] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32 e 42. Em certas modalidades, a V_H compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32 e 42.

[00162] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos

com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34 e 44. Em certas modalidades, a V_L compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34 e 44

[00163] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 . Em certas modalidades, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 4 . Em certas modalidades, a V_L compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e a V_L compreende a

sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma VH que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4, em que o anticorpo é não fucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58 (também referido como “G236A” de acordo com a numeração de UE)

[00164] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 12 . Em certas modalidades, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 12. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 14. Em certas modalida-

des, a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 14. Em outra modalidade, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 12 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 14. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo que compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 12 e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58.

[00165] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 22 . Em certas modalidades, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 24 . Em certas modalidades, a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na

SEQ ID NO: 24. Em um, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 22 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 24. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma VH que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 22 e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58.

[00166] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 32 . Em certas modalidades, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 32. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 34 . Em certas modalidades, a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34. Em outra modalidade, a VH compreende a sequência

de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 32 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 tendo uma inserção de um resíduo Ser entre as posições 95 e 96 da SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, a VL compreende o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID NO: 34 tendo uma inserção de um resíduo Ala entre as posições 95 e 96 da SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 tendo uma inserção de um Resíduo Gly entre as posições 95 e 96 da SEQ ID NO: 34. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma VH que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 32 e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58.

[00167] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 42 . Em certas modalidades, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma VL que compreende uma sequência de aminoácidos

com pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 44 . Em certas modalidades, a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 44. Em outra modalidade, a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 42 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 44.

[00168] Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma VH que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 42 e uma VL que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 44. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência a um sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 58, 62, 66, 70 e 74. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 58, 130, 62, 66, 70 e 74. Em certas modalidades, a se-

quência de aminoácidos de cadeia pesada compreende uma ou mais deleções, substituições ou mutações na região constante de imunoglobulina, por exemplo, dentro do domínio CH1, o domínio CH2, o domínio CH3 ou a região de articulação.

[00169] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência a um sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 60, 64, 68, 72 e 76. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 60, 64, 68, 72 e 76.

[00170] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 130. Em algumas modalidades,

o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 60. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 58 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60. Em uma modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 130 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 60. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 58 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 60, em que o anticorpo é não fucosilado. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 130 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 60, em que o anticorpo é não fucosilado. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID

NO: 58 e uma cadeia leve compreendendo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID NO: 60.

[00171] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 62. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 62. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 64. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 64. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 62 e uma cadeia leve que compre-

ende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 64. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 62 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 64.

[00172] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 66. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 66. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 6 0 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 68. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo

uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 68. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 66 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 68. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 66 e uma cadeia leve compreendendo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID NO: 68.

[00173] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 70. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 70. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos

cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 72. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 72. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 70 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 72. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 70 e uma cadeia leve compreendendo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID NO: 72.

[00174] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 74. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 74. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MIC/BA compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo

menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 % ou pelo menos cerca de 99 % de identidade de sequência com o sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 76. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 74 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 76. Em outra modalidade, o anticorpo anti-MICA/B compete cruzadamente pela ligação à MICA/B humana com um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 74 e uma cadeia leve compreendendo o conjunto de sequência de aminoácidos adiante na SEQ ID NO: 76.

[00175] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito é selecionado a partir do grupo que consiste em uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3, uma IgG4 ou uma variante das mesmas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito é um anticorpo IgG1. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito não é fucosilado. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito é hipofucosilado.

[00176] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito é um anticorpo humano. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito é um anticorpo quimérico.

[00177] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B aqui descrito compreende uma região constante de cadeia pesada, compreendendo uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao

resíduo 234 na SEQ ID NO: 58.

A. Epítopos de MICA/B humana

[00178] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo específico na MICA/B humana. O termo “epítopo”, quando aqui usado, inclui qualquer determinante capaz de ser ligado por uma proteína de ligação ao antígeno, como um anticorpo. Um epítopo é uma região de um antígeno que é ligada por uma proteína de ligação ao antígeno que tem como alvo esse antígeno, e quando o antígeno é uma proteína, inclui aminoácidos específicos que contatam diretamente a proteína de ligação ao antígeno. Determinantes de epítopo podem incluir agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforila ou sulfonila e podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas. Geralmente, os anticorpos específicos para um determinado antígeno alvo reconhecerão preferencialmente um epítopo no antígeno alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas.

[00179] Em algumas modalidades, o epítopo compreende pelo menos um aminoácido, pelo menos dois aminoácidos, pelo menos três aminoácidos, pelo menos quatro aminoácidos, pelo menos cinco aminoácidos, pelo menos seis aminoácidos, pelo menos sete aminoácidos, em pelo menos oito aminoácidos, pelo menos nove aminoácidos ou pelo menos dez aminoácidos. Quando o epítopo compreende mais de um aminoácido, mais de um aminoácido pode ser sequencial, por exemplo, G254 e D255, ou separados por mais de um aminoácido que não interage diretamente com o anticorpo anti-MICA/B ou que é não é necessário para ligação anti-MICA/B, por exemplo, D255 e L257. Em algumas modalidades, o epítopo compreende dois aminoácidos sequenciais, três aminoácidos sequenciais, quatro aminoácidos sequenciais, cinco aminoácidos sequenciais, seis aminoácidos sequenciais,

sete aminoácidos sequenciais, oito aminoácidos sequenciais, nove aminoácidos sequenciais, dez aminoácidos sequenciais ácidos, ou mais de dez aminoácidos sequenciais. Em algumas modalidades, o epítopo compreende pelo menos dois aminoácidos que não estão em localização sequencial, mas que estão posicionados na proximidade quando a MICA/B humana está presente em sua confirmação tridimensional.

[00180] Um epítopo em um antígeno, por exemplo, um epítopo em MICA/B humana que está ligado por um anticorpo anti-MICA/B, pode ser identificado usando qualquer método conhecido na técnica. Em algumas modalidades, o epítopo é determinado usando exibição de superfície de levedura. Em algumas modalidades, o epítopo é determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

[00181] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na superfície da MICA humana. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo dentro do domínio α3 de MICA humana.

[00182] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 190 e 230 da SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre aminoácidos 195 e 225 de SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana localizado entre os aminoácidos 200 e 221 de SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo L201-N220 correspondente a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um

epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NO: 56, conforme determinado por HDX-MS.

[00183] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 230 e 260 da SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre aminoácidos 235 e 255 da SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 237 e 253 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo T238-Q252 correspondente a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de permuta de hidrogênio/deutério (HDX-MS). Em algumas modalidades, o anti -MICA/B anticorpo se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NO: 57, conforme determinado por HDX-MS.

[00184] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo L201-N220 e T238-Q252 correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NOs: 56 e 57, conforme determinado por HDX-MS.

[00185] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 140 e 170 da SEQ ID NO: 51. Em modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 145 e 165 da SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 149 e 164 de SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a

um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NO: 52, conforme determinado por HDX-MS.

[00186] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 220 e 250 da SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre aminoácidos 225 e 245 de SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana localizado entre os aminoácidos 230 e 239 de SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NO: 53, conforme determinado por HDX-MS. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo N234 e/ou L237, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS.

[00187] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 245 e 275 da SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre aminoácidos 250 e 270 de SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana localizado entre os aminoácidos 252 e 268 de SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NO: 55, conforme determinado por HDX-MS. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 254 e 266 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NO: 54, conforme determinado por HDX-MS. Em certas

modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana compreendendo os aminoácidos D255-Q265 e W267, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por HDX-MS.

[00188] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NOs: 52-54, conforme determinado por HDX-MS. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo SEQ ID NOs: 52, 53 e 55, conforme determinado por HDX-MS.

[00189] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 230 e 290 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 235 e 285 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 239 e 280 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 230 e 250 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 235 e 250 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 239 e 245 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

[00190] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 245 e

275 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 250 e 270 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 253 e 268 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana localizado entre os aminoácidos 257 e 265 da SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

[00191] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267, e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em G254, D255, L257, Y264 e W267, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela superfície de levedura exibição. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo compreendendo os aminoácidos G254, D255, L257, Y264 e W267, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

[00192] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em R240, Q241, D242, V244 e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo compreendendo os aminoácidos R240,

Q241, D242, V244 e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

[00193] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em P258, G260, G262 e Y264, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo compreendendo os aminoácidos P258, G260, G262 e Y264, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

[00194] Em certas modalidades, quando o anticorpo anti-MICA/B está ligado à MICA humana, o anticorpo é posicionado a cerca de 30 angstroms ou menos, 25 angstroms ou menos, 30 angstroms ou menos, cerca de 15 angstroms ou menos, cerca de 10 angstroms ou menos, cerca de 9 angstroms ou menos, cerca de 8 angstroms ou menos, cerca de 7 angstroms ou menos, cerca de 6 angstroms ou menos, cerca de 5 angstroms ou menos, cerca de 4 angstroms ou menos, cerca de 3 angstroms ou menos, ou cerca de 2 angstroms ou menos de em pelo menos um dos seguintes resíduos de MICA humana: R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por cristalografia, por exemplo, usando as condições aqui descritas. Em algumas modalidades, quando o anticorpo anti-MICA/B está ligado à MICA humana, o anticorpo é posicionado a cerca de 10 angstroms ou menos de pelo menos um dos seguintes resíduos de MICA humana: R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por cristalografia, por exemplo, usando as condições aqui descritas. Em algumas modalidades, quando o anticorpo anti-MICA/B está ligado à MICA humana, o anticorpo é posicionado a

cerca de 10 angstroms ou menos de pelo menos um dos seguintes resíduos de MICA humana: G254, D255, L257, Y264 e W267, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por cristalografia, por exemplo, usando as condições aqui descritas. Em algumas modalidades, quando o anticorpo anti-MICA/B está ligado à MICA humana, o anticorpo é posicionado a cerca de 10 angstroms ou menos de pelo menos um dos seguintes resíduos de MICA humana: R240, Q241, D242, V244 e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por cristalografia, por exemplo, usando as condições aqui descritas. Em algumas modalidades, quando o anticorpo anti-MICA/B está ligado à MICA humana, o anticorpo é posicionado a cerca de 10 angstroms ou menos de pelo menos um dos seguintes resíduos de MICA humana: P258, G260, G262 e Y264, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por cristalografia, por exemplo, usando as condições aqui descritas. Em certas modalidades, quando o anticorpo anti-MICA/B está ligado à MICA humana, o anticorpo é posicionado a cerca de 30 angstroms ou menos, 25 angstroms ou menos, 20 angstroms ou menos, cerca de 15 angstroms ou menos, cerca de 10 angstroms ou menos, cerca de 9 angstroms ou menos, cerca de 8 angstroms ou menos, cerca de 7 angstroms ou menos, cerca de 6 angstroms ou menos, cerca de 5 angstroms ou menos, cerca de 4 angstroms ou menos, cerca de 3 angstroms ou menos, ou cerca de 2 angstroms ou menos de em pelo menos um dos seguintes resíduos de MICA humana: R240, Q241, D242, V244, G254, D255, L257, P258, G260, G262, Y264, W267 e R279, correspondendo a SEQ ID NO: 51, conforme determinado por cocristalografia de raios X, por exemplo, usando as condições aqui descritas.

[00195] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo na MICA humana compreendendo pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo

menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo pelo menos dois resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo pelo menos quatro resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo pelo menos seis resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B se liga a um epítopo em MICA humana compreendendo T222, T224, R226, W233, N 234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X.

[00196] Um domínio VH, ou um ou mais CDRs dos mesmos, aqui descritos podem ser ligados a um domínio constante para formar uma cadeia pesada, por exemplo, uma cadeia pesada de tamanho natural. Da mesma forma, um domínio VL, ou um ou mais CDRs dos mesmos, aqui descritos podem ser ligados a um domínio constante para formar

uma cadeia leve, por exemplo, uma cadeia leve de tamanho natural. Uma cadeia pesada de tamanho natural (opcionalmente com exceção da lisina de terminal C (K) ou com exceção da glicina de terminal C e lisina (GK), que podem estar ausentes) e cadeia leve de tamanho natural podem se combinar para formar um anticorpo de tamanho natural.

[00197] Um domínio VH aqui descrito pode ser fundido ao domínio constante de um IgG humano, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, que são de ocorrência natural ou modificados, por exemplo, conforme descrito adicionalmente aqui. Por exemplo, um domínio VH pode compreender a sequência de aminoácidos de qualquer domínio VH aqui descrito fundido a uma IgG humana, por exemplo, uma IgG1, região constante, tal como a seguinte sequência de aminoácidos de domínio constante de IgG1 humana de tipo selvagem:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL-
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT-
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS-
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA-
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN-
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)

ou de uma variante alotípica de SEQ ID NO: 91 e tem as seguintes sequências de aminoácidos:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL-
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT-
KVDK**R**VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS-
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA-
KGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN-

GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN-VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92; os resíduos de aminoácidos específicos de alótipos estão em negrito e sublinhados).

[00198] Um domínio VH de um anticorpo anti-MICA/B pode compreender a sequência de aminoácidos de qualquer domínio VH aqui descrito fundido a uma região constante sem efetor, por exemplo, as seguintes sequências de aminoácidos de domínio constante de IgG1 humana sem efetor:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**R**VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93; “IgG1.1f,” compreendendo substituições L234A, L235E, G237A, A330S e P331S, que estão sublinhadas)

ou

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**R**VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**E**E**M**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94; “IgG1.3f”, compreendendo substituições L234A, L235E e G237A, que estão sublinhadas).

[00199] Por exemplo, uma variante alotípica de IgG1 compreende K97R, D239E e/ou L241M (sublinhado e em negrito acima) conforme

numerado em SEQ ID NOs: 91. Dentro da região constante de cadeia pesada de tamanho natural, por exemplo, MICA.36 (SEQ ID NO : 58) e de acordo com a numeração de UE, essas substituições de aminoácidos são numeradas K214R, D356E e L358M. Em algumas modalidades, a região constante de um anticorpo anti-MICA/B pode compreender ainda uma ou mais mutações ou substituições nos aminoácidos L117, A118, G120, A213 e P214 (sublinhado acima) conforme numerado na SEQ ID NO: 92, 93 e 94 ou L234, A235, G237, A330 e P331, de acordo com a numeração EU. Em algumas modalidades, a região constante de um anticorpo anti-MICA/B compreende uma ou mais mutações ou substituições nos aminoácidos L117A, A118E, G120A, A213S e P214S de SEQ ID NO: 91, ou L234A, L235E, G237A, A330S e P331S, por numeração EU. A região constante de um anticorpo anti-MICA/B também pode compreender uma ou mais mutações ou substituições L117A, A118E e G120A de SEQ ID NO: 91, ou L234A, L235E e G237A, por numeração EU

[00200] Alternativamente, um domínio VH de um anticorpo anti-MICA/B pode compreender a sequência de aminoácidos de qualquer domínio VH aqui descrito fundido a uma região constante de IgG4 humana, por exemplo, a seguinte sequência de aminoácidos de IgG4 humana ou suas variantes:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K (SEQ ID NO: 95, compreendendo S228P).

[00201] Um domínio VL aqui descrito pode ser fundido ao domínio

constante de uma cadeia leve Kappa ou Lambda humana. Por exemplo, um domínio VL de um anticorpo anti-MICA/B pode compreender a sequência de aminoácidos de qualquer domínio VL aqui descrito fundido à seguinte sequência de aminoácidos de cadeia leve kappa de IgG1 humana:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK-
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT-
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 96)

[00202] Em algumas modalidades, a região constante de cadeia pesada compreende uma lisina ou outro aminoácido no terminal C, por exemplo, compreende os seguintes últimos aminoácidos: LSPGK (SEQ ID NO: 97) na cadeia pesada. Em algumas modalidades, a região constante de cadeia pesada está sem um ou mais aminoácidos no terminal C e tem, por exemplo, a sequência de terminal C LSPG (SEQ ID NO: 98) ou LSP (SEQ ID NO: 99).

[00203] As sequências de aminoácidos de cadeias pesadas e leves exemplares são aqui descritas.

[00204] São fornecidos aqui anticorpos MICA/B anti-humanos isolados, ou porção de ligação ao antígeno dos mesmos, compreendendo:

(a1) sequências de cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs: 58 e 60, respectivamente;

(a2) sequências de cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs: 130 e 60, respectivamente;

(a3) sequências de cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs: 62 e 64, respectivamente;

(a4) sequências de cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs: 66 e 68, respectivamente;

(a5) sequências de cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs: 70 e 72, respectivamente;

(a6) sequências de cadeia pesada e leve compreendendo

SEQ ID NOs: 74 e 76, respectivamente;
em que o anticorpo se liga especificamente à MICA/B humana.

[00205] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B compreende uma combinação de sequências de cadeia pesada e leve aqui apresentadas, por exemplo, no parágrafo anterior, em que o anticorpo compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, e pode ainda compreender pelo menos uma ligação dissulfeto ligando as duas cadeias pesadas. Os anticorpos também podem compreender ligações dissulfeto ligando cada uma das cadeias leves a cada uma das cadeias pesadas.

[00206] Cadeias pesadas e leves compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % ou 70 % idêntica a qualquer uma das cadeias apresentadas aqui (ou suas regiões variáveis), por exemplo, SEQ ID NOs: 58 e 60, podem ser usadas para formar anticorpos MICA/B anti-humanos com as características desejadas, por exemplo, aqueles descritos posteriormente. Variantes exemplares são aquelas que compreendem uma variação alotípica, por exemplo, no domínio constante e/ou uma mutação na região variável ou constante, como as mutações aqui descritas. Cadeias pesadas e leves que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere em no máximo 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 ou 1 aminoácido (por substituição, adição ou deleção) de qualquer uma das cadeias pesadas ou leves aqui apresentadas (ou suas regiões variáveis) pode ser usado para formar anticorpos anti-MICA humanas tendo as características desejadas, por exemplo, aqueles descritos adicionalmente aqui.

[00207] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene particular de imunoglobulina de cadeia pesada de linha germinativa e/ou uma região variável de cadeia leve de um gene particular de imunoglobulina

de cadeia leve de linha germinativa.

[00208] Conforme demonstrado aqui, anticorpos humanos específicos para MICA/B foram preparados que compreendem uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de uma linha germinal humana. Por conseguinte, são fornecidos aqui anticorpos monoclonais isolados, ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene da linha germinal VH humana selecionado do grupo que consiste em: 3-09, 3-10, 3-33, 3-48, 5-51, 6-13, JH3b, JH4b, JH6b e qualquer combinação dos mesmos e qualquer combinação dos mesmos.

[00209] Foram preparados anticorpos humanos específicos para MICA/B que compreendem uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de uma linha germinal humana. Por conseguinte, são fornecidos aqui anticorpos monoclonais isolados, ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos, compreendendo uma região variável da cadeia leve que é o produto ou derivada de um gene da linha germinal VK humana selecionado do grupo que consiste em: A27, L6, L18, JK1, JK2, JK3, JK5 e qualquer combinação dos mesmos e qualquer combinação dos mesmos.

[00210] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos incluem aqueles que compreendem uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um dos genes VH da linha germinativa humana listados acima e também compreendendo uma região variável da cadeia leve que é o produto ou derivada de um dos genes VK da linha germinativa humana listados acima, como mostrado nas Figuras.

[00211] Quando aqui usado, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada e leve que são “o produto de” ou “derivadas de” uma sequência de linha germinativa particular se as regiões variáveis do anticorpo são obtidas de um sistema que usa genes

de imunoglobulina de linha germinativa humana. Tais sistemas incluem a imunização de um camundongo transgênico carregando genes de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou a triagem de uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana exibida no fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é “o produto de” ou “derivado de” uma sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana pode ser identificado como tal comparando a sequência de aminoácidos do anticorpo humano com as sequências de aminoácidos de imunoglobulinas de linha germinativa humana e selecionando a imunoglobulina de linha germinativa humana sequência que é a mais próxima na sequência (ou seja, maior % de identidade) à sequência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é “o produto de ou” derivado de “uma sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana particular pode conter diferenças de aminoácidos em comparação com a sequência de linha germinativa, devido a, por exemplo, mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação. No entanto, um anticorpo humano selecionado é tipicamente pelo menos 90 % idêntico na sequência de aminoácidos a uma sequência de aminoácidos codificada por um gene de imunoglobulina de linha germinativa humana e contém resíduos de aminoácidos que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com a imunoglobulina de linha germinativa sequências de aminoácidos de outras espécies (por exemplo, sequências de linha germinativa de murino). Em alguns casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95 %, ou mesmo pelo menos 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntico na sequência de aminoácidos à sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma sequência particular da linha germinativa humana exibirá não mais do que 10 diferenças de aminoácidos da sequência de aminoácidos codificada pelo gene da

imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode exibir não mais do que 5, ou mesmo não mais do que 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácidos da sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa.

[00212] Os anticorpos anti-MICA/B podem compreender uma região variável de cadeia pesada compreendendo sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo sequências de CDR1, CDR2 e CDR3, em que uma ou mais dessas sequências de CDR compreendem sequências de aminoácidos especificadas com base no anticorpos anti-MICA/B aqui descritos, ou modificações conservadoras dos mesmos, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos.

[00213] As substituições conservadoras de aminoácidos podem ser feitas em porções dos anticorpos diferentes ou além das CDRs. Por exemplo, modificações conservadoras de aminoácidos podem ser feitas em uma região estrutural ou na região Fc. Uma região variável ou uma cadeia pesada ou leve pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1 -25, ou 1-50 substituições conservadoras de aminoácidos em relação às sequências de anticorpos anti-MICA/B aqui fornecidas. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B compreende uma combinação de modificação de aminoácidos conservadora e não conservadora.

[00214] Também são fornecidos anticorpos modificados e modificados que podem ser preparados usando um anticorpo com uma ou mais das sequências VH e/ou VL descritas aqui como material de partida para projetar um anticorpo modificado, cujo anticorpo modificado pode ter propriedades alteradas do anticorpo inicial. Um anticorpo pode ser manipulado modificando um ou mais resíduos dentro de uma ou ambas as regiões variáveis (isto é, VH e/ou VL), por exemplo, dentro

de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões estruturais. Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser manipulado modificando resíduos dentro da (s) região (ões) constante (s), por exemplo, para alterar a (s) função (ões) efetora (s) do anticorpo.

[00215] Um tipo de modificação de região variável que pode ser realizada é o enxerto de CDR. Os anticorpos interagem com os antígenos alvo predominantemente por meio de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) das cadeias pesada e leve. Por esta razão, as sequências de aminoácidos dentro das CDRs são mais diversas entre os anticorpos individuais do que as sequências fora das CDRs. Como as sequências de CDR são responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitam as propriedades de anticorpos específicos de ocorrência natural construindo vetores de expressão que incluem sequências de CDR do anticorpo específico de ocorrência natural enxertado em sequências estruturais de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (veja, por exemplo, Riechmann, L. *et al*. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. *et al*. (1986) *Nature* 321: 522-525; Queen, C. *et al*. . (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 86: 10029-10033; Patente Norte-americana No. 5.225.539 de Winter e Patente Norte-americana No. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen *et al*.).

[00216] Por conseguinte, algumas modalidades aqui descritas referem-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 aqui descritas e uma região variável da cadeia leve compreendendo as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 aqui descrito. Assim, tais anticorpos contêm as sequências de CDR de VH e VL de anticorpos monoclonais

aqui descritos, mas podem conter sequências de estrutura diferentes destes anticorpos.

[00217] Tais sequências estruturais podem ser obtidas de bancos de dados públicos de DNA ou referências publicadas que incluem sequências de genes de anticorpos da linha germinativa. Por exemplo, sequências de DNA de linha germinativa para genes de região variável de cadeia leve e pesada humana podem ser encontradas no banco de dados de sequência de linha germinativa humana “VBase” (disponível na Internet em www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), também como em Kabat, EA, *et al*. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, *NIH Publication* No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al*. (1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” /. *Mol. Biol*. 227: 776-798; e Cox, J. P. L. *et al*. (1994) “A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” *Eur. J. Immunol*. 24: 827-836; os conteúdos de cada um dos quais são expressamente incorporados aqui por referência.

[00218] Em algumas modalidades, as sequências de estrutura para uso nos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos são aquelas que são estruturalmente semelhantes às sequências de estrutura usadas pelos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos. As sequências CDR1, CDR2 e CDR3 VH, e as sequências CDR1, CDR2 e CDR3 VL, podem ser enxertadas em regiões estruturais que têm a sequência idêntica àquela encontrada no gene de imunoglobulina da linha germinativa a partir do qual a sequência estrutural deriva, ou as sequências CDR podem ser enxertado em regiões estruturais que contêm uma ou mais mutações em comparação com as sequências da linha germinativa. Por exemplo, verificou-se que em certos casos é benéfico mutar resíduos dentro das regiões estruturais para manter ou aumentar a capacidade de li-

gação ao antígeno do anticorpo (veja, por exemplo, Patentes Norte-americanas 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; e 6.180.370 para Queen *et al*.).

[00219] Os anticorpos anti-MICA/B modificados aqui descritos incluem aqueles em que as modificações foram feitas para os resíduos de estrutura dentro de VH e/ou VL, por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Normalmente, essas modificações estruturais são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem é “retromutar” um ou mais resíduos de estrutura para a sequência da linha germinativa correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da sequência da linha germinativa da qual o anticorpo é derivado. Esses resíduos podem ser identificados comparando as sequências estruturais do anticorpo com as sequências da linha germinativa das quais o anticorpo é derivado. Para retornar as sequências da região estrutural à sua configuração da linha germinativa, as mutações somáticas podem ser “retromutadas” para a sequência da linha germinativa por, por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR. Esses anticorpos “retromutados” também se destinam a ser abrangidos. Outro tipo de modificação de estrutura envolve a mutação de um ou mais resíduos dentro da região de estrutura, ou mesmo dentro de uma ou mais regiões CDR, para remover epítopos de células T para assim reduzir a potencial imunogenicidade do anticorpo. Esta abordagem também é referida como “desimunização” e é descrita em mais detalhes na Publicação de Patente Norte-americana No. 20030153043 por Carr *et al*.

[00220] Outro tipo de modificação da região variável é fazer a mutação dos resíduos de aminoácidos nas regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 VH e/ou VL para, assim, melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse. A mutagê-

nese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a (s) mutação (ões) e o efeito na ligação do anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliada em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, conforme descrito aqui e fornecido no Exemplos. Em algumas modalidades, modificações conservadoras (como discutido acima) são introduzidas. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácidos. Além disso, normalmente não mais do que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos dentro de uma região CDR são alterados.

[00221] Resíduos de metionina em CDRs de anticorpos podem ser oxidados, resultando em degradação química potencial e consequente redução na potência do anticorpo. Por conseguinte, também são fornecidos anticorpos anti-MICA/B que têm um ou mais resíduos de metionina nas CDRs de cadeia pesada e/ou leve substituídos por resíduos de aminoácidos que não sofrem degradação oxidativa. Em algumas modalidades, os resíduos de metionina nas CDRs dos anticorpos MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 são substituídos por resíduos de aminoácidos que não sofrem degradação oxidativa.

[00222] Da mesma forma, os sítios de desamidação podem ser removidos dos anticorpos anti-MICA/B, particularmente nos CDRs.

[00223] As regiões variáveis anti-MICA/B aqui descritas podem ser ligadas (por exemplo, covalentemente ligadas ou fundidas) a um Fc, por exemplo, um Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, que pode ser de qualquer alótipo ou isoalótipo, por exemplo, para IgG1: G1m, G1ml (a), G1m2 (x), G1m3 (f), G1m17 (z); para IgG2: G2m, G2m23 (n); para IgG3: G3m, G3m21 (g1), G3m28 (g5), G3ml l (b0), G3m5 (b1), G3ml3 (b3), G3ml4 (b4), G3ml0 (b5), G3ml5 (s), G3ml6 (t), G3m6 (c3), G3m24 (c5), G3m26 (u), G3m27 (v); e para K: Km, Km1, Km2, Km3 (veja, por exemplo, Jefferies *et al*. (2009) mAbs 1: 1).

[00224] Geralmente, as regiões variáveis aqui descritas podem ser

ligadas a um Fc compreendendo uma ou mais modificações, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tais como meia-vida sérica, fixação de complemento, ligação ao receptor Fc, citotoxicidade celular dependente de antígeno, e/ou fagocitose celular dependente de anticorpos. Além disso, um anticorpo aqui descrito pode ser modificado quimicamente (por exemplo, uma ou mais porções químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar sua glicosilação, para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma dessas modalidades é descrita em mais detalhes abaixo. A numeração dos resíduos na região Fc é a do índice EU de Kabat.

[00225] A região Fc abrange domínios derivados da região constante de uma imunoglobulina, incluindo um fragmento, análogo, variante, mutante ou derivado da região constante. As imunoglobulinas adequadas incluem IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e outras classes, como IgA, IgD, IgE e IgM. A região constante de uma imunoglobulina é definida como um polipeptídeo de ocorrência natural ou produzido sinteticamente homólogo à região de terminal C da imunoglobulina, e pode incluir um domínio CH1, uma articulação, um domínio CH2, um domínio CH3 ou um domínio CH4, separadamente ou em combinação.

[00226] As moléculas de Ig interagem com várias classes de receptores celulares. Por exemplo, as moléculas de IgG interagem com três classes de receptores Fcγ (FcγR) específicos para a classe IgG do anticorpo, nomeadamente FcγRI, FcγRII e FcγRIII. Foi relatado que as sequências importantes para a ligação de IgG aos receptores FcγR estão localizadas nos domínios CH2 e CH3. A meia-vida sérica de um anticorpo é influenciada pela capacidade desse anticorpo de se ligar a um receptor Fc (FcR).

[00227] Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc variante, por exemplo, uma sequência Fc que foi modificada (por exem-

plo, por substituição de aminoácido, deleção e/ou inserção) em relação a uma sequência Fc parental (por exemplo, um polipeptídeo Fc não modificado que é subsequentemente modificado para gerar uma variante), para fornecer características estruturais desejáveis e/ou atividade biológica.

[00228] Geralmente, as variantes da região constante ou porções da mesma, por exemplo, domínios CH1, CL, articulação, CH2 ou CH3 podem compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais mutações, e/ou no máximo 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutação, ou 1-10 ou 1-5 mutações, ou compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntico ao da região ou domínio de tipo selvagem correspondente (domínio CH1, CL, articulação, CH2 ou CH3, respectivamente), desde que a região constante de cadeia pesada que compreende a variante específica retenha a atividade biológica necessária.

[00229] Por exemplo, pode-se fazer modificações na região Fc a fim de gerar uma variante Fc que (a) media citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo aumentada ou diminuída (ADCC) e/ou fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), (b) media citotoxicidade mediada por complemento aumentada ou diminuída (CDC), (c) aumentou ou diminuiu a afinidade para C1q e/ou (d) aumentou ou diminuiu a afinidade para um receptor Fc em relação ao Fc pai. Essas variantes da região Fc geralmente compreenderão pelo menos uma modificação de aminoácido na região Fc. A combinação de modificações de aminoácidos é considerada particularmente desejável. Por exemplo, a região Fc variante pode incluir duas, três, quatro, cinco, etc. substituições, por exemplo, das posições da região Fc específicas aqui identificadas.

[00230] Uma região Fc variante também pode compreender uma alteração de sequência em que os aminoácidos envolvidos na forma-

ção da ligação dissulfeto são removidos ou substituídos por outros aminoácidos. Tal remoção pode evitar a reação com outras proteínas contendo cisteína presentes na célula hospedeira usada para produzir os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos. Mesmo quando os resíduos de cisteína são removidos, os domínios Fc de cadeia simples ainda podem formar um domínio Fc dimérico que é mantido junto de forma não covalente. Em algumas modalidades, a região Fc pode ser modificada para torná-la mais compatível com uma célula hospedeira selecionada. Por exemplo, pode-se remover a sequência PA perto do terminal N de uma região Fc nativa típica, que pode ser reconhecida por uma enzima digestiva em E. coli, como a prolina iminopeptidase. Em algumas modalidades, um ou mais sítios de glicosilação dentro do domínio Fc podem ser removidos. Os resíduos que são tipicamente glicosilados (por exemplo, asparagina) podem conferir resposta citolítica. Esses resíduos podem ser deletados ou substituídos por resíduos não glicosilados (por exemplo, alanina). Em algumas modalidades, os sítios envolvidos na interação com o complemento, como o sítio de ligação C1q, podem ser removidos da região Fc. Por exemplo, pode-se deletar ou substituir a sequência EKK de IgG1 humana. Em algumas modalidades, os sítios que afetam a ligação aos receptores Fc podem ser removidos, de preferência sítios diferentes dos sítios de ligação do receptor de salvamento. Em algumas modalidades, uma região Fc pode ser modificada para remover um site ADCC. Os sítios ADCC são conhecidos na técnica; veja, por exemplo, *Molec. Immunol*. 29 (5): 633-9 (1992) no que diz respeito aos sítios ADCC em IgG1. Exemplos específicos de domínios Fc variantes são descritos, por exemplo, em WO 97/34631, WO 96/32478 e WO07/041635.

[00231] Em algumas modalidades, a região de articulação Fc é modificada de modo que o número de resíduos de cisteína na região de articulação seja alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Esta

abordagem é descrita adicionalmente na Patente Norte-americana No. 5.677.425 por Bodmer *et al*. O número de resíduos de cisteína na região de articulação Fc é alterado para, por exemplo, facilitar a montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo. Em algumas modalidades, a região de articulação Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácidos são introduzidas na região de interface do domínio CH2-CH3 do fragmento de articulação Fc de modo que o anticorpo tenha a ligação da proteína A estafilococcila A (SpA) prejudicada em relação à ligação do domínio de articulação Fc nativo SpA. Esta abordagem é descrita em mais detalhes na Patente Norte-americana No. 6.165.745 por Ward *et al*.

[00232] Em algumas modalidades, a região Fc é alterada pela substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente para alterar a (s) função (ões) efetora (s) do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 330 e/ou 331 podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tenha uma afinidade alterada para um ligante efetor, mas retém a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo parental. O ligante efetor para o qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente C1 do complemento. Esta abordagem é descrita em mais detalhes nas Patentes Norte-americanas Nos. 5.624.821 e 5.648.260, ambas por Winter *et al*.

[00233] Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados a partir dos resíduos de aminoácidos 329, 331 e 322 podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente, de modo que o anticorpo tenha a ligação de C1q alterada e/ou reduzida ou abolida citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Esta abordagem é descrita

com mais detalhes nas Patentes Norte-americanas Nos. 6.194.551 por Idusogie *et al*.

[00234] Em outro exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos nas posições de aminoácidos 231 e 239 são alterados para, assim, alterar a capacidade do anticorpo de fixar o complemento. Esta abordagem é descrita posteriormente na Publicação PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al*.

[00235] Em outro exemplo, a região Fc pode ser modificada para aumentar a afinidade para um Fcγ e aumentar a fagocitose mediada por macrófagos. Veja, por exemplo, Richard *et al*., Mo. Cancer. Ther. 7 (8): 2517-27 (2008), que é incorporado por referência aqui em sua totalidade. Em certas modalidades, a região Fc pode ser modificada para aumentar a afinidade para FcγRIIa em relação ao inibidor FcγRIIB. Uma mutação pontual particular, G236A (cuja numeração está de acordo com o índice EU), foi identificada como tendo afinidade aumentada para FcγRIIa em relação ao inibidor FcγRIIB. Este aumento da afinidade para FcRIIa correlacionou-se com o aumento da fagocitose mediada por macrófagos, em relação à IgG1 nativa. Em algumas modalidades, a região Fc do anticorpo anti-MICA/B compreende uma ou mais mutações ou combinação de mutações selecionadas de G236A, I332E, S239/I332E, I332E/G236A e S239D/I332E/G236A. Outras modificações na região Fc podem aumentar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), por exemplo, aumentando a afinidade para a ativação de receptores, como FcγRI e/ou FcγRIIIa. Por exemplo, a substituição G236A e a combinação da substituição G236A com modificações que melhoram a afinidade para ativar os receptores (por exemplo, FcγRI e/ou FcγRIIIa), por exemplo incluindo, mas não se limitando a substituições em 332 e 239, fornecem ADCC substancialmente melhorado em relação a o anticorpo WT parental. Veja, Patente Norte-americana No. 9.040.041, que é aqui incorporada por referência

na sua totalidade.

[00236] Em outro exemplo, a região Fc pode ser modificada para diminuir a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou para diminuir a afinidade para um receptor Fcγ modificando um ou mais aminoácidos nas seguintes posições: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 ou 439. Substituições exemplares incluem 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D e 332E. Variantes exemplares incluem 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T e 267E/268F7324T. Outras modificações para aumentar FcγR e interações de complemento incluem, mas não estão limitadas a substituições 298A, 333A, 334A, 326A, 2471, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 3051 e 396L. Essas e outras modificações são revisadas em Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691.

[00237] Modificações Fc que aumentam a ligação a um receptor Fcγ incluem modificações de aminoácidos em qualquer uma ou mais das posições de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439 da região Fc, em que a numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat (WO00/42072).

[00238] Opcionalmente, a região Fc pode compreender um resíduo

de aminoácido de ocorrência não natural em posições adicionais e/ou alternativas conhecidas por alguém versado na técnica (veja, por exemplo, Patentes Norte-americanas 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; 6.194.551; 7.317.091; 8.101.720; 9.040.041; Publicações de patente PCX WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217; WO 05/092925; e WO 06/0201 14).

[00239] As afinidades e propriedades de ligação de uma região Fc para seu ligante podem ser determinadas por uma variedade de métodos de ensaio *in vitro* (ensaios de base bioquímica ou imunológica) conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, métodos de equilíbrio (por exemplo, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ou radioimunoensaio (RIA)), ou cinética (por exemplo, análise BIACORE) e outros métodos, como ensaios de ligação indireta, ensaios de inibição competitiva, transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), eletroforese em gel e cromatografia (por exemplo, filtração em gel). Estes e outros métodos podem utilizar um marcador em um ou mais dos componentes sendo examinados e/ou usar uma variedade de métodos de detecção incluindo, mas não se limitando a marcadores cromogênicos, fluorescentes, luminescentes ou isotópicos. Uma descrição detalhada das afinidades de ligação e cinética pode ser encontrada em Paul, W. E., ed., Fundamental immunology, 4ª Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), que se concentra nas interações anticorpo-imunógeno.

[00240] Em algumas modalidades, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia-vida biológica. Várias abordagens são possíveis. Por exemplo, isso pode ser feito aumentando a afinidade de ligação da região Fc para FcRn. Por exemplo, um ou mais dos seguintes resíduos podem ser mutados: 252, 254, 256, 433, 435, 436, conforme descrito

na Pat. Norte-americana No. 6.277.375. Substituições exemplares específicas incluem um ou mais dos seguintes: T252L, T254S e/ou T256F. Alternativamente, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado na região CH1 ou CL para conter um epítopo de ligação ao receptor de salvamento retirado de duas alças de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nas Patentes Norte-americanas Nos 5.869.046 e 6.121.022 por Presta *et al*. Outras variantes exemplares que aumentam a ligação a FcRn e/ou melhoram as propriedades farmacocinéticas incluem substituições nas posições 259, 308, 428 e 434, incluindo por exemplo 2591, 308F, 428L, 428M, 434S, 4341 1. 434F, 434Y e 434X1. Outras variantes que aumentam a ligação de Fc a FcRn incluem: 250E, 250Q, 428 L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al*. 2004, *J. Biol. Chem*. 279 (8): 6213-6216, Hinton *et al*. 2006 Journal of Immunology 176: 346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 31 1A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al*., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (9): 6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 31 1 S, 433R, 433S, 4331, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall Acqua *et al*.*Journal of Immunology*, 2002, 169: 5171-5180, Dall'Acqua *et al*., 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281: 23514-23524). Outras modificações para modular a ligação FcRn são descritas em Yeung *et al*., 2010, *J Immunol*, 182: 7663-7671.

[00241] Em algumas modalidades, os isótipos IgG híbridos com características biológicas particulares podem ser usados. Por exemplo, uma variante híbrida de IgG1/IgG3 pode ser construída substituindo as posições de IgG1 na região CH2 e/ou CH3 pelos aminoácidos de IgG3 em posições onde os dois isótipos diferem. Assim, pode ser construído um anticorpo IgG variante híbrido que compreende uma ou mais substituições, por exemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S,

392N, 397M, 4221, 435R e 436F. Em algumas modalidades aqui descritas, uma variante híbrida de IgG1/IgG2 pode ser construída substituindo as posições de IgG2 na região CH2 e/ou CH3 por aminoácidos de IgG1 em posições onde os dois isótipos diferem. Assim, um anticorpo IgG variante híbrido pode ser construído que compreende uma ou mais substituições, por exemplo, uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (referindo-se a uma inserção de uma glicina na posição 236), e 327A.

[00242] Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e variantes com ligação melhorada foi descrita (veja, Shields, R.L. *et al*. (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 mostraram melhorar a ligação a FcγRIII. Além disso, os seguintes mutantes de combinação mostraram melhorar a ligação de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e S298A/E333A/K334A, que demonstrou exibir ligação de FcγRIIIa e atividade de ADCC aumentadas (Shields *et al*., 2001) Outras variantes de IgG1 com ligação fortemente realçada a FcγRIIIa foram identificadas, incluindo variantes com mutações S239D/I332E e S239D/I332E/A330L que mostraram o maior aumento na afinidade para FcγRIIIa, uma diminuição na ligação de FcγRIIb e forte atividade citotóxica em macacos cinomolgos (Lazar *et al*., 2006). Introdução das mutações triplas em anticorpos como alemtuzumabe (específico para CD52), trastuzumabe (específico para HER2/neu), rituximabe (específico para CD20) e cetuximabe (específico para EGFR) traduzido em atividade de ADCC bastante realçada *in vitro*, e a variante S239D/I332E mostrou uma capacidade realçada de esgotar as células B em macacos (Lazar *et al*., 2006). Além disso, mutantes IgG1 contendo mutações L235V, F243L, R292P, Y300L e P396L que exibiram ligação realçada a FcγRIIIa e atividade de ADCC concomitantemente

realçada em camundongos transgênicos que expressam FcγRIIIa humano em modelos de células malignas B e câncer de mama foram identificados (Stavenhagen *et al*, 2007; Nordstrom *et al*., 2011). Outros mutantes Fc que podem ser usados incluem: S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L e M428L/N434S.

[00243] Mutações específicas nas posições 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 e 332 mostraram melhorar a ligação a FcγRIIa e/ou reduzir a ligação a FcγRIIb, resultando em ADCC e/ou atividade de ADCP (Richards *et al*., *Mol. Cancer Ther. 7 (8)*: 2517-2527; Patente Norte-americana No. 9.040.041). Em particular, as variantes de Fc que melhoram seletivamente a ligação a um ou mais receptores de ativação humanos em relação a FcγRIIb, ou melhoram seletivamente a ligação a FcγRIIb em relação a um ou mais receptores de ativação, podem compreender uma substituição selecionada do grupo que consiste em 234G, 234I, 235D, 235E, 235I, 235Y, 236A, 236S, 239D, 267D, 267E, 267Q, 268D, 268E, 293R, 295E, 324G, 324I, 327H, 328A, 328F, 328I, 330I, 330L, 330Y, 332D e 332E. Substituições adicionais que também podem ser combinadas incluem outras substituições que modulam a afinidade FcγR e a atividade do complemento, incluindo, mas não se limitando a 298A, 298T, 326A, 326D, 326E, 326W, 326Y, 333A, 333S, 334L e 334A (Patente Norte-americana Nº. 6.737.056; Shields *et al*., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (9): 6591-6604; Patente Norte-americana No. 6.528.624; Idusogie *et al*., 2001, J. Immunology 166: 2571-2572). Variantes preferidas que podem ser particularmente úteis para combinar com outras variantes Fc incluem aquelas que compreendem as substituições 298A, 326A, 333A e 334A. As substituições adicionais que podem ser combinadas com as variantes seletivas de FcγR incluem 247L, 255L, 270E, 392T, 396L e 421K (U.S. Ser. No. 10/754.922; U.S. Ser. No.

10/902.588); e 280H, 280Q e 280Y (U.S. Ser. No. 10/370.749).

[00244] Ao usar um domínio constante de IgG4, pode incluir a substituição S228P, que imita a sequência de articulação em IgG1 e, assim, estabiliza as moléculas de IgG4.

III. Não fucosilação, hipofucosilação e fucosilação reduzida

[00245] Em algumas modalidades, a glicosilação de um anticorpo pode ser modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicoslado pode ser feito (isto é, o anticorpo não tem glicosilação). A glicosilação pode ser alterada para, por exemplo, aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno. Essas modificações de carboidratos podem ser realizadas, por exemplo, alterando um ou mais sítios de glicosilação na sequência do anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas que resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura da região variável para, desse modo, eliminar a glicosilação nesse sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo pelo antígeno. Tal abordagem é descrita em mais detalhes nas Patentes Norte-americanas Nos. 5.714.350 e 6.350.861 por Co *et al*.

[00246] A glicosilação da região constante em N297 pode ser evitada por mutação do resíduo N297 em outro resíduo, por exemplo, N297A, e/ou por mutação de um aminoácido adjacente, por exemplo, 298 para reduzir assim a glicosilação em N297.

[00247] A interação de anticorpos com FcγRs também pode ser realçada modificando a fração de glicano ligada a cada fragmento Fc no resíduo N297. Em particular, a ausência de resíduos de fucose do núcleo realça ADCC via ligação melhorada de IgG para ativação de FcγRIIIA sem alterar a ligação ao antígeno ou CDC. Natsume *et al*. (2009) *Drug Des. Develop. Ther*. 3:7. Há evidências convincentes de que os anticorpos específicos do tumor fucosilados se traduzem em atividade terapêutica aumentada em modelos de camundongos *in vivo*.

Nimmerjahn & Ravetch (2005) *Science* 310: 1510; Mossner *et al*. (2010) Blood115: 4393. A modificação da glicosilação do anticorpo pode ser realizada, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. As células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais expressam anticorpos recombinantes desta descrição para assim produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhagens celulares Ms704, Ms705 e Ms709 não têm o gene da fucosiltransferase, FUT8 (α-(1,6) fucosiltransferase (veja, Publicação de Pedido de Patente Norte-americana No. 20040110704; Yamane-Ohnuki *et al*. (2004) *Biotechnol. Bioeng*. 87: 614), de modo que os anticorpos expressos nessas linhagens celulares não têm fucose em seus carboidratos. Como outro exemplo, EP 1176195 também descreve uma linhagem celular com um gene FUT8 funcionalmente interrompido, bem como linhagens celulares que têm pouca ou nenhuma atividade para adicionar fucose à N-acetilglicosamina que se liga à região Fc do anticorpo, por exemplo, a linhagem celular de mieloma de rato YB2/0 (ATCC CRL 1662). A publicação PCT WO 03/035835 descreve uma linhagem celular CHO variante, Lec13, com capacidade reduzida de anexar fucose a carboidratos ligados a Asn (297), também resultando em hipofucosilação de anticorpos expressos nessa célula hospedeira. Veja, também Shields *et al*. (2002) *J. Biol. Chem*. 277: 26733. Anticorpos com uma glicosilação modificada perfil também pode ser produzido em ovos de galinha, conforme descrito em Publicação PCT Nº WO 2006/089231. Alternativamente, anticorpos com um perfil de glicosilação modificado podem ser produzidos em células vegetais, como Lemna. Veja, por exemplo Publicação Norte-americana Nº 2012/0276086. A Publicação PCT Nº WO 99/54342 descreve linhagens celulares modificadas para expressar glicosil transferases modificadoras de glicoproteína (por exemplo,

beta (1,4)-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII)), de modo que os anticorpos expressos nas linhagens celulares modificadas exibem GlcNac bissectante aumentado estruturas que resultam no aumento da atividade de ADCC dos anticorpos. Veja também Umaña *et al*. (1999) *Nat. Biotech*. 17: 176. Alternativamente, os resíduos de fucose do anticorpo podem ser clivados usando uma enzima fucosidase. Por exemplo, a enzima alfa-L-fucosidase remove resíduos de fucosil de anticorpos. Tarentino *et al*. (1975) *Biochem*. 14: 5516. Os anticorpos com fucosilação reduzida também podem ser produzidos em células que abrigam um gene recombinante que codifica uma enzima que usa GDP-6-desóxi-D-lixo-4-hexilose como substrato, como GDP-6-desóxi-D-lixo-4-hexilose redutase (RMD), conforme descrito na Patente Norte-americana No. 8.642.292. Alternativamente, as células podem ser cultivadas em meio contendo análogos de fucose que bloqueiam a adição de resíduos de fucose ao glicano ligado a N ou uma glicoproteína, como anticorpo, produzida por células cultivadas no meio. Patente Norte-americana No. 8.163.551; WO 09/135181.

[00248] Como os anticorpos não fucosilados exibem ADCC e/ou ADCP muito melhorados em comparação com os anticorpos fucosilados, as preparações de anticorpos não precisam estar completamente livres de cadeias pesadas fucosiladas para serem úteis na presente invenção. Os níveis residuais de cadeias pesadas fucosiladas não interferem significativamente com a atividade de ADCC e/ou ADCP de uma preparação substancialmente de cadeias pesadas não fucosiladas. Os anticorpos produzidos em células de CHO convencionais, que são totalmente competentes para adicionar fucose central a N-glicanos, podem, no entanto, compreender desde uma pequena porcentagem até 15 % de anticorpos não fucosilados. Os anticorpos não fucosilados podem exibir afinidade dez vezes maior para o CD16 e aumento de até 30 a 100 vezes da atividade de ADCC e/ou ADCP,

portanto, mesmo um pequeno aumento na proporção de anticorpos não fucosilados pode aumentar drasticamente a atividade de ADCC e/ou ADCP de uma preparação. Qualquer preparação compreendendo mais anticorpos não fucosilados do que seriam produzidos em células de CHO normais em cultura pode exibir algum nível de ADCC e/ou ADCP realçado. Essas preparações de anticorpos são aqui referidas como preparações com fucosilação reduzida. Dependendo do nível original de não fucosilação obtido a partir de células de CHO normais, as preparações de fucosilação reduzida podem compreender 80 %, 70 %, 60 % 50 %, 30 %, 20 %, 10 % e até 5 % de anticorpos não fucosilados. A fucosilação reduzida pode ser definida funcionalmente como preparações exibindo 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, duas vezes, três vezes ou maior aumento de ADCC e/ou ADCP em comparação com anticorpos preparados em células de CHO normais, e não com referência a qualquer porcentagem fixa de espécies não fucosiladas.

[00249] O nível de não fucosilação pode ser definido estruturalmente. Quando aqui usado, “não fucosilado” ou “fucosilado” (termos usados como sinônimos) refere-se a preparações de anticorpos em que mais de 95 % das cadeias pesadas carecem de fucose, como mais de 96 %, mais de 97 %, mais de 98 %, mais de 99 % ou 100 %. O termo “hipofucosilado” refere-se a preparações de anticorpos em que mais de 80 % e menos que ou igual a 95 % das cadeias pesadas não têm fucose, por exemplo, preparações de anticorpos em que entre 85 e 95 %, entre 80 e 85 %, entre 80 e 90 %, entre 85 e 90 %, ou entre 90 e 95 % das cadeias pesadas não têm fucose. O termo “hipofucosilado ou não fucosilado” refere-se a preparações de anticorpos em que 80 % ou mais de cadeias pesadas não têm fucose. O termo “fucosilação reduzida” refere-se a preparações de anticorpos em que entre 10 e 80 % das cadeias pesadas carecem de fucose, como 20-80 %, 30-80 %, 40-

80 %, 50-80 %, 60-80 %, 70-80 %, 20-70 %, 30-70 %, 40-70 %, 50-70 %, 60-70 %, 20-60 %, 30-60 %, 40-60 %, 50-60 %, 20-50 %, 30-50 %, 40-50 %, 20-40 %, 30-40 %, 10-20 %, 10-30 % ou 20-30 %.

[00250] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B hipofucosilados ou não fucosilados podem ser produzidos em células sem uma enzima essencial para a fucosilação, como FUT8 (por exemplo, Patente Norte-americana 7.214.775), ou em células nas quais uma enzima exógena esgota parcialmente o pool de precursores metabólicos para fucosilação (por exemplo, Patente Norte-americana 8.642.292), ou em células cultivadas na presença de uma pequena molécula inibidora de uma enzima envolvida na fucosilação (por exemplo, WO 09/135181).

[00251] O nível de fucosilação em uma preparação de anticorpo pode ser determinado por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando a eletroforese em gel, eletroforese capilar, cromatografia líquida e espectrometria de massa. Em algumas modalidades, o nível de fucosilação em uma preparação de anticorpo pode ser determinado por cromatografia de interação hidrofílica (ou cromatografia líquida de interação hidrofílica, HILIC). Em algumas modalidades, para determinar o nível de fucosilação de uma preparação de anticorpo, as amostras são desnaturadas e tratadas com PNGase F para clivar glicanos ligados a N, que são então analisados quanto ao teor de fucose. LC/MS de cadeias de anticorpo de tamanho natural é um método alternativo para detectar o nível de fucosilação de uma preparação de anticorpo, mas a espectroscopia de massa é inerentemente menos quantitativa.

[00252] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ter fucosilação reduzida ou ser hipofucosilados ou não fucosilados. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ter fucosilação reduzida. Em algumas modalida-

des, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser hipofucosilados. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser não fucosilados.

[00253] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem compreender i) uma ou mais mutações de aminoácidos para a região Fc para alterar a ligação de FcγR e, opcionalmente, ii) redução ou eliminação da fucosilação. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem compreender uma ou mais mutações de aminoácidos para a região Fc para alterar a ligação de FcγR e ser hipofucosilados ou não fucosilados. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem compreender uma ou mais mutações de aminoácidos para a região Fc para alterar a ligação de FcγR e ser não fucosilados

[00254] Outra modificação dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos é a peguilação. Um anticorpo pode ser peguilado para, por exemplo, aumentar a meia-vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Para peguilar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, normalmente é feito reagir com polietilenoglicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado aldeído de PEG, sob condições em que um ou mais grupos PEG se tornam ligados ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades, a peguilação é realizada por meio de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Quando aqui usado, o termo “polietilenoglicol” pretende abranger qualquer uma das formas de PEG que foram utilizadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono (CI-CIO) alcóxi- ou arilóxi-polietilenoglicol ou polietilenoglicol-maleimida. Em algumas modalidades, o anticorpo a ser peguilado é um anticorpo aglicosilado. Os métodos para peguilar proteínas são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos. Veja, por exem-

plo, EP 0 154 316 de Nishimura *et al*. e EP 0 401 384 de Ishikawa *et al*.

IV. Propriedades Físicas do Anticorpo

[00255] Os anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, aqueles aqui descritos, têm algumas ou todas as características físicas dos anticorpos anti-MICA/B específicos aqui descritos, tais como as características descritas nos Exemplos.

[00256] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem conter um ou mais sítios de glicosilação na região variável da cadeia leve ou pesada. Tais sítios de glicosilação podem resultar em imunogenicidade aumentada do anticorpo ou uma alteração do pK do anticorpo devido à ligação do antígeno alterada (Marshall *et al*., (1972) *Annu Rev Biochem* 41: 673-702; Gala e Morrison (2004) *J. Immunol* 172: 5489-94; Wallick *et al*., (1988) *J Exp Med* 168: 1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12: 43R-56R; Parekh *et al*., (1985) *Nature* 316: 452-7 ; Mimura *et al*., (2000) *Mol Immunol* 37: 697-706). A glicosilação é conhecida por ocorrer em motivos contendo uma sequência N-X-S/T. Em alguns casos, um anticorpo anti-MICA/B não contém glicosilação de região variável. Isto pode ser alcançado selecionando anticorpos que não contêm o motivo de glicosilação na região variável ou por mutação de resíduos dentro da região de glicosilação.

[00257] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos não contém sítios de isomerismo de asparagina. A desamidação da asparagina pode ocorrer nas sequências N-G ou D-G e resultar na criação de um resíduo de ácido isoaspártico que introduz uma dobra na cadeia polipeptídica e diminui sua estabilidade (efeito do ácido isoaspártico).

[00258] Cada anticorpo terá um ponto isoelétrico único (pi), que geralmente cai na faixa de pH entre 6 e 9,5. O pi para um anticorpo IgG1 normalmente está dentro da faixa de pH de 7-9,5 e o pi para um anti-

corpo IgG4 normalmente está dentro da faixa de pH de 6-8. Especula-se que os anticorpos com um pi fora da faixa normal podem ter algum desduplicação e instabilidade sob condições *in vivo*. Assim, um anticorpo anti-MICA/B pode conter um valor de pi que cai na faixa normal. Isto pode ser alcançado selecionando anticorpos com um pi na faixa normal ou por mutação de resíduos de superfície carregados.

[00259] Cada anticorpo terá uma temperatura de fusão característica, com uma temperatura de fusão mais alta indicando maior estabilidade geral *in vivo* (Krishnamurthy R e Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361-71). Geralmente, a T_Mi (a temperatura de desduplicação inicial) pode ser maior que 60 °C, maior que 65 °C ou maior que 70 °C. O ponto de fusão de um anticorpo pode ser medido usando calorimetria de varredura diferencial (Chen *et al*., (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirlando *et al*., (1999) *Immunol Lett* 68: 47-52) ou dicroísmo circular (Murray *et al*., (2002) J. Chromatogr Sci 40: 343-9).

[00260] Em algumas modalidades, são selecionados anticorpos que não se degradam rapidamente. A degradação de um anticorpo pode ser medida usando eletroforese capilar (CE) e MALDI-MS (Alexander A J e Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67: 3626-32).

[00261] Em algumas modalidades, são selecionados anticorpos que têm efeitos de agregação mínimos, o que pode levar ao desencadeamento de uma resposta imune indesejada e/ou propriedades farmacocinéticas alteradas ou desfavoráveis. Geralmente, os anticorpos são aceitáveis com agregação de 25 % ou menos, 20 % ou menos, 15 % ou menos, 10 % ou menos, ou 5 % ou menos. A agregação pode ser medida por várias técnicas, incluindo coluna de exclusão por tamanho (SEC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e dispersão de luz. Em algumas modalidades, os anticorpos exibem uma solubilidade desejável, por exemplo, solubilidade que permite a fabricação comercial. Em algumas modalidades, a solubilidade dos anticorpos

aqui descritos foi de pelo menos 10 mg/ml, pelo menos 15 mg/ml, pelo menos 20 mg/ml, pelo menos 25 mg/ml, pelo menos 30 mg/ml, pelo menos 40 mg/ml, pelo menos 50 mg/ml, pelo menos 60 mg/ml, ou pelo menos 70 mg/ml, em pH neutro ou ligeiramente ácido.

[00262] Em algumas modalidades, os anticorpos aqui descritos têm maior estabilidade do que um anticorpo de referência. Em algumas modalidades, os anticorpos aqui descritos têm uma temperatura de fusão mais alta do que um anticorpo de referência. Em algumas modalidades, os anticorpos aqui descritos têm uma tendência menor para agregação do que um anticorpo de referência. Em algumas modalidades, os anticorpos aqui descritos têm uma solubilidade mais alta do que um anticorpo de referência. Em algumas modalidades, os anticorpos aqui descritos têm uma maior taxa de absorção, menor toxicidade, maior atividade biológica e/ou seletividade alvo, melhor capacidade de fabricação e/ou menor imunogenicidade do que um anticorpo de referência. O anticorpo de referência pode ser outro anticorpo ou fragmentos do mesmo, ou conjugado do mesmo, que se liga a MICA/B.

V. Métodos de anticorpos de construção

[00263] Como discutido acima, os anticorpos anti-MICA/B com sequências VH e VL aqui descritos podem ser usados para criar novos anticorpos anti-MICA/B modificando as sequências VH e/ou VL, ou a (s) região (ões) constante (s) a elas ligada(s). Assim, em outro aspecto aqui descrito, as características estruturais de um anticorpo anti-MICA/B aqui descrito são usadas para criar anticorpos anti-MICA/B estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos, como a ligação a MICA/B humana e MICA/B cinomolga. Por exemplo, uma ou mais regiões de CDR de MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 podem ser combinadas de forma recombinante com regiões de estrutura conhecidas e/ou outras CDRs para criar anti- Anticorpos MICA/B aqui

descritos, como discutido acima. Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na seção anterior. O material de partida para o método de engenharia é uma ou mais das sequências VH e/ou VL fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Para criar o anticorpo modificado, não é necessário preparar realmente (isto é, expressar como uma proteína) um anticorpo tendo uma ou mais das sequências VH e/ou VL fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Em vez disso, a informação contida na (s) sequência (ões) é usada como material de partida para criar uma sequência de "segunda geração" derivada da (s) sequência (ões) original (is) e, em seguida, a (s) sequência (ões) de "segunda geração" é (são) preparada (s) e expressa (s) como uma proteína.

[00264] Por conseguinte, são fornecidos aqui métodos para a preparação de um anticorpo anti-MICA/B aqui descritos.

[00265] O anticorpo alterado pode exibir pelo menos uma das propriedades funcionais aqui definidas. As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas usando ensaios padrão disponíveis na técnica e/ou aqui descritos, tais como aqueles apresentados nos Exemplos (por exemplo, ELISAs, FACS).

[00266] Em algumas modalidades dos métodos de modificação dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ou seletivamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação de anticorpo anti-MICA/B e os anticorpos anti-MICA/B modificados resultantes podem ser rastreado quanto à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais, conforme descrito aqui. Métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, a Publicação PCT WO 02/092780 por Short descreve métodos para criar e rastrear mutações de anticorpos usando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética ou uma combinação dos mesmos. Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 por La-

zar *et al*. descreve métodos de uso de métodos de rastreamento computacional para otimizar as propriedades físico-químicas dos anticorpos.

VI. Moléculas de Ácido Nucléico

[00267] Outro aspecto aqui descrito refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos. Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado de células ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é “isolado” ou “tornado substancialmente puro” quando purificado de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares (por exemplo, outro DNA cromossômico, por exemplo, o DNA cromossômico que está ligado ao DNA isolado em natureza) ou proteínas, por técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, banda CsCl, cromatografia de coluna, enzimas de restrição, eletroforese em gel de agarose e outras bem conhecidas na técnica. Veja, F. Ausubel, *et al*., Ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, New York. Um ácido nucleico aqui descrito pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter sequências intrônicas. Em algumas modalidades, o ácido nucleico é uma molécula de cDNA.

[00268] Os ácidos nucleicos aqui descritos podem ser obtidos usando técnicas padrão de biologia molecular. Para anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados a partir de camundongos transgênicos portadores de genes de imunoglobulina humana conforme descrito mais abaixo), os cDNAs que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo feito pelo hibridoma podem ser obtidos por amplificação por PCR padrão ou técnicas de clonagem de cDNA. Para anticorpos obtidos a partir de uma biblioteca de genes de imunoglobulina (por exemplo, usando técnicas de exibição de fago), o

ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser recuperado da biblioteca.

[00269] Algumas moléculas de ácidos nucleicos aqui descritas são aquelas que codificam as sequências VH e VL dos anticorpos MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2. Sequências de DNA exemplares que codificam as sequências VH de MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 são apresentadas em SEQ ID NOs: 1, 11, 21, 31 e 41, respectivamente. Sequências de DNA exemplares que codificam as sequências VL de MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 são apresentadas em SEQ ID NOs: 3, 13, 23, 33 e 43, respectivamente. Sequências de DNA exemplares que codificam as sequências de cadeia pesada de MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 são apresentadas em SEQ ID NOs: 59, 63, 67, 71, abd 75, respectivamente. Sequências de DNA exemplares que codificam as sequências de cadeia leve de MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 são apresentados nas SEQ ID NOs: 61, 65, 69, 73 e 77.

[00270] Ácidos nucleicos exemplares que codificam os domínios VH e VL maduros do anticorpo MICA.36 são apresentados como SEQ ID NOs: 1 e 3, respectivamente. Ácidos nucleicos exemplares que codificam as cadeias pesadas maduras do anticorpo MICA.36 são apresentados como SEQ ID NOs: 59 e 131, e um ácido nucleico exemplar que codifica a cadeia leve madura do anticorpo MICA.36 é apresentado como SEQ ID NO: 61

[00271] Ácidos nucleicos exemplares que codificam os domínios VH e VL maduros do anticorpo MICA.52 são apresentados como SEQ ID NOs: 11 e 13, respectivamente. Os ácidos nucleicos exemplares que codificam as cadeias pesadas maduras do anticorpo MICA.52 são apresentados como SEQ ID NOs: 63, e um ácido nucleico exemplar que codifica a cadeia leve madura do anticorpo MICA.52 é apresentado como SEQ ID NO: 65.

[00272] Ácidos nucleicos exemplares que codificam os domínios VH e VL maduros do anticorpo MICA.54 são apresentados como SEQ ID NOs: 21 e 23, respectivamente. Os ácidos nucleicos exemplificativos que codificam as cadeias pesadas maduras do anticorpo MICA.54 são apresentados como SEQ ID NOs: 67, e um ácido nucleico exemplar que codifica a cadeia leve madura do anticorpo MICA.54 é apresentado como SEQ ID NO: 69.

[00273] Ácidos nucleicos exemplares que codificam os domínios VH e VL maduros do anticorpo MICA.2 são apresentados como SEQ ID NOs: 31 e 33, respectivamente. Os ácidos nucleicos exemplares que codificam as cadeias pesadas maduras do anticorpo MICA.2 são apresentados como SEQ ID NOs: 71, e um ácido nucleico exemplar que codifica a cadeia leve madura do anticorpo MICA.2 é apresentado como SEQ ID NO: 73.

[00274] Ácidos nucleicos exemplares que codificam os domínios VH e VL maduros do anticorpo 71C2 são apresentados como SEQ ID NOs: 41 e 43, respectivamente. Ácidos nucleicos exemplares que codificam as cadeias pesadas maduras do anticorpo 71C2 são apresentados como SEQ ID NOs: 75, e um ácido nucleico exemplar que codifica a cadeia leve madura do anticorpo 71C2 é apresentado como SEQ ID NO: 77.

[00275] Os ácidos nucleicos exemplares acima podem incluir ainda um peptídeo sinal apresentado em SEQ ID NOs: 100-105. As sequências de nucleotídeos que codificam os peptídeos de sinal são apresentadas como SEQ ID NOs: 106-107. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal compreende MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 105).

[00276] As moléculas de ácido nucleico aqui descritas podem ser modificadas para deletar sequências específicas, por exemplo, sequências de reconhecimento de enzimas de restrição ou para otimizar códons.

[00277] Um método para preparar MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 pode compreender a expressão de cadeia pesada e das cadeias leves em uma linhagem celular compreendendo as sequências de nucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves com um peptídeo sinal, por exemplo, para MICA.36, SEQ ID NOs: 59 e 61, respectivamente, ou SEQ ID No: 131 e 61, respectivamente. Um método para preparar MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 pode compreender a expressão de cadeia pesada e das cadeias leves em uma linhagem celular compreendendo as sequências de nucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves com um peptídeo sinal. As células hospedeiras que compreendem essas sequências de nucleotídeos são aqui abrangidas.

[00278] Uma vez que fragmentos de DNA que codificam os segmentos VH e VL são obtidos, esses fragmentos de DNA podem ser ainda manipulados por técnicas de DNA recombinante padrão, por exemplo, para converter os genes da região variável em genes de cadeia de anticorpo de tamanho natural, em genes de fragmento Fab ou em um gene scFv. Nessas manipulações, um fragmento de DNA que codifica VL ou VH é operativamente ligado a outro fragmento de DNA que codifica outra proteína, como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. O termo “operativamente ligado”, conforme usado neste contexto, pretende significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de modo que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de DNA permanecem na estrutura.

[00279] O DNA isolado que codifica a região VH pode ser convertido em um gene de cadeia pesada de tamanho natural ligando operacionalmente o DNA que codifica VH a outra molécula de DNA que codifica regiões constantes de cadeia pesada (articulação, CH1, CH2 e/ou CH3). As sequências dos genes da região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica (veja, por exemplo, Kabat,

EA, *et al*. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No . 91-3242) e fragmentos de DNA abrangendo essas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, por exemplo, uma região IgG1. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA que codifica VH pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA que codifica apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.

[00280] O DNA isolado que codifica a região VL pode ser convertido em um gene de cadeia leve de tamanho natural (bem como um gene de cadeia leve Fab) ligando operacionalmente o DNA que codifica VL a outra molécula de DNA que codifica a região constante de cadeia leve, CL. As sequências dos genes da região constante da cadeia leve humana são conhecidas na técnica (veja, por exemplo, Kabat, E. A., *et al*. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, N Publicação IH No. 91-3242) e fragmentos de DNA que abrangem essas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante da cadeia leve pode ser uma região constante capa ou lambda.

[00281] Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA que codificam VH e VL são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligante flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácidos $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, de modo que as sequências de VH e VL possam ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com as regiões VL e VH unidas pelo ligante flexível (veja, por exemplo, Bird *et al*., (1988) *Science* 242: 423-426; Huston *et al*., (1988) *Proc. Natl Acad. Sci*. USA 85: 5879-5883; McCafferty *et al*., (1990) *Nature* 348: 552-554).

[00282] Também são fornecidas aqui moléculas de ácido nucleico

que codificam as sequências VH e VL que são homólogas às dos anticorpos MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2. Moléculas de ácido nucleico exemplares codificam sequências VH e VL que são pelo menos 70 % idênticas, por exemplo, pelo menos 75 %, pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 % ou pelo menos 99 % idênticas, a moléculas de ácido nucleico que codificam as sequências VH e VL dos anticorpos MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2. Também são fornecidas aqui moléculas de ácido nucleico com substituições conservadoras (ou seja, substituições que não alteram a sequência de aminoácidos resultante após a translação da molécula de ácido nucleico), por exemplo, para otimização de códons.

[00283] Também são fornecidos ácidos nucleicos que codificam as regiões VH e/ou VL de anticorpos anti-MICA/B, como os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos, cujos ácidos nucleicos compreendem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos cerca de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a qualquer uma das sequências de nucleotídeos que codificam as regiões VH e/ou VL de anticorpos anti-MICA/B aqui descritos.

[00284] Também são fornecidos ácidos nucleicos que codificam a cadeia pesada e/ou a cadeia leve de anticorpos anti-MICA/B, como os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos, cujos ácidos nucleicos compreendem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos cerca de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a qualquer uma das sequências de nucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e/ou leves de anticorpos anti-MICA/B aqui descritos.

VII. Produção de Anticorpos

[00285] Os anticorpos monoclonais anti-MICA/B aqui descritos podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas conhecidas, tais como a técnica de hibridização de células somáticas padrão descrita por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Embora os proce-

dimentos de hibridização de células somáticas sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para a produção de anticorpos monoclonais também podem ser usadas, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B, técnica de exibição de fago usando bibliotecas de genes de anticorpos humanos.

[00286] O sistema animal preferido para a preparação de hibridomas é o sistema de murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem apresentado. Protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos.

[00287] Os anticorpos anti-MICA/B quiméricos ou humanizados aqui descritos podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal de murino preparado como descrito acima. O DNA que codifica as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido a partir do hibridoma murino de interesse e modificado para conter sequências de imunoglobulina de não murino (por exemplo, humana) usando técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis de murino podem ser ligadas a regiões constantes humanas usando métodos conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Patente Norte-americana No. 4.816.567 de Cabilly *et al*.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR de murino podem ser inseridas em uma estrutura humana usando métodos conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Patente Norte-americana No. 5.225.539 de Winter e Patente Norte-americana No. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen *et al*).

[00288] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra MICA/B podem ser gerados usan-

do camundongos transgênicos ou transcromossômicos carregando partes do sistema imunológico humano em vez do sistema de camundongo. Estes camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos aqui referidos como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente, e são coletivamente referidos aqui como “camundongos Ig humanos”.

[00289] O HUMAB-MOUSE® (Medarex, Inc.) contém miniloci do gene da imunoglobulina humana que codificam sequências de imunoglobulina de cadeia pesada humana não rearranjada (μ e γ) e leve κ, juntamente com mutações direcionadas que inativam os loci endógenos de cadeia μ e κ (veja, por exemplo, Lonberg, *et al*., (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Consequentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo e, em resposta à imunização, os transgenes de cadeia leve e pesada humanos introduzidos sofrem permuta de classe e mutação somática para gerar IgGK monoclonal humano de alta afinidade (Lonberg, N. *et al*. (1994), *supra*; revisado em Lonberg, N. (1 994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 764: 536-546). A preparação e utilização de camundongos HuMab e as modificações genômicas transportadas por tais camundongos são ainda descritas em Taylor, L. *et al*. (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. *et al*., (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al*. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA* 90: 3720-3724; Choi *et al*. (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. *et al*. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al*. (1994) *Immunol*. 152: 2912-2920; Taylor, L. *et al*. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; e Fishwild, D. *et al*. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Veja, ainda, Patentes Norte-americanas Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e

5.770.429; tudo por Lonberg e Kay; Patente Norte-americana No. 5.545.807 por Surani *et al*.; Publicações PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todos por Lonberg e Kay; e Publicação PCT Nº WO 01/14424 de Korman *et al*.

[00290] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos são criados usando um camundongo que carrega sequências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomas, como um camundongo que carrega um transgene de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humana. Tais camundongos, aqui referidos como “camundongos KM”, são descritos em detalhes na Publicação PCT WO 02/43478 de Ishida *et al*.

[00291] Além disso, sistemas animais transgênicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para aumentar os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes Norte-americanas Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6, 150.584 e 6.162.963 de Kucherlapati *et al*.

[00292] Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para aumentar os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos. Por exemplo, podem ser utilizados camundongos que transportam um transcromossoma de cadeia pesada humana e um trancromossoma de cadeia leve humana, referidos como “camundongos TC”; tais camundongos são descritos em Tomizuka *et al*. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 97: 722-727. Além disso, vacas portadoras de transcromossomas de cadeia pesada e leve humanos foram descritas na técnica (Kuroiwa *et al*. (2002) *Nature Biotechnology*

20: 889-894) e podem ser usadas para criar anticorpos anti-MICA/B aqui descritos.

[00293] Sistemas de camundongo adicionais descritos na técnica para criar anticorpos humanos, por exemplo, anticorpos MICA/B anti-humanos, incluem (i) o camundongo VELOCLMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), em que as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de camundongo endógenas têm foram substituídos, por meio de recombinação homóloga, por regiões variáveis de cadeia pesada e leve humana, operativamente ligadas às regiões constantes de camundongo endógenas, de modo que os anticorpos quiméricos (V humano/C de camundongo) são criados nos camundongos e, em seguida, subsequentemente convertidos em anticorpos totalmente humanos usando técnicas padrão de DNA recombinante; e (ii) o camundongo MEMO® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), em que o camundongo contém regiões variáveis da cadeia pesada humana não rearranjadas, mas uma única região variável da cadeia leve comum humana rearranjada. Tais camundongos, e seu uso para criar anticorpos, são descritos em, por exemplo, WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 e US 2012/0073004.

[00294] Os anticorpos monoclonais humanos anti-MICA/B aqui descritos também podem ser preparados usando métodos de exibição de fago para rastrear bibliotecas de genes de imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição de fago para isolar anticorpos humanos são apresentados na técnica. Veja, por exemplo: Patentes Norte-americanas Nos. 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 de Ladner *et al*.; Patentes Norte-americanas Nos. 5.427.908 e 5.580.717 de Dower *et al* .; Patentes Norte-americanas Nos. 5.969.108 e 6.172.197 de McCafferty *et al* .; e Patentes Norte-americanas Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 de Griffiths *et al*.

[00295] Os anticorpos monoclonais humanos anti-MICA/B aqui descritos também podem ser preparados usando camundongos SCID nos quais células imunes humanas foram reconstituídas de modo que uma resposta de anticorpo humano possa ser gerada após a imunização. Tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes Norte-americanas Nos. 5.476.996 e 5.698.767 de Wilson *et al*.

VII.A. Imunizações

[00296] Para gerar anticorpos totalmente humanos para MICA/B, camundongos transgênicos ou transcromossômicos contendo genes de imunoglobulina humana (por exemplo, camundongos HCol2, HCo7 ou KM) podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de um antígeno MICA/B humano, por exemplo, MICA*002, MICA*004, MICA*008, MICA*009, MICB*005 ou qualquer combinação dos mesmos, e/ou células que expressam MICA ou fragmento do mesmo, conforme descrito para outros antígenos, por exemplo, por Lonberg *et al*., (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859; Fishwi Id *et al*., (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 e WO 98/24884. Alternativamente, os camundongos podem ser imunizados com DNA que codifica MICA/B humana ou fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, os camundongos podem ter de 6 a 16 semanas de idade após a primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou enriquecida (5-50 µg) do antígeno MICA/B recombinante pode ser usada para imunizar os camundongos HuMAb intraperitonealmente. No caso de imunizações usando uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno MICA/B não resultar em anticorpos, os camundongos também podem ser imunizados com células que expressam MICA/B, por exemplo, uma linhagem celular, para promover respostas imunes. As linhagens celulares exemplares incluem linhagens celulares Raji e CHO estáveis superexpressando MICA/B.

[00297] A experiência cumulativa com vários antígenos mostrou

que os camundongos transgênicos HuMAb respondem melhor quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) ou subcutaneamente (SC) com antígeno em adjuvante de Ribi, seguido por imunizações IP/SC a cada duas semanas (até um total de 10) com antígeno em adjuvante de Ribi. A resposta imune pode ser monitorada ao longo do protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas por sangramentos retroorbitais. O plasma pode ser rastreado por ELISA e FACS (como descrito abaixo), e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-MICA/B podem ser usados para fusões. Os camundongos podem receber reforço intravenoso com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço e dos gânglios linfáticos. Espera-se que 2-3 fusões para cada imunização possam ser necessárias. Entre 6 e 24 camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Normalmente, as cepas HCo7, HCol2 e KM são usadas. Além disso, ambos os transgene HCo7 e HCol2 podem ser cruzados em um único camundongo com dois transgenes de cadeia pesada humana diferentes (HCo7/HCol2).

VII.B. Geração de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais para MICA/B

[00298] Para gerar hibridomas produtores de anticorpos monoclonais humanos anti-MICA/B aqui descritos, esplenócitos e/ou células de nódulos linfáticos de camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos a uma linhagem celular imortalizada apropriada, como uma linhagem celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser rastreados quanto à produção de anticorpos específicos para o antígeno. Por exemplo, as suspensões de células únicas de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundidas a células de mieloma de camundongo não secretoras Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) com PEG. As células podem ser semeadas em placa de microtitulação de fundo plano, seguido de incubação em meio seletivo.

Após várias semanas, as células podem ser cultivadas em meio. As cavidades individuais podem então ser rastreados por ELISA para anticorpos monoclonais humanos IgM e IgG. Uma vez que ocorre um crescimento extenso do hibridoma, o meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpos podem ser substituídos, rastreados novamente e, se ainda forem positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitante. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

[00299] Para purificar anticorpos monoclonais humanos, os hibridomas selecionados podem ser cultivados em frascos giratórios de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). O IgG eluído pode ser verificado por eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS, e a concentração pode ser determinada por OD280 usando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados.

VII.C. Geração de Transfectomas Produzindo Anticorpos Monoclonais para MICA/B

[00300] Os anticorpos podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de genes como é bem conhecida na técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

[00301] Por exemplo, para expressar anticorpos, ou fragmentos de anticorpos dos mesmos, DNAs que codificam cadeias leves e pesadas parciais ou completas podem ser obtidos por técnicas de biologia molecular padrão (por exemplo, amplificação por PCR ou clonagem de

cDNA usando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos em vetores de expressão de modo que os genes sejam operativamente ligados a sequências controle da transcrição e translação. Neste contexto, o termo “operativamente ligado” pretende significar que um gene de anticorpo está ligado a um vetor de modo que as sequências controle da transcrição e translação dentro do vetor sirvam a função pretendida de regular a transcrição e translação do gene do anticorpo. O vetor de expressão e as sequências controle de expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vetores separados ou ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no (s) vetor (es) de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo e vetor, ou ligação de extremidade romba se nenhum sítio de restrição estiver presente). As regiões variáveis da cadeia leve e pesada dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser usadas para criar genes de anticorpo de tamanho natural de qualquer isótipo de anticorpo, inserindo-os em vetores de expressão que já codificam as constantes de cadeia pesada e as regiões constantes de cadeia leve do desejado isótipo de modo que o segmento VH está operativamente ligado ao (s) segmento (s) CH dentro do vetor e o segmento VL está operativamente ligado ao segmento CL dentro do vetor.

[00302] Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo sinal que facilita a secreção da cadeia do anticorpo de uma célula hospedeira. O gene da cadeia do anticorpo pode ser clonado no vetor de modo que o peptídeo sinal seja ligado na estrutura ao terminal amino do gene da cadeia do anticorpo. O peptídeo sinal pode ser um peptídeo sinal de imunoglobulina

ou um peptídeo sinal heterólogo (isto é, um peptídeo sinal de uma proteína não imunoglobulina).

[00303] Em algumas modalidades, os seguintes peptídeos de sinal de cadeias pesadas e leves de anticorpos humanos podem ser usados: MDWTWRVFCLLAVAPGAHS (SEQ ID NO: 100); METPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO: 101); MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 102); MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 103); MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 104) ou MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 105). Em algumas modalidades, uma sequência de sinal usada para a expressão de qualquer um dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos é SEQ ID NO: 105. Cadeias pesadas e leves de anticorpos anti-MICA/B podem ser expressas com a respectiva sequência de sinal que foi ligado a cada cadeia no hibridoma a partir do qual foram clonados. Abaixo estão as sequências de sinal de vários anticorpos anti-MICA/B presentes no hibridoma a partir do qual foram clonados, cujas sequências de sinal podem ser usadas para expressar o mesmo anticorpo ou outro anticorpo:

[00304] Em algumas modalidades, as cadeias pesadas e leves dos anticorpos anti-MICA/B (por exemplo, MICA.36) podem ser manipuladas com sequências de sinal que diferem daquelas presentes nos hibridomas a partir dos quais foram clonados. Exemplos de tais sequências incluem, mas não se limitam ao seguinte:

(i) Sequência de ácido nucleico da sequência de sinal para a cadeia pesada: ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGAGAGCGCTCGCA (SEQ ID NO: 106)

(ii) Sequência de ácido nucleico da sequência de sinal para a cadeia leve: ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGGCC (SEQ ID NO: 107)

(iii) Sequência de aminoácidos da sequência de sinal para as cadeias pesada e leve: MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 105).

[00305] Além dos genes da cadeia do anticorpo, os vetores de expressão recombinantes podem transportar sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes da cadeia do anticorpo em uma célula hospedeira. O termo “sequência reguladora” pretende incluir promotores, potencializadores e outros elementos controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes da cadeia do anticorpo. Essas sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, pode depender de fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc.. As sequências reguladoras preferidas para a expressão de células hospedeiras de mamíferos incluem elementos virais que direcionam altos níveis de expressão de proteínas em células de mamíferos, tais como promotores e/ou estimuladores derivados de citomegalovírus (CMV), vírus símio 40 (SV40), adenovírus, (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP) e polioma. Alternativamente, as sequências reguladoras não virais podem ser usadas, como o promotor da ubiquitina ou o promotor da β-globina. Além disso, elementos reguladores compostos por sequências de diferentes fontes, como o sistema de promotor SRa, que contém sequências do promotor inicial SV40 e da repetição terminal longa do vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. *et al*. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472).

[00306] Além dos genes da cadeia de anticorpos e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes podem transportar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação)

e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (veja, por exemplo, Patentes Norte-americanas Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas por Axel *et al*). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene di-hidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr- com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção G418).

[00307] Para a expressão das cadeias leves e pesadas, o (s) vetor (es) de expressão codifica (m) as cadeias pesadas e leves são transfectadas para uma célula hospedeira por técnicas padrão. As várias formas do termo “transfecção” destinam-se a abranger uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção de DEAE-dextrano e semelhantes.

[00308] É possível expressar os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, tais como células de mamífero.

[00309] Certas células hospedeiras de mamífero para expressar os anticorpos anti-MICA/B recombinantes aqui descritos incluem Ovário de Hamster Chinês (células de CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA* 77 : 4216-4220, usado com um marcador selecionável DHFR, por exemplo, como descrito em RJ Kaufman e PA Sharp (1982) Mol. Biol. 759: 601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em particular, para uso com células de mieloma NSO, outro sistema de expressão é o sistema de expressão do gene GS descrito em WO

87/04462, WO 89/01036 e EP 338,841. Quando os vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpos são introduzidos em células hospedeiras de mamíferos, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferencialmente, a secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos padrão de purificação de proteínas.

VIII. Imunoconjugados, Derivados de Anticorpos e Diagnósticos

[00310] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser usados para fins de diagnóstico, incluindo teste de amostra e imagem *in vivo*, e para esse fim o anticorpo (ou seu fragmento de ligação) pode ser conjugado a um agente detectável apropriado, para formar um imunoconjugado. Para fins de diagnóstico, os agentes apropriados são marcadores detectáveis que incluem radioisótopos, para imagem de corpo inteiro, e radioisótopos, enzimas, marcadores fluorescentes e outros marcadores de anticorpos adequados para teste de amostras.

[00311] Os marcadores detectáveis que podem ser ligados a qualquer anticorpo anti-MICA/B aqui descritos podem ser qualquer um dos vários tipos usados atualmente no campo de diagnóstico *in vitro*, incluindo marcadores de partículas incluindo sóis de metal, como ouro coloidal, isótopos como I^{125} ou Tc^{99} apresentado, por exemplo, com um agente quelante peptídico do tipo N_2S_2, N_3S ou N_4, cromóforos incluindo marcadores fluorescentes, marcadores luminescentes, marcadores fosforescentes e semelhantes, bem como marcadores de enzima que convertem um determinado substrato em um marcador detectável e marcadores polinucleotídicos que são revelados após amplificação, como por reação em cadeia da polimerase. Marcadores de enzimas adequados incluem peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina

e semelhantes. Por exemplo, o marcador pode ser a enzima fosfatase alcalina, detectada medindo a presença ou formação de quimioluminescência após a conversão de substratos de 1,2 dioxetano, como adamantil metoxifosforiloxifenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)triciclo{3.3.1.1 3,7}decan}-4-il)fenil fosfato dissódico (CSPD), bem como CDP e CDP-STAR® ou outros substratos luminescentes bem conhecidos daqueles na técnica, por exemplo, os quelatos de lantanídeos adequados, tais como Térbio (III) e Európio (III). O meio de detecção é determinado pelo marcador escolhido. O aparecimento do marcador ou de seus produtos de reação pode ser alcançado a olho nu, no caso em que o rótulo é particulado e se acumula em níveis apropriados, ou usando instrumentos como espectrofotômetro, luminômetro, fluorímetro e semelhantes, tudo de acordo com a prática padrão.

[00312] Em algumas modalidades, os métodos de conjugação resultam em ligações que são substancialmente (ou quase) não imunogênicas, por exemplo, ligações de peptídeo- (isto é, amida-), sulfeto-, (estericamente impedido), dissulfeto-, hidrazona- e éter. Estas ligações são quase não imunogênicas e mostram estabilidade razoável no soro (veja, por exemplo, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol*. 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

[00313] Dependendo da natureza bioquímica da porção e do anticorpo, diferentes estratégias de conjugação podem ser usadas. No caso de a porção ser de ocorrência natural ou recombinante de entre 50 a 500 aminoácidos, existem procedimentos padrão em livros didáticos que descrevem a química para a síntese de conjugados de proteínas, que podem ser facilmente seguidos pelo versado na técnica (veja, por exemplo, Hackenberger, CPR e Schwarzer, D., Angew. *Chem. Int. Ed. Engl*. 47 (2008) 10030-10074). Em algumas modalidades, é usada a reação de uma fração maleinimido com um resíduo de cisteína den-

tro do anticorpo ou fração. Esta é uma química de acoplamento especialmente adequada no caso, por exemplo, de um fragmento Fab ou Fab' de um anticorpo ser usado. Alternativamente, em algumas modalidades, o acoplamento à extremidade de terminal C do anticorpo ou fração é realizado. Modificação de terminal C de uma proteína, por exemplo, de um fragmento Fab, pode ser realizado como descrito (Sunbul, M. e Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

[00314] Em geral, a reação específica do sítio e o acoplamento covalente baseiam-se na transformação de um aminoácido natural em um aminoácido com uma reatividade ortogonal à reatividade dos outros grupos funcionais presentes. Por exemplo, uma cisteína específica dentro de um contexto de sequência rara pode ser convertida enzimaticamente em um aldeído (veja, Frese, M. A., e Dierks, T., *ChemBioChem*. 10 (2009) 425-427). Também é possível obter uma modificação de aminoácido desejada utilizando a reatividade enzimática específica de certas enzimas com um aminoácido natural em um determinado contexto de sequência (veja, por exemplo, Taki, M. *et al*., *Prot. Eng. Des. Sel*. 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al*. *Chem. Biol*. 15 (2008) 128-136; e a formação catalisada por protease de ligações C—N é usada por Bordusa, F., Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389-403). A reação específica do sítio e o acoplamento covalente também podem ser alcançados pela reação seletiva de aminoácidos terminais com reagentes de modificação apropriados.

[00315] A reatividade de uma cisteína de terminal N com benzonitrilas (veja, Ren, H. *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 48 (2009) 9658-9662) pode ser usada para alcançar um acoplamento covalente específico do sítio.

[00316] A ligação química nativa também pode contar com resíduos de cisteína de terminal C (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).

[00317] US6437095 B1 descreve um método de conjugação que é baseado na reação mais rápida de uma cisteína dentro de um trecho de aminoácidos carregados negativamente com uma cisteína localizada em um trecho de aminoácidos carregados positivamente.

[00318] A porção também pode ser um peptídeo sintético ou mimetizador de peptídeo. No caso de um polipeptídeo ser sintetizado quimicamente, aminoácidos com reatividade química ortogonal podem ser incorporados durante essa síntese (veja, por exemplo, de Graaf, A. J. *et al*., *Bioconjug. Chem*. 20 (2009) 1281-1295). Uma vez que uma grande variedade de grupos funcionais ortogonais está em jogo e podem ser introduzidos em um peptídeo sintético, a conjugação de tal peptídeo a um ligante é química padrão.

[00319] Para obter um polipeptídeo monomarcado, o conjugado com estequiometria 1:1 pode ser separado por cromatografia de outros produtos colaterais de conjugação. Este procedimento pode ser facilitado usando um membro do par de ligação marcado com corante e um ligante carregado. Ao usar este tipo de membro do par de ligação marcado e altamente carregado negativamente, polipeptídeos monoconjugados são facilmente separados de polipeptídeos não marcados e polipeptídeos que carregam mais de um ligante, uma vez que a diferença de carga e peso molecular pode ser usada para separação. O corante fluorescente pode ser útil para purificar o complexo de componentes não ligados, como um ligante monovalente marcado.

[00320] Em algumas modalidades, a fração ligada a um anticorpo anti-MICA/B é selecionada a partir do grupo que consiste em uma fração de ligação, uma fração de marcação e uma fração biologicamente ativa.

[00321] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos também podem ser conjugados a um agente terapêutico para formar um imunoconjugado, como um conjugado anticorpo-fármaco (ADC). Os agentes tera-

pêuticos adequados incluem antimetabólitos, agentes alquilantes, ligantes de sulco menor de DNA, intercaladores de DNA, reticuladores de DNA, inibidores de histona desacetilase, inibidores de exportação nuclear, inibidores de proteassoma, inibidores de topoisomerase I ou II, inibidores de proteína de choque térmico, inibidores de tirosina cinase, antibióticos e agentes antimitóticos. No ADC, o anticorpo e o agente terapêutico são preferencialmente conjugados por meio de um ligante clivável, como um ligante peptidil, dissulfeto ou hidrazona. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante de peptidila, como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 108), Ala-Asn -Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser ou Glu. Os ADCs podem ser preparados conforme descrito na Patente Norte-americana Nos. 7.087.600; 6.989.452; e 7.129.261; Publicações PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; e WO 08/103693; Publicações de Patente Norte-americana 20060024317; 20060004081; e 20060247295.

[00322] Em algumas modalidades, o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em uma citotoxina, um fármaco não citotóxico, um agente radioativo, um segundo anticorpo, uma enzima, um agente antineoplásico e qualquer combinação dos mesmos.

[00323] Em algumas modalidades, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e uma citotoxina. A citotoxina pode ser selecionada a partir de qualquer citotoxina conhecida na técnica. Em algumas modalidades, a citotoxina é selecionada a partir do grupo que consiste em dolastatina, monometil auristatina E (MMAE), maitansina, duocarmicina, caliqueamicina, pirrolobenzodiazepina, duocarmicina, centanamicina, SN38, doxorrubicina, um derivado destes, um análogo sintético da mesma e qualquer combinação destes. Em certas modalidades, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e citotoxina A. Em outras modalidades, o imunoconjugado compreende

um anticorpo anti-MICA/B e uma fármaco não citotóxico.

[00324] Em algumas modalidades, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e um agente radioativo. Em algumas modalidades, o agente radioativo é um radionucleotídeo. Em certas modalidades, o agente radioativo compreende iodo radioativo. Em modalidades particulares, o agente radioativo compreende 131-iodo. Em outras modalidades, o agente radioativo compreende o isótopo radioativo Ítrio-90.

[00325] Em algumas modalidades, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e um segundo anticorpo. O segundo anticorpo pode ser qualquer anticorpo descrito na presente descrição, incluindo, mas não limitado a, um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-2, IL-8, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, VISTA, CD96, CD27, GITR e qualquer combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e um anticorpo anti-PD-1. Em outra modalidade, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e nivolumabe.

[00326] Em uma modalidade, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e uma IL-2 peguilada ou IL-10 peguilada.

[00327] Em certas modalidades, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e uma enzima. Em algumas modalidades, a enzima compreende glicose oxidase. Em algumas modalidades, a enzima compreende uma peroxidase. Em algumas modalidades, a enzima compreende mieloperoxidase. Em algumas modalidades, a enzima compreende glicose oxidase. Em algumas modalidades, a enzima compreende peroxidase de rábano silvestre.

[00328] Em certas modalidades, o imunoconjugado compreende um anticorpo anti-MICA/B e um agente antineoplásico. O agente antineo-

plásico pode ser qualquer agente conhecido na técnica. Em algumas modalidades, o agente antineoplásico é epirrubicina. Em algumas modalidades, o agente antineoplásico é um superantígeno. Em certas modalidades, o superantígeno é a enterotoxina A estafilocócica (SEA/E-120; estafenatox).

[00329] Os anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, aqueles aqui descritos, também podem ser usados para detectar MICA/B, tal como MICA/B humana, por exemplo, MICA/B humana na superfície de uma célula ou MICA/B solúvel no soro. Os anticorpos podem ser usados, por exemplo, em um ensaio ELISA ou em citometria de fluxo. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B é colocado em contato com células ou soro por um tempo apropriado para que a ligação específica ocorra e, em seguida, um reagente, por exemplo, um anticorpo que detecta o anticorpo anti-MICA/B, é adicionado. Ensaios exemplares são fornecidos nos Exemplos. Métodos exemplares para detectar MICA/B, por exemplo, MICA/B expresso na superfície ou MICA/B solúvel (sMICA/B) em uma amostra (soro) compreendem (i) o contato de uma amostra com um anticorpo anti-MICA/B, por um tempo suficiente para permitir a ligação específica do anticorpo anti-MICA/B à MICA/B na amostra, e (2) contatar a amostra com um reagente de detecção, por exemplo, um anticorpo, que se liga especificamente ao anticorpo anti-MICA/B, tal como para a região Fc do anticorpo anti-MICA/B, para assim detectar MICA/B ligado pelo anticorpo anti-MICA/B. As etapas de lavagem podem ser incluídas após a incubação com o anticorpo e/ou reagente de detecção. Os anticorpos anti-MICA/B para uso nesses métodos não precisam estar ligados a um marcador ou a agentes de detecção, pois um agente de detecção separado pode ser usado.

[00330] Outros usos para anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, como monoterapia ou terapia de combinação, são fornecidos em outro

lugar aqui, por exemplo, na seção relativa a tratamentos de combinação.

IX. Moléculas Biespecíficas

[00331] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser usados para formar moléculas biespecíficas. Um anticorpo anti-MICA/B, ou suas porções de ligação ao antígeno, podem ser derivatizados ou ligados a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligante para um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios de ligação ou moléculas alvo diferentes. Por exemplo, um anticorpo anti-MICA/B pode ser ligado a um anticorpo ou scFv que se liga especificamente a qualquer proteína que pode ser usada como alvos potenciais para tratamentos de combinação, como as proteínas aqui descritas (por exemplo, anticorpos para PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-2, IL-8, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CD27, CD96, VISTA ou GITR ou IL-2 peguilada ou IL-10 peguilada). O anticorpo aqui descrito pode de fato ser derivado ou ligado a mais de uma outra molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais de dois sítios de ligação diferentes e/ou moléculas alvo; tais moléculas multiespecíficas também se destinam a ser abrangidas pelo termo “molécula biespecífica” quando aqui usado. Para criar uma molécula biespecífica aqui descrita, um anticorpo aqui descrito pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outra forma) a uma ou mais outras moléculas de ligação, como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou ligação mimético, de modo que resulta uma molécula biespecífica.

[00332] Por conseguinte, são fornecidas aqui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de liga-

ção para MICA/B e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítopo alvo. Em algumas modalidades aqui descritas em que a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode incluir ainda uma terceira especificidade de ligação.

[00333] Em algumas modalidades, as moléculas biespecíficas aqui descritas compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')2, Fv ou um Fv de cadeia única (scFv). O anticorpo também pode ser um dímero de cadeia leve ou de cadeia pesada, ou qualquer fragmento mínimo do mesmo, como um Fv ou um construto de cadeia única, conforme descrito em Ladner *et al*. Patente Norte-americana No. 4.946.778.

[00334] Embora os anticorpos monoclonais humanos sejam preferidos, outros anticorpos que podem ser usados nas moléculas biespecíficas aqui descritas são anticorpos monoclonais de murino, quiméricos e humanizados.

[00335] As moléculas biespecíficas aqui descritas podem ser preparadas por conjugação das especificidades de ligação do constituinte usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e, em seguida, conjugada entre si. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação podem ser usados para a conjugação covalente. Exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) e sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohaxano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (veja, por exemplo, Karpovsky *et al*. (1984) *J. Exp. Med*. 160: 1686; Liu, MA *et al*. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA* 82:8648). Outros métodos incluem

aqueles descritos em Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt*. No. 78, 118-132; Brennan *et al*. (1985) *Science* 229: 81-83) e Glennie *et al*. (1987) *J. Immunol*. 139: 2367-2375). Alguns agentes de conjugação são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

[00336] Quando as especificidades de ligação são anticorpos, eles podem ser conjugados via ligação sulfidrila das regiões de articulação do terminal C das duas cadeias pesadas. Em algumas modalidades, a região de articulação é modificada para conter um número ímpar de resíduos sulfidrila, preferivelmente um, antes da conjugação.

[00337] Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente útil quando a molécula biespecífica é uma proteína de fusão mAb x mAb, mAb x Fab, mAb x $(scFv)_2$, Fab x $F(ab')_2$ ou ligante x Fab. Um anticorpo biespecífico pode compreender um anticorpo compreendendo um scFv no terminal C de cada cadeia pesada. Uma molécula biespecífica aqui descrita pode ser uma molécula de cadeia única compreendendo um anticorpo de cadeia única e um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia única compreendendo dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia simples. Os métodos para preparar moléculas biespecíficas são descritos, por exemplo, na Patente Norte-americana Número 5.260.203; Patente Norte-americana Número 5.455.030; Patente Norte-americana Número 4.881.175; Patente Norte-americana Número 5.132.405; Patente Norte-americana Número 5.091.513; Patente Norte-americana Número 5.476.786; Patente Norte-americana Número 5.013.653; Patente Norte-americana Número 5.258.498; e Patente Norte-americana Número 5.482.858.

[00338] A ligação das moléculas biespecíficas aos seus alvos específicos pode ser confirmada usando métodos reconhecidos na técnica,

tais como ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise de FACS, bioensaio (por exemplo, inibição do crescimento) ou ensaio de Western Blot. Cada um desses ensaios geralmente detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de particular interesse, usando um reagente marcado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse.

X. Composições

[00339] Além disso, são fornecidas composições, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos anti-MICA/B ou combinação com anticorpos para outros alvos, ou porção(ões) de ligação ao antígeno dos mesmos, aqui descritos, formulados em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Essas composições podem incluir um ou uma combinação de (por exemplo, dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas aqui descritas. Por exemplo, uma composição farmacêutica aqui descrita pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficos) que se ligam a diferentes epítopos no antígeno alvo ou que têm atividades complementares.

[00340] Em algumas modalidades, uma composição compreende um anticorpo anti-MICA/B em uma concentração de pelo menos 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 1-300 mg/ml ou 100-300 mg/ml.

[00341] As composições farmacêuticas aqui descritas também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-MICA/B aqui descrito combinado com pelo menos um outro agente anticâncer e/ou imunomodulador, por exemplo, estimulador de células T (por exemplo, ativador). Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados na terapia de combinação são descritos em mais detalhes abaixo na seção sobre os usos dos anti-

corpos anti-MICA/B aqui descritos.

[00342] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser combinado com pelo menos um outro agente selecionado a partir de fármacos de quimioterapia, fármacos de moléculas pequenas e anticorpos que estimulam a resposta imune a um determinado câncer. Em alguns casos, o anticorpo anti-MICA/B pode ser combinado com, por exemplo, um ou mais de um anticorpo anti-CTLA-4, um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-PD-L1, um anticorpo anti-OX40 (também conhecido como CD134, TNFRSF4, ACT35 e/ou TXGP1 (por exemplo, BMS986178 ou MDX-1803), um anticorpo anti-CD137, um anticorpo anti-LAG-3, um anticorpo anti-GITR, um anticorpo anti-KIR, um anticorpo anti-TGFβ, um anticorpo anti-IL-10, uma molécula de IL-10 de ação prolongada (por exemplo, fusão IL-10-Fc, ou IL-10 Pegilada, como AM0010 de ARMO BioSciences), uma IL-2 de ação prolongada (por exemplo, moléculas de IL-2 Pegiladas, tal como NKTR-214 de Nektar; veja Patente Norte-americana 8.252.275, WO12/065086 e WO15/125159), um anticorpo anti-VISTA, um anticorpo anti-CD96, um anticorpo anti-IL-8, um anti-B7-H4, um anticorpo de ligante anti-Fas, um anticorpo anti-CXCR4, um anticorpo anti-mesotelina, um anticorpo anti-CD27 ou qualquer combinação dos mesmos.

[00343] Em outras modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser formulado com um segundo anticorpo. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo se liga especificamente a uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-2, VISTA, CD96, IL-8, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CD27, GITR e qualquer combinação dos mesmos.

[00344] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-1. O anticorpo anti-PD-1 pode ser qualquer anticorpo que se liga ao PD-1 e inibe a interação de PD-1 e PD-L1. Em

algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é qualquer anticorpo anti-PD-1 divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser nivolumabe. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser pembrolizumabe.

[00345] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-L1. O anticorpo anti-PD-L1 pode ser qualquer anticorpo que se liga ao PD-L1 e inibe a interação de PD-1 e PD-L1. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é qualquer anticorpo anti-PD-L1 divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser atezolizumabe. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser durvalumabe. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser avelumabe.

[00346] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-CTLA-4. O anticorpo anti-CTLA-4 pode ser qualquer anticorpo que se liga a CTLA-4 e inibe sua atividade. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 é qualquer anticorpo anti-CTLA-4 divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser tremelimumabe. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser ipilimumabe.

[00347] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-LAG3. O anticorpo anti-LAG3 pode ser qualquer anticorpo que se liga a LAG-3 e inibe sua atividade. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-LAG3 é qualquer anticorpo anti-LAG3 divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser 25F7.

[00348] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-CD137. O anticorpo anti-CD137 pode ser qualquer anticorpo que se liga ao CD137 e inibe sua atividade. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é qualquer anticorpo anti-CD137 divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode

ser urelumabe.

[00349] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-KIR. O anticorpo anti-KIR pode ser qualquer anticorpo que se liga a KIR e inibe sua atividade. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-KIR é qualquer anticorpo anti-KIR divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser lirilumabe.

[00350] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-GITR. O anticorpo anti-GITR pode ser qualquer anticorpo que se liga ao GITR e inibe sua atividade. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-GITR é qualquer anticorpo anti-GITR divulgado aqui. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser MK4166. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser TRX518.

[00351] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-CD96.

[00352] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-TIM3.

[00353] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-VISTA.

[00354] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-NKG2a.

[00355] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-ICOS.

[00356] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-OX40.

[00357] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-IL8, como HuMax®-IL8 (BMS-986253).

[00358] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser formulado com uma molécula de IL-10 de ação prolongada. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser formulado

com a molécula de fusão IL-10-Fc. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser formulado com IL-10 Pegilada, como AM0010 de ARMO BioSciences.

[00359] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser formulado com uma IL-2 de ação prolongada. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser formulado com moléculas de IL-2 Pegiladas, como NKTR-214 de Nektar; veja, Patente Norte-americana 8.252.275, WO12/065086 e WO15/125159.

[00360] Em algumas modalidades, a composição da invenção compreende ainda um agente de volume. Um agente de volume pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em NaCl, manitol, glicina, alanina e qualquer combinação dos mesmos. Em outras modalidades, a composição da invenção compreende um agente estabilizador. O agente estabilizador pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em sacarose, trealose, rafinose, arginina; ou qualquer combinação dos mesmos. Em outras modalidades, a composição da invenção compreende um tensoativo. O tensoativo pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em polissorbato 80 (PS80), polissorbato 20 (PS20) e qualquer combinação dos mesmos. Em certas modalidades, a composição compreende ainda um agente quelante. O agente quelante pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), ácido etilenodiaminotetracético, ácido nitrilotriacético e qualquer combinação dos mesmos.

[00361] Em outras modalidades, a composição compreende um terceiro anticorpo. Em algumas modalidades, o terceiro anticorpo é qualquer anticorpo divulgado aqui.

[00362] Em uma modalidade, a composição compreende ainda NaCl, manitol, ácido pentético (DTPA), sacarose, PS80 e qualquer combinação dos mesmos.

[00363] Quando aqui usado, "veículo farmaceuticamente aceitável"

inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção e similares que são fisiologicamente compatíveis. Em algumas modalidades, o veículo é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Uma opção para injeção subcutânea é baseada na tecnologia de liberação de fármaco de Halozyme Therapeutics' ENHANZE®, envolvendo uma coformulação de um Ab com a enzima hialuronidase humana recombinante (rHuPH20) que remove as limitações tradicionais no volume de produtos biológicos e fármacos que podem ser liberados por via subcutânea devido à matriz extracelular (Patente Norte-americana No. 7.767.429). Dependendo da rotina de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, imunoconjugado ou molécula biespecífica, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[00364] Os compostos farmacêuticos aqui descritos podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que mantém a atividade biológica desejada do composto original e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (veja, por exemplo, Berge, S.M., *et al*. (1977) *J. Pharm. Sci*. 66: 1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fósforo e similares, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos, como ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanoicos substituído por fenila, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino terrosos, como sódio, potássio, magné-

sio, cálcio e similares, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglicamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

[00365] Uma composição farmacêutica aqui descrita também pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e similares; e (3) agentes quelantes de metal, como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similares.

[00366] Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser usados nas composições farmacêuticas aqui descritas incluem água, etanol, polióis (como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e similares) e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, como azeite e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pelo uso de tensoativos.

[00367] Estas composições também podem conter adjuvantes, como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de micro-organismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra, quanto pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada

pela inclusão de agentes que retardam a absorção, como monoestearato de alumínio e gelatina.

[00368] Os veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, o uso deste nas composições farmacêuticas aqui descritas é contemplado. Uma composição farmacêutica pode compreender um conservante ou pode ser desprovida de um conservante. Compostos ativos suplementares podem ser incorporados nas composições.

[00369] As composições terapêuticas normalmente devem ser estéreis e estáveis nas condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de fármaco. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e similares) e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, as composições podem incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[00370] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária em um solven-

te apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por microfiltração de esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados aqui. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, alguns métodos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento, (liofilização) que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[00371] A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do indivíduo a ser tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única será geralmente a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento do ingrediente ativo, de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, ou de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento do ingrediente ativo em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00372] Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária conforme aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente dis-

cretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem aqui descritas são ditadas por e diretamente dependentes (a) das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) das limitações inerentes à técnica de composição de tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

[00373] Para a administração de um anticorpo anti-MICA/B, por exemplo, descrito aqui, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg. Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado em uma dose fixa (regime de dose fixa). Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado em uma dose fixa com outro anticorpo. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B é administrado em uma dose com base no peso corporal.

[00374] Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, caso em que a dosagem de cada anticorpo administrado inclui-se nas faixas indicadas. O anticorpo é geralmente administrado em várias ocasiões. Os intervalos entre dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanais, mensais, trimestrais ou anuais. Os intervalos também podem ser irregulares, conforme indicado pela medição dos níveis sanguíneos de anticorpos para o antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para atingir uma concentração de anticorpo no plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml.

[00375] Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com outro anticorpo no regime de dosagem do outro anticorpo. Por exemplo, um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com um anticorpo anti-

PD-1, como nivolumabe (OPDIVO®), a cada duas semanas como uma infusão *i.v.* durante 60 minutos até que a progressão da doença ou toxicidade inaceitável ocorra. Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com pembrolizumabe (KEYTRUDA®) a cada 3 semanas como uma infusão i.v. durante 30 minutos até que a progressão da doença ou toxicidade inaceitável ocorra. Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com atezolizumabe (TECENTRIQ™) a cada 3 semanas como uma infusão i.v. durante 60 ou 30 minutos até que a progressão da doença ou toxicidade inaceitável ocorra.

[00376] Um anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação prolongada, caso em que uma administração menos frequente é necessária. A dosagem e a frequência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. Em geral, os anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguidos por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente infrequentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam recebendo tratamento pelo resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes necessária até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada, e até que o paciente mostre uma melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode receber um regime profilático.

[00377] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas aqui descritas podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente.

O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos, incluindo a atividade das composições particulares aqui descritas, ou o éster, sal ou amida do mesmo, a rotina de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular a ser usado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares usadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente a ser tratado, e fatores similares bem conhecidos nas técnicas médicas.

[00378] Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-MICA/B aqui descrito pode resultar em uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença, um aumento na frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença, ou uma prevenção de deficiência ou incapacidade devido à aflição da doença. No contexto do câncer, uma dose terapeuticamente eficaz pode resultar em aumento da sobrevida, por exemplo, sobrevida global e/ou prevenção de maior deterioração dos sintomas físicos associados ao câncer. Os sintomas do câncer são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, características da verruga incomuns, uma mudança na aparência de uma verruga, incluindo assimetria, borda, cor e/ou diâmetro, uma área de pele recentemente pigmentada, uma verruga anormal, área escurecida sob as unhas, protuberâncias mamárias, alterações mamilares, cistos mamários, dor mamária, morte, perda de peso, fraqueza, fadiga excessiva, dificuldade para comer, perda de apetite, tosse crônica, agravamento da falta de ar, tosse com sangue, sangue na urina, sangue nas fezes, náuseas, vômitos, metástases hepáticas, metástases pulmonares, metástases ósseas, plenitude abdominal, distensão abdominal, fluido na cavidade peritoneal, sangramento vaginal, constipação, distensão abdominal, perfuração do cólon, peritonite aguda (infecção, febre, dor), dor, vômito com sangue, sudorese intensa, febre, pressão

alta, anemia, diarreia, icterícia, tontura, calafrios, espasmos musculares, metástases do cólon, metástases pulmonares, metástases da bexiga, metástases hepáticas, metástases ósseas, metástases renais e metástases pancreáticas, dificuldade para engolir e similares.

[00379] Uma dose terapeuticamente eficaz pode prevenir ou eliminar o câncer, como pode ser desejado quando os sinais precoces ou preliminares da doença estão presentes. Os exames laboratoriais utilizados no diagnóstico de câncer incluem químicas (incluindo a medição dos níveis de MICA/B), hematologia, sorologia e radiologia. Consequentemente, qualquer ensaio clínico ou bioquímico que monitore qualquer um dos anteriores pode ser usado para determinar se um determinado tratamento é uma dose terapeuticamente eficaz para o tratamento do câncer. Alguém versado na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com base em fatores como o tamanho do indivíduo, a gravidade dos sintomas do indivíduo e a composição particular ou rotina de administração selecionada.

[00380] Uma composição aqui descrita pode ser administrada através de uma ou mais rotinas de administração usando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado por alguém versado na técnica, a rotina e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados. As rotinas de administração para os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem incluir a rotina de administração intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras rotinas parentéricas, por exemplo, por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral", quando aqui usada, significa modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-

articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intraesternal.

[00381] Alternativamente, um anticorpo aqui descrito pode ser administrado potencialmente por uma rotina não parenteral, como uma rotina de administração tópica, epidérmica ou mucosal, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou tópica.

[00382] Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra a liberação rápida, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[00383] As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em algumas modalidades, uma composição terapêutica aqui descrita pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos divulgados na Patente Norte-americana Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos para uso com anticorpos anti-MICA/B aqui descritos incluem: Patente Norte-americana No. 4.487.603, que divulga uma bomba de micro-infusão implantável para distribuir medicamentos em uma taxa controlada; Patente Norte-americana No. 4.486.194, que divulga um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente Norte-americana No. 4.447.233, que divulga uma bomba de infusão de

medicamento para distribuir medicamento a uma taxa de infusão precisa; Patente Norte-americana No. 4.447.224, que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua de fármacos; Patente Norte-americana No. 4.439.196, que divulga um sistema de liberação osmótica de fármacos tendo compartimentos de múltiplas câmaras; e Patente Norte-americana No. 4.475.196, que divulga um sistema de liberação osmótica de fármaco. Estas patentes são aqui incorporadas por referência. Muitos outros implantes, sistemas de liberação e módulos são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00384] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser formulados para garantir a distribuição adequada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos aqui descritos cruzem a BBB (se desejado, por exemplo, para cânceres cerebrais), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação de lipossomas, veja, por exemplo, Patentes Norte-americanas 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são transportadas seletivamente para células ou órgãos específicos, realçando assim a liberação do fármaco direcionada (*veja, por exemplo*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Porções de direcionamento exemplares incluem folato ou biotina (*veja, por exemplo,* Patente Norte-americana 5.416.016 por Low *et al.*); manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 153: 1038); anticorpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother*. 39: 180); receptor de proteína A de tensoativo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); pl20 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem*. 269:9090); veja, também K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett*. 346: 123; J.J. Killion; I.J.

Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

XI. Usos e Métodos

[00385] Certos aspectos da presente descrição são direcionados ao método de tratamento de um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo anti-MICA/B aqui divulgado, um polinucleotídeo que codifica o anticorpo anti-MICA/B, um vetor que compreende o polinucleotídeo, uma célula hospedeira que compreende o polinucleotídeo, um imunoconjugado que compreende um anticorpo anti-MICA/B ou qualquer combinação dos mesmos.

[00386] Certos aspectos da presente descrição são direcionados a um método de tratamento de um câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose eficaz de uma composição aqui divulgada (por exemplo, um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira, imunoconjugado, ou composição farmacêutica). Em outros aspectos, a presente descrição é direcionada a um método de inibir a liberação de MICA/B por uma célula tumoral em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose eficaz de uma composição aqui divulgada. Em outros aspectos, a presente descrição é direcionada a um método de redução da liberação de MICA/B no soro e/ou retenção de MICA/B na superfície celular em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose eficaz de uma composição divulgada aqui. Em outros aspectos, a presente descrição é direcionada a um método para matar uma célula tumoral em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose eficaz de uma composição aqui divulgada. Em outros aspectos, a presente descrição é direcionada a um método de redução do tamanho de um tumor em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose eficaz de uma composição divulgada

neste documento. Em outras modalidades, a presente descrição é direcionada para inibir a metástase de um tumor em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma dose eficaz de uma composição aqui divulgada. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

[00387] As composições da presente descrição podem ser administradas usando qualquer via farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição (por exemplo, anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira, imunoconjugado ou composição farmacêutica) é administrada por via intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intradérmica, subcutaneamente, subcuticularmente, intra-articularmente, subcapsularmente, subaracnoide, intraespinhal, epidural, intraesternal, tópica, epidérmica, mucosal, ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, a composição é administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, a composição é administrada por via subcutânea.

[00388] Em certas modalidades, o método reduz o tamanho de um câncer, por exemplo, o tamanho de um tumor, no indivíduo. Em algumas modalidades, o tamanho do câncer é reduzido em pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90%.

[00389] Em algumas modalidades, o método aumenta a sobrevida do indivíduo. Em algumas modalidades, a sobrevida geral é aumentada em relação à sobrevida geral média de um indivíduo com o mesmo câncer, mas tratado com uma terapia diferente. Em certas modalida-

des, a sobrevida global é aumentada em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes. Em algumas modalidades, a sobrevida global é aumentada em pelo menos cerca de um mês, pelo menos cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 7 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 9 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 11 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 15 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 21 meses, pelo menos cerca de 2 anos, pelo menos cerca de 3 anos, pelo menos cerca de 4 anos, pelo menos cerca de 5 anos, ou pelo menos cerca de 10 anos.

[00390] Em algumas modalidades, o método aumenta a sobrevida livre de progressão do indivíduo. Em algumas modalidades, a sobrevida global é aumentada em relação à sobrevida livre de progressão média de um indivíduo com o mesmo câncer, mas tratado com uma terapia diferente. Em certas modalidades, a sobrevida livre de progressão é aumentada em pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes. Em algumas modalidades, a sobrevida global é aumentada em pelo menos cerca de um mês, pelo menos cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 7 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 9 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 11 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 15 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 21 me-

ses, pelo menos cerca de 2 anos, pelo menos cerca de 3 anos, pelo menos cerca de 4 anos, pelo menos cerca de 5 anos ou pelo menos cerca de 10 anos.

[00391] Em algumas modalidades, o método aumenta a taxa de resposta objetiva do indivíduo. Em certas modalidades, o método induz uma resposta completa no indivíduo. Em algumas modalidades, o método induz uma resposta parcial no indivíduo.

[00392] Em algumas modalidades, o método compreende a administração de um anticorpo anti-MICA/B (ou um polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira ou imunoconjugado) aqui divulgado e uma segunda terapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia é administrada antes do anticorpo anti-MICA/B. Em algumas modalidades, a segunda terapia é administrada após o anticorpo anti-MICA/B. Em algumas modalidades, a segunda terapia é administrada simultaneamente com o anticorpo anti-MICA/B. Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B e a segunda terapia são administrados separadamente. Em outras modalidades, o anticorpo anti-MICA/B e a segunda terapia são administrados em uma única formulação.

[00393] A segunda terapia pode ser qualquer outra terapia conhecida na técnica. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma imunoterapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma quimioterapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma radioterapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma cirurgia. Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende a administração de um segundo agente terapêutico.

[00394] Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende um segundo anticorpo. Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína selecionada do

Coestimulador de células T Induzíveis (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), NKG2A, CD27, proteína Relacionada ao TNFR Induzida por Glicocorticoide (GITR) e Mediador de Entrada do Vírus do Herpes (HVEM), Morte Programada-1 (PD-1), Ligante de Morte Programada-1 (PD-L1), CTLA-4, Atenuador de Linfócitos B e T (BTLA), Imunoglobulina de células T e domínio de Mucina-3 (TIM-3), Gene de Ativação de Linfócitos-3 (LAG-3), receptor de adenosina A2a (A2aR), Receptor tipo Lectina de célula Exterminadora G1 (KLRG-1), Receptor de Célula Exterminadora Natural 2B4 (CD244), CD160, Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM (TIGIT) e o receptor para Supressor de Ig de domínio V de Ativação de células T (VISTA), NKG2a, KIR, TGFβ, IL-10, IL-8, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CEACAM-1, CD96, CD52, HER2 e qualquer combinação dos mesmos.

XI.A. Anticorpos Anti-PD-1

[00395] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-1. Os anticorpos anti-PD-1 que são conhecidos na técnica podem ser usados nas composições e métodos atualmente descritos. Vários anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente ao PD-1 com alta afinidade foram divulgados na Patente Norte-americana No. 8.008.449. Os anticorpos humanos anti-PD-1 divulgados na Patente Norte-americana No. 8.008.449 demonstraram exibir uma ou mais das seguintes características: (a) ligam-se ao PD-1 humana com uma K_D de 1 x 10^{-7} M ou menos, como determinado por ressonância de plasmônio superficial usando um sistema biossensor Biacore; (b) não se ligam substancialmente a CD28, CTLA-4 ou ICOS humano; (c) aumentam a proliferação de células T em um ensaio de reação de linfócitos mistos (MLR); (d) aumentam a produção de interferon-γ em um ensaio de MLR; (e) aumentam a secreção de IL-2 em um ensaio de MLR; (f) ligam-se ao PD-1 humano e PD-1 de macaco cinomolgo; (g) inibem a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 ao PD-1; (h) es-

timulam respostas de memória específicas do antígeno; (i) estimulam respostas de anticorpos; e (j) inibem o crescimento de células tumorais *in vivo*. Os anticorpos anti-PD-1 utilizáveis na presente invenção incluem anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao PD-1 humano e exibem pelo menos uma, em algumas modalidades, pelo menos cinco, das características anteriores.

[00396] Outros anticorpos monoclonais anti-PD-1 foram descritos, por exemplo, na Patente Norte-americana Nos. 6.808.710, 7.488.802, 8.168.757 e 8.354.509, Publicação Norte-americana No. 2016/0272708 e Publicação PCT Nos. WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, WO 2017/19846, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 e WO 2017/133540, cada um dos quais é incorporado por referência em sua totalidade.

[00397] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é selecionado a partir do grupo que consiste em nivolumabe (também conhecido como OPDIVO®, 5C4, BMS-936558, MDX-1106 e ONO-4538), pembrolizumabe (Merck; também conhecido como KEYTRUDA ®, lambrolizumabe e MK-3475; veja, WO2008/156712), PDR001 (Novartis; veja WO 2015/112900), MEDI-0680 (AstraZeneca; também conhecido como AMP-514; veja WO 2012/145493), cemiplimabe (Regeneron; também conhecido como REGN-2810; veja WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; veja Si-Yang Liu *et al*., *J. Hematol. Oncol*. *10*:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; veja WO 2015/35606 e US 2015/0079109), INCSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; tam-

bém conhecido como SHR-1210; veja WO 2015/085847; Si-Yang Liu *et al*., *J. Hematol. Oncol*. *10*:136 (2017)), TSR-042 (Tesaro Biopharmaceutical; também conhecido como ANB011; veja WO2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; também conhecido como WBP3055; veja Si-Yang Liu *et al*., *J. Hematol. Oncol*. *10*:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; veja WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; veja WO 2017/040790), MGA012 (Macrogenics, veja WO 2017/19846) e IBI308 (Innovent; veja WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825 e WO 2017/133540).

[00398] Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-1 é nivolumabe. Nivolumabe é um anticorpo inibidor do ponto de checagem imune de PD-1 IgG4 (S228P) totalmente humano que impede seletivamente a interação com ligantes de PD-1 (PD-L1 e PD-L2), bloqueando assim a subregulação das funções de células T antitumorais (Patente Norte-americana No. 8.008.449; Wang *et al*., 2014 *Cancer Immunol Res*. *2(9)*:846-56).

[00399] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-1 é pembrolizumabe. Pembrolizumabe é um anticorpo IgG4 monoclonal humanizado (S228P) dirigido contra o receptor da superfície celular humana PD-1 (morte programada-1 ou morte celular programada-1). Pembrolizumabe é descrito, por exemplo, na Patente Norte-americana Nos. 8.354.509 e 8.900.587.

[00400] Os anticorpos anti-PD-1 utilizáveis nas composições e métodos divulgados também incluem anticorpos isolados que se ligam especificamente ao PD-1 humano e competem de forma cruzada para a ligação ao PD-1 humano com qualquer anticorpo anti-PD-1 aqui divulgado, por exemplo, nivolumabe (veja, por exemplo, Patente Norte-americana No. 8.008.449 e 8.779.105; WO 2013/173223). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 se liga ao mesmo epítopo que

qualquer um dos anticorpos anti-PD-1 aqui descritos, por exemplo, nivolumabe. A capacidade dos anticorpos de competir cruzadamente para a ligação a um antígeno indica que esses anticorpos monoclonais se ligam à mesma região do epítopo do antígeno e impedem estericamente a ligação de outros anticorpos de competição cruzada a essa região do epítopo particular. Espera-se que esses anticorpos de competição cruzada tenham propriedades funcionais muito semelhantes às do anticorpo de referência, por exemplo, nivolumabe, em virtude da sua ligação à mesma região de epítopo de PD-1. Os anticorpos de competição cruzada podem ser prontamente identificados com base na sua capacidade de competir cruzadamente com o nivolumabe em ensaios de ligação ao PD-1 padrão, como a análise Biacore, ensaios ELISA ou citometria de fluxo (veja, por exemplo, WO 2013/173223).

[00401] Em certas modalidades, os anticorpos que competem de forma cruzada para a ligação ao PD-1 humano com, ou se ligam à mesma região de epítopo do anticorpo PD-1 humano, nivolumabe, são anticorpos monoclonais. Para administração a indivíduos humanos, estes anticorpos de competição cruzada são anticorpos quiméricos, anticorpos modificados ou anticorpos humanizados ou humanos. Esses anticorpos monoclonais quiméricos, modificados, humanizados ou humanos podem ser preparados e isolados por métodos bem conhecidos na técnica.

[00402] Os anticorpos anti-PD-1 utilizáveis nas composições e métodos da invenção divulgada também incluem porções de ligação ao antígeno dos anticorpos acima. Foi amplamente demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de tamanho natural.

[00403] Os anticorpos anti-PD-1 adequados para uso nas composições e métodos divulgados são anticorpos que se ligam ao PD-1 com alta especificidade e afinidade, bloqueiam a ligação de PD-L1 e/ou PD-

L2 e inibem o efeito imunossupressor da via de sinalização de PD-1. Em qualquer uma das composições ou métodos aqui divulgados, um "anticorpo" anti-PD-1 inclui uma porção ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga ao receptor PD-1 e exibe as propriedades funcionais semelhantes às de anticorpos inteiros na inibição da ligação ao ligante e super-regulação do sistema imune. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compete de forma cruzada com o nivolumabe pela ligação ao PD-1 humano.

XI.B. Anticorpos Anti-PD-L1

[00404] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-L1. Os anticorpos anti-PD-L1 que são conhecidos na técnica podem ser usados nas composições e métodos da presente descrição. Exemplos de anticorpos anti-PD-L1 úteis nas composições e métodos da presente descrição incluem os anticorpos divulgados na Patente Norte-americana No. 9.580.507. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 divulgados na Patente Norte-americana No. 9.580.507 demonstraram exibir uma ou mais das seguintes características: (a) ligam-se ao PD-L1 humano com uma K_D de 1 x 10^{-7} M ou menos, conforme determinado por ressonância de plasmônio superficial usando um sistema biossensor Biacore; (b) aumento da proliferação de células T em um ensaio de reação de linfócitos mistos (MLR); (c) aumento da produção de interferon-γ em um ensaio de MLR; (d) aumento da secreção de IL-2 em um ensaio MLR; (e) estímulo das respostas de anticorpos; e (f) reversão do efeito das células T reguladoras nas células T efetoras e/ou células dendríticas. Anticorpos anti-PD-L1 utilizáveis na presente invenção inclui anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao PD-L1 humano e exibem pelo menos uma, em algumas modalidades, pelo menos cinco, das características anteriores.

[00405] Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em BMS-936559 (também conhecido como 12A4, MDX-1105; veja, por exemplo, Patente Norte-americana 7.943.743 e WO 2013/173223), atezolizumabe (Roche; também conhecido como TECENTRIQ®; MPDL3280A, RG7446; veja, Patente Norte-americana 8.217.149; veja, também, Herbst *et al*. (2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000), durvalumabe (AstraZeneca; também conhecido como IMFINZI™, MEDI-4736; veja WO 2011/066389), avelumabe (Pfizer; também conhecido como BAVENCIO®, MSB-0010718C; veja WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; veja WO2013/181634), CX-072 (Cytomx; veja WO2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; veja Zhang *et al*., *Cell Discov*. *7*:3 (March 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; veja, por exemplo, WO 2017/034916), e CK-301 (Checkpoint Therapeutics; veja Gorelik *et al*., AACR: Abstract 4606 (Apr 2016)).

[00406] Em certas modalidades, o anticorpo PD-L1 é atezolizumabe (TECENTRIQ®). O atezolizumabe é um anticorpo anti-PD-L1 monoclonal de IgG1 totalmente humanizado.

[00407] Em certas modalidades, o anticorpo PD-L1 é durvalumabe (IMFINZI™). Durvalumabe é um anticorpo anti-PD-L1 monoclonal capa IgG1 humano.

[00408] Em certas modalidades, o anticorpo PD-L1 é avelumabe (BAVENCIO®). Avelumabe é um anticorpo anti-PD-L1 monoclonal lambda IgG1 humano.

[00409] Em outras modalidades, o anticorpo monoclonal anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1 e qualquer combinação dos mesmos.

[00410] Os anticorpos anti-PD-L1 utilizáveis nas composições e métodos divulgados também incluem anticorpos isolados que se ligam especificamente ao PD-L1 humano e competem de forma cruzada para a ligação ao PD-L1 humano com qualquer anticorpo anti-PD-L1 aqui

divulgado, por exemplo, atezolizumabe, durvalumabe e/ou avelumabe. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 se liga ao mesmo epítopo que qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 aqui descritos, por exemplo, atezolizumabe, durvalumabe e/ou avelumabe. A capacidade dos anticorpos de competir cruzadamente para a ligação a um antígeno indica que esses anticorpos se ligam à mesma região do epítopo do antígeno e impedem estericamente a ligação de outros anticorpos de competição cruzada a essa região do epítopo particular. Espera-se que esses anticorpos de competição cruzada tenham propriedades funcionais muito semelhantes às do anticorpo de referência, por exemplo, atezolizumabe e/ou avelumabe, em virtude de sua ligação à mesma região de epítopo de PD-L1. Os anticorpos de competição cruzada podem ser prontamente identificados com base na sua capacidade de competir cruzadamente com atezolizumabe e/ou avelumabe em ensaios de ligação ao PD-L1 padrão, como análise Biacore, ensaios ELISA ou citometria de fluxo (*veja, por exemplo*, WO 2013/173223).

[00411] Em certas modalidades, os anticorpos que competem de forma cruzada para a ligação ao PD-L1 humano com, ou se ligam à mesma região de epítopo do anticorpo PD-L1 humano como, atezolizumabe, durvalumabe e/ou avelumabe, são anticorpos monoclonais. Para administração a indivíduos humanos, estes anticorpos de competição cruzada são anticorpos quiméricos, anticorpos modificados ou anticorpos humanizados ou humanos. Esses anticorpos monoclonais quiméricos, modificados, humanizados ou humanos podem ser preparados e isolados por métodos bem conhecidos na técnica.

[00412] Os anticorpos anti-PD-L1 utilizáveis nas composições e métodos da invenção divulgada também incluem porções de ligação ao antígeno dos anticorpos acima. Foi amplamente demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de tamanho natural.

[00413] Os anticorpos anti-PD-L1 adequados para uso nas composições e métodos divulgados são anticorpos que se ligam ao PD-L1 com alta especificidade e afinidade, bloqueiam a ligação de PD-1 e inibem o efeito imunossupressor da via de sinalização de PD-1. Em qualquer uma das composições ou métodos aqui divulgados, um "anticorpo" anti-PD-L1 inclui uma porção ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga ao PD-L1 e exibe as propriedades funcionais semelhantes às de anticorpos inteiros na inibição da ligação ao receptor e super-regulação do sistema imunológico. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compete de forma cruzada com o atezolizumabe, durvalumabe e/ou avelumabe pela ligação ao PD-L1 humano.

XI.C. Anticorpos Anti-CTLA-4

[00414] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-CTLA-4. Os anticorpos anti-CTLA-4 que são conhecidos na técnica podem ser usados nas composições e métodos da presente descrição. Os anticorpos anti-CTLA-4 da presente invenção ligam-se a CTLA-4 humano de modo a interromper a interação de CTLA-4 com um receptor B7 humano. Como a interação de CTLA-4 com B7 transduz um sinal que leva à inativação de células T portadoras do receptor de CTLA-4, a interrupção da interação efetivamente induz, realça ou prolonga a ativação de tais células T, desse modo induzindo, aumentando ou prolongando um resposta imune.

[00415] Os anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente a CTLA-4 com alta afinidade foram divulgados na Patente Norte-americana No. 6.984.720. Outros anticorpos monoclonais anti-CTLA-4 foram descritos, por exemplo, na Patente Norte-americana Nos. 5.977.318, 6.051.227, 6.682.736 e 7.034.121 e nas Publicações Internacionais Nos. WO 2012/122444, WO 2007/113648, WO 2016/196237 e WO 2000/037504, cada uma das quais é incorporada

por referência aqui em sua totalidade. Demonstrou-se que os anticorpos monoclonais humanos anti-CTLA-4 divulgados na Patente Norte-americana No. 6.984.720 exibem uma ou mais das seguintes características: (a) liga-se especificamente a CTLA-4 humana com uma afinidade de ligação refletida por uma constante de associação de equilíbrio (K_a) de pelo menos cerca de 10^7 M^{-1}, ou cerca de 10^9 M^{-1}, ou cerca de 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} ou superior, conforme determinado por análise Biacore; (b) uma constante de associação cinética (k_a) de pelo menos cerca de 10^3, cerca de 10^4 ou cerca de 10^5 m^{-1} s^{-1}; (c) uma constante de dissociação cinética (k_d) de pelo menos cerca de 10^3, cerca de 10^4 ou cerca de 10^5 m^{-1} s^{-1}; e (d) inibe a ligação de CTLA-4 a B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Os anticorpos anti-CTLA-4 úteis para a presente invenção incluem anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a CTLA-4 humana e exibem pelo menos uma, pelo menos duas ou pelo menos três das características anteriores.

[00416] Em certas modalidades, o anticorpo CTLA-4 é selecionado a partir do grupo que consiste em ipilimumabe (também conhecido como YERVOY®, MDX-010, 10D1; veja Patente Norte-americana No. 6.984.720), MK-1308 (Merck), AGEN-1884 (Agenus Inc.; veja WO 2016/196237) e tremelimumabe (AstraZeneca; também conhecido como ticilimumabe, CP-675,206; veja WO 2000/037504 e Ribas, *Update Cancer Ther*. *2(3)*: 133-39 (2007)). Em modalidades particulares, o anticorpo anti-CTLA-4 é ipilimumabe.

[00417] Em modalidades particulares, o anticorpo CTLA-4 é ipilimumabe para uso nas composições e métodos aqui divulgados. O ipilimumabe é um anticorpo monoclonal IgG1 totalmente humano que bloqueia a ligação de CTLA-4 aos seus ligantes B7, estimulando assim a ativação de células T e melhorando a sobrevida geral (OS) em pacientes com melanoma avançado.

[00418] Em modalidades particulares, o anticorpo CTLA-4 é tre-

melimumabe.

[00419] Em modalidades particulares, o anticorpo CTLA-4 é MK-1308.

[00420] Em modalidades particulares, o anticorpo CTLA-4 é AGEN-1884.

[00421] Em algumas modalidades, o anticorpo CTLA-4 é não fucosilado ou hipofucosilado. Em algumas modalidades, o anticorpo CTLA-4 exibe atividade de ADCC e/ou ADCP realçada. Em algumas modalidades, o anticorpo CTLA-4 é BMS-986218, conforme descrito em PCT/US18/19868.

[00422] Os anticorpos anti-CTLA-4 utilizáveis nas composições e métodos divulgados também incluem anticorpos isolados que se ligam especificamente a CTLA-4 humana e competem de forma cruzada para ligação ao CTLA-4 humano com qualquer anticorpo anti-CTLA-4 aqui divulgado, por exemplo, ipilimumabe e/ou tremelimumabe. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 se liga ao mesmo epítopo que qualquer um dos anticorpos anti-CTLA-4 aqui descritos, por exemplo, ipilimumabe e/ou tremelimumabe. A capacidade dos anticorpos de competir cruzadamente para a ligação a um antígeno indica que esses anticorpos se ligam à mesma região do epítopo do antígeno e impedem estericamente a ligação de outros anticorpos de competição cruzada a essa região do epítopo particular. Espera-se que estes anticorpos de competição cruzada tenham propriedades funcionais muito semelhantes às do anticorpo de referência, por exemplo, ipilimumabe e/ou tremelimumabe, em virtude da sua ligação à mesma região de epítopo de CTLA-4. Os anticorpos de competição cruzada podem ser facilmente identificados com base na sua capacidade de competir cruzadamente com ipilimumabe e/ou tremelimumabe em ensaios de ligação a CTLA-4 padrão, como análise Biacore, ensaios ELISA ou citometria de fluxo (veja, por exemplo, WO 2013/173223).

[00423] Em certas modalidades, os anticorpos que competem de forma cruzada para a ligação ao CTLA-4 humano com, ou se ligam à mesma região de epítopo do anticorpo CTLA-4 humano como ipilimumabe e/ou tremelimumabe, são anticorpos monoclonais. Para administração a indivíduos humanos, estes anticorpos de competição cruzada são anticorpos quiméricos, anticorpos modificados ou anticorpos humanizados ou humanos. Esses anticorpos monoclonais quiméricos, modificados, humanizados ou humanos podem ser preparados e isolados por métodos bem conhecidos na técnica.

[00424] Os anticorpos anti-CTLA-4 utilizáveis nas composições e métodos da invenção divulgada também incluem porções de ligação ao antígeno dos anticorpos acima. Foi amplamente demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de tamanho natural.

[00425] Os anticorpos anti-CTLA-4 adequados para uso nos métodos ou composições divulgados são anticorpos que se ligam ao CTLA-4 com alta especificidade e afinidade, bloqueiam a atividade de CTLA-4 e interrompem a interação de CTLA-4 com um receptor B7 humano . Em qualquer uma das composições ou métodos aqui divulgados, um "anticorpo" anti-CTLA-4 inclui uma porção ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga a CTLA-4 e exibe as propriedades funcionais semelhantes às de anticorpos inteiros na inibição da interação de CTLA -4 com um receptor B7 humano e super-regulação do sistema imunológico. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou sua porção de ligação ao antígeno compete de forma cruzada com ipilimumabe e/ou tremelimumabe para a ligação ao CTLA-4 humano.

XI.D. Anticorpos Anti-LAG-3

[00426] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-LAG-3. Os anticorpos anti-LAG-3 da presente descrição ligam-se ao LAG-3 humano. Os anticorpos que se ligam ao

LAG-3 foram divulgados na Publicação Intitulada No. WO/2015/042246 e Publicação Norte-americana Nos. 2014/0093511 e 2011/0150892.

[00427] Um anticorpo LAG-3 exemplar útil na presente descrição é 25F7 (descrito na Publicação Norte-americana No. 2011/0150892). Um anticorpo LAG-3 exemplar adicional útil na presente descrição é o BMS-986016. Em uma modalidade, um anticorpo anti-LAG-3 útil para a composição compete de forma cruzada com 25F7 ou BMS-986016. Em outra modalidade, um anticorpo anti-LAG-3 útil para a composição se liga ao mesmo epítopo que 25F7 ou BMS-986016. Em outras modalidades, um anticorpo anti-LAG-3 compreende seis CDRs de 25F7 ou BMS-986016.

XI.E. Anticorpos Anti-CD137

[00428] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-CD137. Os anticorpos anti-CD137 se ligam especificamente a e ativam células imunes de expressão de CD137, estimulando uma resposta imune, em particular uma resposta de células T citotóxicas, contra células tumorais. Os anticorpos que se ligam a CD137 foram divulgados na Publicação Norte-americana No. 2005/0095244 e Patente Norte-americana Nos. 7.288.638, 6.887.673, 7.214.493, 6.303.121, 6.569.997, 6.905.685, 6.355.476, 6.362.325, 6.974.863 e 6.210.669.

[00429] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é urelumabe (BMS-663513), descrito na Patente Norte-americana No. 7.288.638 (20H4.9-IgG4 [10C7 ou BMS-663513]). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é BMS-663031 (20H4.9-IgG1), descrito na Patente Norte-americana No. 7.288.638. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é 4E9 ou BMS-554271, descrito na Patente Norte-americana No. 6.887.673. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é um anticorpo divulgado na Patente Norte-

americana Nos. 7.214.493; 6.303.121; 6.569.997; 6.905.685; ou 6.355.476. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é 1D8 ou BMS-469492; 3H3 ou BMS-469497; ou 3E1, descrito na Patente Norte-americana No. 6.362.325. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é um anticorpo divulgado na Patente Norte-americana No. 6.974.863 emitida (tal como 53A2). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD137 é um anticorpo divulgado na Patente Norte-americana No. 6.210.669 emitida (tal como 1D8, 3B8 ou 3E1). Em algumas modalidades, o anticorpo é PF-05082566 da Pfizer (PF-2566). Em outras modalidades, um anticorpo anti-CD137 útil para a invenção compete de forma cruzada com os anticorpos anti-CD137 aqui divulgados. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD137 se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo anti-CD137 aqui divulgado. Em outras modalidades, um anticorpo anti-CD137 útil na descrição compreende seis CDRs dos anticorpos anti-CD137 aqui divulgados.

XI.F. Anticorpos Anti-KIR

[00430] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-KIR3. Os anticorpos que se ligam especificamente ao KIR bloqueiam a interação entre os receptores semelhantes à imunoglobulina de células Exterminadoras (KIR) nas células NK com seus ligantes. O bloqueio desses receptores facilita a ativação das células NK e, potencialmente, a destruição das células tumorais por estas. Exemplos de anticorpos anti-KIR foram divulgados na Publicação Intitulada Nos. WO/2014/055648, WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2012/071411 e WO/2012/160448.

[00431] Um anticorpo anti-KIR útil na presente descrição é lirilumabe (também referido como BMS-986015, IPH2102 ou a variante S241P de 1-7F9), descrito pela primeira vez na Publicação Intitulada

No. WO 2008/084106. Um anticorpo anti-KIR adicional útil na presente descrição é 1-7F9 (também referido como IPH2101), descrito na Publicação Intitulada No. WO 2006/003179. Em uma modalidade, um anticorpo anti-KIR para a presente composição compete de forma cruzada pela ligação ao KIR com lirilumabe ou I-7F9. Em outra modalidade, um anticorpo anti-KIR se liga ao mesmo epítopo que lirilumabe ou I-7F9. Em outras modalidades, um anticorpo anti-KIR compreende seis CDRs de lirilumabe ou I-7F9.

XI.G. Anticorpos Anti-GITR

[00432] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-GITR. Os anticorpos anti-GITR podem ser qualquer anticorpo anti-GITR que se liga especificamente ao alvo GITR humano e ativa o receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide (GITR). GITR é um membro da superfamília de receptores de TNF que é expresso na superfície de vários tipos de células imunes, incluindo células T reguladoras, células T efetoras, células B, células exterminadoras naturais (NK) e células dendríticas ativadas ("anticorpos agonistas anti-GITR"). Especificamente, a ativação do GITR aumenta a proliferação e a função das células T efetoras, bem como anula a supressão induzida pelas células T reguladoras ativadas. Além disso, a estimulação de GITR promove imunidade antitumoral, aumentando a atividade de outras células imunes, como células NK, células apresentadoras de antígeno e células B. Exemplos de anticorpos anti-GITR foram divulgados na Publicação Intitulada Nos. WO/2015/031667, WO2015/184.099, WO2015/026.684, WO11/028683 e WO/2006/105021, Patente Norte-americana Nos. 7.812.135 e 8.388.967 e Publicação Norte-americana Nos. 2009/0136494, 2014/0220002, 2013/0183321 e 2014/0348841.

[00433] Em uma modalidade, um anticorpo anti-GITR útil na presente descrição é TRX518 (descrito em, por exemplo, Schaer *et al*.

Curr Opin Immunol. (2012) Apr; 24(2): 217-224, e WO/2006/105021). Em outra modalidade, o anticorpo anti-GITR é selecionado a partir de MK4166, MK1248 e anticorpos descritos em WO11/028683 e US 8.709.424, e compreendendo, por exemplo, uma cadeia VH compreendendo SEQ ID NO: 104 e uma cadeia VL compreendendo SEQ ID NO: 105 (em que as SEQ ID NOs são de WO11/028683 ou US 8.709.424). Em certas modalidades, um anticorpo anti-GITR é um anticorpo anti-GITR que é divulgado em WO2015/031667, por exemplo, um anticorpo compreendendo CDRs de VH 1-3 compreendendo SEQ ID NOs: 31, 71 e 63 de WO2015/031667, respectivamente, e CDRs de VL 1-3 compreendendo SEQ ID NOs: 5, 14 e 30 de WO2015/031667. Em certas modalidades, um anticorpo anti-GITR é um anticorpo anti-GITR que é divulgado em WO2015/184099, por exemplo, o anticorpo Hum231#1 ou Hum231#2, ou suas CDRs, ou um derivado deste (por exemplo, pab1967, pab1975 ou pab1979). Em certas modalidades, um anticorpo anti-GITR é um anticorpo anti-GITR que é divulgado em JP2008278814, WO09/009116, WO2013/039954, US20140072566, US20140072565, US20140065152 ou WO2015/026684, ou é INBRX-110 (INHIBRx), LKZ-145 (Novartis) ou MEDI-1873 (MedImmune). Em certas modalidades, um anticorpo anti-GITR é um anticorpo anti-GITR que é descrito em PCT/US2015/033991 (por exemplo, um anticorpo compreendendo as regiões variáveis de 28F3, 18E10 ou 19D3). Por exemplo, um anticorpo anti-GITR pode ser um anticorpo compreendendo as seguintes cadeias VH e VL ou suas CDRs:

VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR-QAPGKGLEWVAVIWYEGSNKYYADSVKGRFTIS-RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYG-MDVWGQGTTVTVS (SEQ ID NO: 78), e

VL:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQK-

PGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS-
LQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 79); ou
VH:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVR-
QAPGKGLEWVAVIWYAGSNKFYADSVKGRFTIS-
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDYYYYY-
VMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 80), e
VL:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKS-
LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS-
LQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 81); ou
VH:
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR-
QAPGKGLEWVAVIWYAGSNKYYADSVKGRFTIS-
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQG-
TTVTVSS (SEQ ID NO: 82), e
VL:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKS-
LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS-
LQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 83).

[00434] Em certas modalidades, um anticorpo compreendendo um par das cadeias leves VH e VL acima, ou suas CDRs, compreende uma região constante de cadeia pesada de um isotipo de IgG1, tipo selvagem ou mutado, por exemplo, para ser sem efeito. Em uma modalidade, um anticorpo anti-GITR compreende as seguintes sequências de aminoácidos de cadeias pesadas e leves:
cadeia pesada:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR-
QAPGKGLEWVAVIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRD-
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYG-

MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS-
NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG-
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY-
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK-
VSNKGLPAPIEK-
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI-
AVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS-
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 84), e
cadeia leve:
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAP-
KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA-
TYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG-
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE-
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS-
FNRGEC (SEQ ID NO: 85), ou
cadeia pesada:
qvqlvesgggvvqpgrslrlscaasgftfssygmhwvrqapgkglewvaviwyegsnky-
yadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyycarggsmvrgdyyyg-
mdvwgqgttvtvssastkgpsvfplapsskstsgg-
taalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyic-
nvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapeaegapsvflfppkpkdtlmis-
rtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak-
tkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpssiek-
tiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpen-
nykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg (SEQ ID
NO: 86), e
cadeia leve:
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAP-

KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA-
TYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG-
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE-
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS-
FNRGEC (SEQ ID NO: 87).

[00435] Em certas modalidades, o anticorpo anti-GITR compete de forma cruzada com um anticorpo anti-GITR aqui descrito, por exemplo, TRX518, MK4166 ou um anticorpo compreendendo um domínio VH e uma sequência de aminoácidos do domínio VL aqui descrito. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-GITR se liga ao mesmo epítopo de um anticorpo anti-GITR aqui descrito, por exemplo, TRX518, MK4166 ou um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos de domínio VH e uma de domínio VL aqui descrita. Em certas modalidades, o anticorpo anti-GITR compreende as seis CDRs de TRX518, MK4166 ou aqueles de um anticorpo que compreende uma sequência de aminoácidos de domínio, domínio VH e uma de domínio VL aqui descrita.

XI.H. Anticorpos Anti-TIM3

[00436] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-TIM3. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIM3 pode ser selecionado a partir dos anticorpos anti-TIM3 divulgados na Publicação Intitulada Nos. WO2018013818, WO/2015/117002 (por exemplo, MGB453, Novartis), WO/2016/161270 (por exemplo, TSR-022, Tesaro/AnaptysBio), WO2011155607, WO2016/144803 (por exemplo, STI-600, Sorrento Therapeutics), WO2016/071448, WO17055399; WO17055404, WO17178493, WO18036561, WO18039020 (por exemplo, Ly-3221367, Eli Lilly), WO2017205721, WO17079112; WO17079115; WO17079116, WO11159877, WO13006490, WO2016068802 WO2016068803, WO2016/111947, WO/2017/031242.

XI.I. Anticorpos Anti-OX40

[00437] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-OX40 (também conhecido como CD134, TNFRSF4, ACT35 e/ou TXGP1L). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-OX40 pode ser BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb Company), descrito na Publicação Intitulada No. WO20160196228. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-OX40 pode ser selecionado a partir dos anticorpos anti-OX40 descritos na Publicação Intitulada Nos. WO95012673, WO199942585, WO14148895, WO15153513, WO15153514, WO13038191, WO16057667, WO03106498, WO12027328, WO13028231, WO16200836, WO 17063162, WO17134292, WO 17096179, WO 17096281, e WO 17096182.

XI.J. Anticorpos Anti-NKG2A

[00438] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-NKG2A. NKG2A é um membro da família de receptores de lectina tipo C que é expresso em células exterminadoras naturais (NK) e um subconjunto de linfócitos T. Especificamente, NKG2A expresso principalmente em células NK efetoras imunes inatas infiltradas em tumor, bem como em algumas células T CD8+. Seu antígeno de leucócito humano de ligante natural E (HLA-E) é expresso em tumores sólidos e hematológicos. NKG2A é um receptor inibidor que cega HLA-E.

[00439] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-NKG2A pode ser BMS-986315, um anticorpo monoclonal humano que bloqueia a interação de NKG2A ao seu ligante HLA-E, permitindo assim a ativação de uma resposta imune antitumoral. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-NKG2A pode ser um inibidor do ponto de checagem que ativa células T, células NK e/ou células imunes de infiltração em tumor. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-NKG2A pode ser selecionado a partir dos anticorpos anti-NKG2A descritos em, por exemplo,

WO 2006/070286 (Innate Pharma S.A.; University of Genova); Patente Norte-americana No. 8.993.319 (Innate Pharma S.A.; University of Genova); WO 2007/042573 (Innate Pharma S/A; Novo Nordisk A/S; University of Genova); Patente Norte-americana No. 9.447.185 (Innate Pharma S/A; Novo Nordisk A/S; University of Genova); WO 2008/009545 (Novo Nordisk A/S); Patente Norte-americana Nos. 8.206.709; 8.901.283; 9.683.041 (Novo Nordisk A/S); WO 2009/092805 (Novo Nordisk A/S); Patente Norte-americana Nos. 8.796.427 e 9.422.368 (Novo Nordisk A/S); WO 2016/134371 (Ohio State Innovation Foundation); WO 2016/032334 (Janssen); WO 2016/041947 (Innate); WO 2016/041945 (Academisch Ziekenhuis Leiden H.O.D.N. LUMC); WO 2016/041947 (Innate Pharma); e WO 2016/041945 (Innate Pharma).

XI.K. Anticorpos Anti-ICOS

[00440] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-ICOS. ICOS é uma proteína do ponto de checagem imune que é um membro da superfamília CD28. ICOS é uma proteína de transmembrana tipo I de 55-60 kDa que é expressa em células T após a ativação de células T e coestimula a ativação de células T após a ligação de seu ligante, ICOS-L (B7H2). ICOS também é conhecido como coestimulador de células T induzível, CVID1, AILIM, coestimulador induzível, CD278, molécula imunomediatória de linfócito induzível por ativação e antígeno CD278.

[00441] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ICOS pode ser BMS-986226, um anticorpo monoclonal IgG humanizado que se liga a e estimula ICOS humano. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-ICOS pode ser selecionado a partir de anticorpos anti-ICOS descritos em, por exemplo, WO 2016/154177 (Jounce Therapeutics, Inc.), WO 2008/137915 (MedImmune), WO 2012/131004 (INSERM, French National Institute of Health and Medical Research), EP3147297 (INSERM,

French National Institute of Health and Medical Research), WO 2011/041613 (Memorial Sloan Kettering Cancer Center), EP 2482849 (Memorial Sloan Kettering Cancer Center), WO 1999/15553 (Robert Koch Institute), Patente Norte-americana Nos. 7.259.247 e 7.722.872 (Robert Kotch Institute); WO 1998/038216 (Japan Tobacco Inc.), Patente Norte-americana Nos. 7.045.615; 7.112.655 e 8.389.690 (Japan Tobacco Inc.), Patente Norte-americana Nos. 9.738.718 e 9.771.424 (GlaxoSmithKline) e WO 2017/220988 (Kymabe Limited).

XI.L. Anticorpos Anti-TIGIT

[00442] Em algumas modalidades, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-TIGIT. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT pode ser BMS-986207. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT pode ser o clone 22G2, conforme descrito em WO 2016/106302. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT pode ser MTIG7192A/RG6058/RO7092284 ou clone 4.1D3, conforme descrito em WO 2017/053748. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-TIGIT pode ser selecionado a partir dos anticorpos anti-TIGIT descritos em, por exemplo, WO 2016/106302 (Bristol-Myers Squibb Company) e WO 2017/053748 (Genentech).

XI.M. Agentes anticâncer adicionais

[00443] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-IL-10. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com uma molécula de IL-10 de ação prolongada. Em algumas modalidades, a molécula de IL-10 de ação prolongada pode ser uma molécula de fusão de IL-10-Fc. Em algumas modalidades, a molécula de IL-10 de ação prolongada pode ser uma IL-10 Pegilada, como AM0010 (ARMO BioSciences).

[00444] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-IL-2. Em algumas

modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com uma molécula de IL-2 de ação prolongada. Em algumas modalidades, a IL-2 de ação prolongada pode ser uma IL-2 Pegilada, como NKTR-214 (Nektar; veja, Patente Norte-americana 8.252.275, WO12/065086 e WO15/125159).

[00445] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-VISTA.

[00446] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-CD96.

[00447] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-IL-8, por exemplo, com HuMax®-IL8.

[00448] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-TGFβ.

[00449] Em algumas outras modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-B7-H4. Em certas modalidades, o anticorpo anti-B7-H4 é um anti-B7-H4 divulgado na Publicação Intitulada No. WO/2009/073533.

[00450] Em certas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo de ligante anti-Fas. Em certas modalidades, o anticorpo de ligante anti-Fas é um ligante anti-Fas divulgado na Publicação Intitulada No. WO/2009/073533.

[00451] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-CXCR4. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CXCR4 é um anti-CXCR4 divulgado na Publicação Norte-americana No. 2014/0322208 (por exemplo, Ulocuplumabe (BMS-936564)).

[00452] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-mesotelina. Em certas modalidades, o anticorpo anti-mesotelina é uma anti-mesotelina

divulgado na Patente Norte-americana No. 8.399.623.

[00453] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-HER2. Em certas modalidades, o anticorpo anti-HER2 é Herceptina (Patente Norte-americana No. 5.821.337), trastuzumabe ou ado-trastuzumabe entansina (Kadcyla, por exemplo, WO/2001/000244).

[00454] Em modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-CD27. Em modalidades, o anticorpo anti-CD-27 é Varlilumabe (também conhecido como "CDX-1127" e "1F5"), que é um anticorpo IgG1 humano que é um agonista para CD27 humano, conforme divulgado, por exemplo, na Patente Norte-americana No. 9.169.325.

[00455] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em combinação com um anticorpo anti-CD73. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD73 é CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f.

[00456] Em certas modalidades, a segunda terapia compreende a administração de um agente quimioterápico. Em algumas modalidades, o agente quimioterápico induz a expressão de MICA/B em células tumorais. Em algumas modalidades, o agente quimioterápico é selecionado a partir de um inibidor de proteassoma, um fármaco imunomodulador (IMiD), um inibidor de Bet e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o inibidor de proteassoma é selecionado dentre bortezomibe, ixazomibe, carfilzomibe, oprozomibe e marizomibe. Em certas modalidades, o inibidor de proteassoma compreende bortezomibe.

[00457] Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende uma radioterapia. Qualquer radioterapia conhecida na técnica pode ser usada como segunda terapia.

[00458] Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende a administração de um agente que ativa as células imunes inatas. Em

algumas modalidades, o agente que ativa as células imunes inatas compreende um agonista de NLRP3. Em algumas modalidades, o agonista de NLRP3 compreende mono-hidrato de urato monossódico (MSU) e/ou o adjuvante de vacina alúmen. Em algumas modalidades, o agente que ativa as células imunes inatas é um agonista do receptor 7 tipo *toll* (TLR7). Em algumas modalidades, o agonista de TLR7 compreende imiquimode (R837), GS-9620 (veja, Tsai *et al*., J. Virology doi:10.1128/JVI.02166-16 (Feb. 8, 2017)), ORN R-2336 (Miltenyl Biotec), ou qualquer combinação dos mesmos.

[00459] Em algumas modalidades, a segunda terapia compreende a administração de um agente que aumenta a sobrevida de células exterminadoras naturais (NK), células T CD8+ ou ambas. Em algumas modalidades, o agente compreende IL-2. Em certas modalidades, o agente compreende IL-2 pegilada.

[00460] Em certas modalidades, a segunda terapia compreende a administração de um agente selecionado a partir do grupo que consiste em doxorrubicina (ADRIAMYCIN®), cisplatina, carboplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucila (LEUKERAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®; NEOSAR®), lenalidomida (REVLIMID®), bortezomibe (VELCADE®), dexametasona, mitoxantrona, etoposídeo, citarabina, bendamustina (TREANDA®), rituximabe (RITUXAN®), ifosfamida, vincristina (ONCOVIN®), fludarabina (FLUDARA®), talidomida (THALOMID®), alentuzumabe (CAMPATH®), ofatumumabe (ARZERRA®), everolimus (AFINITOR®, ZORTRESS®), carfilzomibe (KYPROLISTM) e qualquer combinação dos mesmos.

XI.N. Câncer

[00461] Os anticorpos anti-MICA/B podem aumentar a resposta imune às células cancerosas em um paciente com câncer. São fornecidos aqui métodos para o tratamento de um indivíduo tendo câncer, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo anti-

MICA/B aqui descrito, de modo que o indivíduo seja tratado, por exemplo, de modo que o crescimento de tumores cancerosos seja inibido ou reduzido e/ou que os tumores regridam e/ou que a sobrevida prolongada seja alcançada. Um anticorpo anti-MICA/B pode ser usado sozinho para inibir o crescimento de tumores cancerígenos. Alternativamente, um anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em conjunto com outro agente, por exemplo, outro agente imunogênico, um tratamento de câncer padrão ou outro anticorpo, conforme descrito abaixo.

[00462] Por conseguinte, são fornecidos aqui métodos de tratamento de câncer, por exemplo, inibindo o crescimento de células tumorais, em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-MICA/B aqui descrito, por exemplo, MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2 tendo uma região constante de IgG tipo selvagem ou uma variante de região constante tendo a função efetora alterada ou porção de ligação ao antígeno desta. O anticorpo pode ser um anticorpo anti-MICA/B humano (como qualquer um dos anticorpos MICA/B anti-humanos humanos aqui descritos). Os cânceres cujo crescimento pode ser inibido usando os anticorpos da descrição incluem cânceres tipicamente responsivos à imunoterapia e aqueles que não são tipicamente responsivos à imunoterapia. Os cânceres que podem ser tratados também incluem cânceres positivos para MICA/B. Os cânceres podem ser cânceres com tumores sólidos ou malignidades hematológicas (tumores líquidos). Exemplos não limitantes de cânceres para o tratamento incluem carcinoma de células escamosas, câncer de pulmão de células pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas escamoso (NSCLC), NSCLC não escamoso, glioma, câncer gastrointestinal, câncer renal (por exemplo, carcinoma de células claras), câncer de ovário, câncer de fígado, câncer colorretal, câncer de endométrio, câncer de rim (por

exemplo, carcinoma de células renais (RCC)), câncer de próstata (por exemplo, adenocarcinoma de próstata refratário a hormônios), câncer de tireoide, neuroblastoma, câncer pancreático, glioblastoma (glioblastoma multiforme), câncer cervical, câncer de estômago, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, carcinoma de cólon e câncer de cabeça e pescoço (ou carcinoma), câncer gástrico, tumor de células germinativas, sarcoma pediátrico, exterminadora natural sinonasal, melanoma (por exemplo, melanoma maligno metastático, tal como melanoma maligno cutâneo ou intraocular), câncer ósseo, câncer de pele, câncer uterino, câncer da região anal, câncer testicular, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma dos tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer retal, tumores sólidos da infância, câncer do ureter, carcinoma da pelve renal, neoplasia do sistema nervoso central (CNS), linfoma do CNS primário, angiogênese tumoral, tumor do eixo espinhal, câncer cerebral, glioma do tronco cerebral, adenoma pituitário, sarcoma de Kaposi, câncer epidermoide, câncer de células escamosas, cânceres induzidos pelo ambiente, incluindo aqueles induzidos por amianto, cânceres relacionados a vírus ou cânceres de origem viral (por exemplo, vírus do papiloma humano (tumores originados ou relacionados ao HPV)); e quaisquer combinações dos referidos cânceres.

[00463] Exemplos não limitantes de cânceres para tratamento incluem malignidades hematológicas derivadas de qualquer uma das duas principais linhagens de células sanguíneas, isto é, a linhagem celular mieloide (que produz granulócitos, eritrócitos, trombócitos, macrófagos e mastócitos) ou linhagem celular linfoide (que produz células B, T, NK e plasmáticas), como todos os tipos de leucemias, linfomas e

mielomas, por exemplo, leucemias agudas, crônicas, linfocíticas e/ou mielogenosas, como leucemia aguda (ALL), leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL) e leucemia mielogenosa crônica (CML), AML não diferenciada (MO), leucemia mieloblástica (Ml), leucemia mieloblástica (M2; com maturação celular), leucemia promielocítica (M3 ou variante de M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (M4 ou variante de M4 com eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma granulocítico isolado e cloroma; linfomas, como linfoma de Hodgkin (HL), linfoma não Hodgkin (NHL), malignidade hematológica de células B, por exemplo, linfomas de células B, linfomas de células T, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma de células B monocitoide, tecido linfoide associado à mucosa (MALT) linfoma de células grandes anaplásico (por exemplo, Ki 1+), linfoma/leucemia de células T do adulto, linfoma de células de revestimento, linfoma de células T angioimunoblástico, linfoma angiocêntrico, linfoma de células T intestinal, linfoma de células B mediastinal primário, linfoma linfoblástico T precursor, linfoblástico T; e linfoma/leucemia (T-Lbly/T-ALL), linfoma de células T periférico, linfoma linfoblástico, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, linfoma histiocítico verdadeiro, linfoma do sistema nervoso central primário, linfoma de efusão primário, linfoma de células B, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoéticos de linhagem linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma de células grandes imunoblástico, linfoma linfoblástico B precursor, linfoma de células T cutâneo (CTLC) (também chamado de micose fungoide ou síndrome de Sezary) e linfoma linfoplasmacitoide (LPL) com macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas, como mieloma de IgG, mieloma de cadeia leve, mieloma não secretor, mieloma latente (também chamado de mieloma indolente), plasmocitoma solitário e mielomas

múltiplos, leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de células pilosas; tumores hematopoéticos de linhagem mieloide, tumores de origem mesenquimal, incluindo fibrossarcoma e rabdomiosscarcoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores do sistema nervoso central e periférico, incluindo astrocitoma, schwannomas; tumores de origem mesenquimal, incluindo fibrossarcoma, rabdomiossarcoma e osteossarcoma; e incluindo melanoma, xeroderma pigmentoso, ceratoacantoma, seminoma, câncer folicular da tireoide e teratocarcinoma, tumores hematopoéticos de linhagem linfoide, por exemplo, tumores de células T e B, incluindo, porém, não se limitando a distúrbios de células T como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), incluindo do tipo de célula pequena e célula cerebriforme; leucemia de linfócitos granulares grandes (LGL) tipo células T; linfoma hepatoesplênico a/d T-NHL; linfoma de células T periférico/pós-tímico (subtipos pleomórfico e imunoblástico); linfoma de células T angiocêntrico (nasal); e quaisquer combinações dos referidos cânceres.

[00464] Os métodos aqui descritos também podem ser usados para o tratamento de cânceres metastáticos, cânceres irressecáveis, refratários (por exemplo, cânceres refratários à imunoterapia anterior, por exemplo, com um anticorpo CTLA-4 ou PD-1 bloqueador) e/ou cânceres recorrentes.

[00465] Em algumas modalidades, o indivíduo tem um câncer selecionado dentre câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de bexiga, câncer de pâncreas, câncer gástrico, câncer de cólon, carcinoma de células renais (RCC), câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), mesotelioma, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, mieloma múltiplo e combinações dos referidos cânceres.

[00466] Em algumas modalidades, o indivíduo tem um câncer sele-

cionado dentre câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de bexiga, câncer de pâncreas, câncer gástrico, câncer de cólon e combinações dos referidos cânceres .

[00467] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B é administrado a pacientes tendo um câncer que exibiu uma resposta inadequada a, ou progrediu em, um tratamento anterior, por exemplo, um tratamento anterior com um fármaco imuno-oncológico ou imunoterápico, ou pacientes tendo um câncer que é refratário ou resistente, intrinsecamente refratário ou resistente (por exemplo, refratário a um antagonista da via PD-1), ou em que a resistência ou estado refratário é adquirido. Por exemplo, os indivíduos que não respondem ou não respondem suficientemente a uma primeira terapia ou que veem a progressão da doença após o tratamento, por exemplo, tratamento anti-PD-1, podem ser tratados pela administração de um anticorpo anti-MICA/B sozinho ou em combinação com outra terapia (por exemplo, com uma terapia anti-PD-1).

[00468] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B é administrado a pacientes que não receberam anteriormente (ou seja, foram tratados com) um agente imuno-oncológico, por exemplo, um antagonista da via PD-1.

[00469] Em algumas modalidades, um método de tratamento de câncer em um indivíduo compreende primeiro determinar se o indivíduo é positivo para MICA/B, por exemplo, tem células tumorais que expressam MICA/B, e se o indivíduo tem câncer positivo para MICA/B, em seguida administrar ao indivíduo um anticorpo anti-MICA/B, por exemplo, aqui descrito. Um método de tratamento de um indivíduo tendo câncer com um anticorpo anti-MICA/B pode compreender a administração a um indivíduo que tem células cancerosas que expressam MICA/B, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticor-

po MICA/B. Também são fornecidos aqui métodos para prever se um indivíduo responderá ao tratamento com um anticorpo anti-MICA/B, em que os métodos compreendem a determinação do nível de MICA/B nas células cancerosas do paciente e se as células cancerosas do indivíduo são positivas para MICA/B, em seguida o indivíduo provavelmente responderá a um tratamento com um anticorpo MICA/B.

[00470] Em algumas modalidades, um método de tratamento de câncer em um indivíduo compreende primeiro determinar se o indivíduo é positivo para PD-L1 ou PD-1, por exemplo, tem células tumorais ou TILs que expressam PD-L1 ou PD-1, e se o indivíduo tem câncer positivo para PD-L1 ou PD-1 ou células TIL, em seguida, administrar ao indivíduo um anticorpo anti-MICA/B (e opcionalmente um antagonista de PD-1 ou PD-L1), por exemplo, aqui descrito. Um método de tratamento de um indivíduo tendo câncer com um anticorpo anti-MICA/B (e opcionalmente um antagonista de PD-1 ou PD-L1) pode compreender a administração a um indivíduo que tem células cancerosas ou células TIL que expressam PD-L1 ou PD- 1, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-MICA/B (e opcionalmente um antagonista de PD-1 ou PD-L1). Também são fornecidos aqui métodos para prever se um indivíduo responderá ao tratamento com um anticorpo anti-MICA/B (e, opcionalmente, um antagonista de PD-1 ou PD-L1), em que os métodos compreendem a determinação do nível de PD-L1 ou PD- 1 em células cancerosas ou TIL do paciente, e se as células cancerosas ou TIL do indivíduo forem positivas para PD-L1 ou PD-1, em seguida, o indivíduo provavelmente responderá a um tratamento com um anticorpo MICA (e opcionalmente um antagonista de PD-1 ou PD-L1).

[00471] Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com um padrão de tratamento de cuidados. Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado como uma terapia de manutenção, por exemplo, uma

terapia que se destina a prevenir a ocorrência ou recorrência de tumores.

[00472] Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com outro tratamento, por exemplo, radiação, cirurgia ou quimioterapia. Por exemplo, a terapia adjuvante com anticorpo anti-MICA/B pode ser administrada quando há um risco de que as micrometástases possam estar presentes e/ou para reduzir o risco de uma recaída.

[00473] Um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado como uma monoterapia ou como a única terapia imunoestimulante. Os anticorpos para MICA/B, por exemplo, o anti-MICA/B, também podem ser combinados com um agente imunogênico, como células cancerosas, antígenos tumorais purificados (incluindo proteínas recombinantes, peptídeos e moléculas de carboidratos), células e células transfectadas com genes que codificam citocinas de estimulação imune (He *et al*., (2004) *J. Immunol*. 173:4919-28). Exemplos não limitantes de vacinas tumorais que podem ser utilizadas incluem peptídeos de antígenos de melanoma, tais como peptídeos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 e/ou tirosinase, ou células tumorais transfectadas para expressar a citocina GM-CSF (discutido posteriormente abaixo).

[00474] Em humanos, alguns tumores demonstraram ser imunogênicos, como os melanomas. Ao diminuir o limiar de ativação de células T, reduzindo o nível de MICA/B solúvel no plasma, as respostas tumorais no hospedeiro podem ser ativadas, permitindo o tratamento de tumores não imunogênicos ou aqueles com imunogenicidade limitada.

[00475] Um anticorpo anti-MICA/B, por exemplo, um anticorpo anti-MICA/B aqui descrito, pode ser combinado com um protocolo de vacinação. Muitas estratégias experimentais para vacinação contra tumores foram concebidas (*veja*, Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000,

ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; *veja também* Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023 -3043 em DeVita *et al*. (Eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). Em uma dessas estratégias, uma vacina é preparada usando células tumorais autólogas ou alogênicas. Estas vacinas celulares demonstraram ser mais eficazes quando as células tumorais são transduzidas para expressar GM-CSF. GM-CSF mostrou ser um ativador potente da apresentação de antígeno para vacinação de tumor (Dranoff *et al*. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A*. 90: 3539-43).

[00476] O estudo da expressão gênica e dos padrões de expressão gênica em grande escala em vários tumores levou à definição dos chamados antígenos específicos de tumor (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). Em muitos casos, esses antígenos específicos de tumor são antígenos de diferenciação expressos nos tumores e na célula da qual o tumor surgiu, por exemplo, antígenos de melanócitos gp100, antígenos MAGE e Trp-2. Mais importante, muitos desses antígenos podem ser os alvos de células T específicas de tumor encontradas no hospedeiro. O tratamento com anticorpo anti-MICA/B pode ser usado em conjunto com uma coleção de proteínas e/ou peptídeos recombinantes expressos em um tumor para gerar uma resposta imune a essas proteínas. Essas proteínas são normalmente vistas pelo sistema imunológico como autoantígenos e, portanto, são tolerantes a eles. O antígeno tumoral pode incluir a proteína telomerase, que é necessária para a síntese de telômeros de cromossomas e que é expressa em mais de 85% dos cânceres humanos e apenas em um número limitado de tecidos somáticos (Kim *et al*. (1994) *Science* 266 : 2011-2013). O antígeno tumoral também pode ser "neoantígenos" expressos em células cancerosas por causa de mutações somáticas que alteram a sequência da proteína ou criam proteínas de fusão entre du-

as sequências não relacionadas (isto é, bcr-abl no cromossoma Filadélfia) ou idiótipo de tumores de células B.

[00477] Outras vacinas tumorais podem incluir as proteínas de vírus implicados em cânceres humanos, como Vírus do Papiloma Humano (HPV), Vírus da Hepatite (HBV e HCV) e Vírus do Sarcoma do Herpes de Kaposi (KHSV). Outra forma de antígeno específico de tumor, que pode ser usado em conjunto com a administração de um anticorpo anti-MICA/B, são proteínas de choque térmico purificadas (HSP) isoladas do próprio tecido tumoral. Essas proteínas de choque térmico contêm fragmentos de proteínas das células tumorais e essas HSPs são altamente eficientes na liberação a células apresentadoras de antígenos para induzir imunidade tumoral (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269: 1585-1588; Tamura *et al*. (1997) *Science* 278: 117-120).

[00478] As células dendríticas (DC) são células apresentadoras de antígenos potentes que podem ser usadas para iniciar respostas específicas do antígeno. As DCs podem ser produzidas *ex vivo* e carregadas com várias proteínas e antígenos de peptídeos, bem como com extratos de células tumorais (Nestle *et al*. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). As DCs também podem ser transduzidas por meios genéticos para expressar esses antígenos tumorais também. As DCs também foram fundidas diretamente a células tumorais para fins de imunização (Kugler *et al*. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacinação, a imunização com DC pode ser efetivamente combinada com a administração de um anticorpo anti-MICA/B para ativar respostas antitumorais mais potentes.

[00479] A administração de um anticorpo anti-MICA/B também pode ser combinada com tratamentos de câncer padrão (por exemplo, cirurgia, radiação e quimioterapia). A administração de um anticorpo anti-MICA/B pode ser efetivamente combinada com regimes quimioterápicos. Nesses casos, pode ser possível reduzir a dose de reagente qui-

mioterapêutico administrado (Mokyr *et al*. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Um exemplo de uma tal combinação é um anticorpo anti-MICA/B em combinação com decarbazina para o tratamento de melanoma. Outro exemplo de tal combinação é um anticorpo anti-MICA/B em combinação com interleucina-2 (IL-2), por exemplo, IL-2 pegilada, para o tratamento do melanoma. O fundamento científico por trás do uso combinado de um anticorpo anti-MICA/B e quimioterapia é que a morte celular, que é uma consequência da ação citotóxica da maioria dos compostos quimioterápicos, deve resultar em níveis aumentados de antígeno tumoral na via de apresentação do antígeno. Outras terapias de combinação que podem resultar em sinergia com a administração de um anticorpo anti-MICA/B por meio da morte celular são radiação, cirurgia e privação hormonal. Cada um desses protocolos cria uma fonte de antígeno tumoral no hospedeiro. Os inibidores da angiogênese também podem ser combinados com a administração de um anticorpo anti-MICA/B. A inibição da angiogênese leva à morte de células tumorais que podem alimentar o antígeno tumoral nas vias de apresentação do antígeno hospedeiro.

[00480] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos também podem ser usados em combinação com anticorpos biespecíficos que direcionam células efetoras de expressão do receptor Fcα ou Fcγ alvo para células tumorais (veja, por exemplo, Patente Norte-americana Nos. 5.922.845 e 5.837.243). Os anticorpos biespecíficos podem ser usados para direcionar dois antígenos separados. Por exemplo, anticorpos biespecíficos do antígeno do receptor anti-Fc/antitumoral (por exemplo, Her-2/neu) têm sido usados para direcionar macrófagos para sítios de tumor. Este direcionamento pode ativar mais eficazmente as respostas específicas do tumor. A subdivisão de células T dessas respostas seria aumentado pela ação do anticorpo anti-MICA/B. Alternativamente, o antígeno pode ser liberado diretamente às DCs pelo uso

de anticorpos biespecíficos que se ligam ao antígeno tumoral e um marcador de superfície celular específico para células dendríticas.

[00481] Os tumores escapam à vigilância imunológica do hospedeiro por uma grande variedade de mecanismos. Muitos desses mecanismos podem ser superados pela inativação de proteínas que são expressas pelos tumores e que são imunossupressoras. Estes incluem, entre outros, TGF-β (Kehrl *et al*. (1986) *J. Exp. Med*. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) e ligante Fas (Hahne *et al*. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Os anticorpos para cada uma dessas entidades podem ser usados em combinação com anticorpos anti-MICA/B para neutralizar os efeitos do agente imunossupressor e favorecer as respostas imunes tumorais pelo hospedeiro.

[00482] Outros anticorpos que ativam a resposta imune do hospedeiro podem ser usados em combinação com anticorpos anti-MICA/B. Estes incluem moléculas na superfície das células dendríticas que ativam a função DC e apresentação de antígeno. Os anticorpos anti-CD40 são capazes de substituir eficazmente a atividade auxiliar das células T (Ridge *et al*. (1998) *Nature* 393: 474-478) e podem ser usados em conjunto com anticorpos anti-MICA/B. A ativação de anticorpos para moléculas coestimuladoras de células T, tais como CTLA-4 (por exemplo, Patente Norte-americana 5.811.097), OX-40 (Weinberg *et al*. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-lBB (Melero *et al*. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff *et al*. (1999) *Nature* 397: 262-266) também pode fornecer níveis aumentados de ativação de células T. Os inibidores de PD1 ou PD-L1 podem também podem ser usados em conjunto com um anticorpo anti-MICA/B. Outras combinações são fornecidas em outro lugar aqui.

[00483] O transplante de medula óssea está sendo usado atualmente para tratar uma variedade de tumores de origem hematopoéti-

ca. Embora a doença do enxerto versus hospedeiro seja uma consequência deste tratamento, o benefício terapêutico pode ser obtido a partir das respostas do enxerto versus tumor. A inibição de MICA/B pode ser usada para aumentar a eficácia das células T específicas de tumor enxertadas do doador.

[00484] Existem também vários protocolos de tratamento experimental que envolvem a ativação *ex vivo* e expansão de células T específicas do antígeno e transferência adotiva dessas células em receptores a fim de estimular as células T específicas do antígeno contra o tumor (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546- 51). Esses métodos também podem ser usados para ativar as respostas das células T a agentes infecciosos, como o CMV. A ativação *ex vivo* na presença de anticorpos anti-MICA/B pode aumentar a frequência e a atividade das células T transferidas adotivamente.

XI.O. Doenças Infecciosas

[00485] Os métodos aqui descritos também podem ser usados para tratar pacientes que foram expostos a toxinas ou patógenos particulares. Consequentemente, outro aspecto aqui descrito fornece um método de tratamento de uma doença infecciosa em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo anti-MICA/B de modo que o indivíduo seja tratado para a doença infecciosa.

[00486] Semelhante à sua aplicação a tumores como discutido acima, os anticorpos anti-MICA/B podem ser administrados sozinhos ou como um adjuvante, em combinação com vacinas, para estimular a resposta imune a patógenos, toxinas e autoantígenos. Exemplos de patógenos para os quais esta abordagem terapêutica pode ser particularmente útil, incluem patógenos para os quais não há atualmente vacina eficaz, ou patógenos para os quais as vacinas convencionais são menos do que completamente eficazes. Estes incluem, porém, não estão limitados a HIV, Hepatite (A, B e C), Influenza, Herpes, Giardia,

Malária, Leishmania, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa. Os anticorpos anti-MICA/B podem ser úteis contra infecções estabelecidas por agentes como o HIV que apresentam antígenos alterados ao longo do curso das infecções. Esses novos epítopos são reconhecidos como estranhos no momento da administração do anticorpo MICA/B anti-humano, provocando assim uma forte resposta das células T.

XI.P Terapias de Combinação

[00487] Além das terapias de combinações fornecidas acima, os anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, aqueles aqui descritos, também podem ser usados em terapia de combinação, por exemplo, para o tratamento do câncer, conforme descrito abaixo.

[00488] São fornecidos aqui métodos de terapia de combinação em que um anticorpo anti-MICA/B é coadministrado com um ou mais agentes adicionais, por exemplo, fármacos de moléculas pequenas, anticorpos ou porções de ligação de antígeno dos mesmos, que são eficazes na estimulação de respostas imunes para, assim, realçar ainda mais, estimular ou super-regular as respostas imunes em um indivíduo.

[00489] Geralmente, um anticorpo anti-MICA/B, por exemplo, aqui descrito, pode ser combinado com (i) um agonista de uma molécula estimuladora (por exemplo, coestimuladora) (por exemplo, receptor ou ligante) e/ou (ii) um antagonista de um sinal ou molécula inibidora (por exemplo, receptor ou ligante) em células imunes, como células T, que resultam na amplificação de respostas imunes, como respostas de células T específicas para antígenos. Em alguns aspectos, um agente imuno-oncológico é (i) um agonista de uma molécula estimuladora (incluindo uma coestimuladora) (por exemplo, receptor ou ligante) ou (ii) um antagonista de uma molécula inibidora (incluindo uma coinibidora) (por exemplo, receptor ou ligante) em células, por exemplo, aquelas

que inibem a ativação de células T ou aquelas envolvidas na imunidade inata, por exemplo, células NK, e em que o agente imuno-oncológico realça a imunidade inata. Esses agentes imuno-oncológicos são frequentemente referidos como reguladores de ponto de checagem imune, por exemplo, inibidor do ponto de checagem imune ou estimulador do ponto de checagem imune.

[00490] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B é administrado com um agente que direciona uma molécula estimuladora ou inibidora que é um membro da superfamília da imunoglobulina (IgSF). Por exemplo, os anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, aqui descritos, podem ser administrados a um indivíduo com um agente que direciona um membro da família IgSF para aumentar uma resposta imune. Por exemplo, um anticorpo anti-MICA/B pode ser administrado com um agente que direciona (ou se liga especificamente a) um membro da família B7 de ligantes ligados à membrana que inclui B7-1, B7-2, B7-H1 (PD -L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) e B7-H6 ou um ligante ou receptor coestimulador ou coinibidor que se liga especificamente a um membro da família B7.

[00491] Um anticorpo anti-MICA/B também pode ser administrado com um agente que direciona um membro da família de moléculas TNF e TNFR (ligantes ou receptores), como CD40 e CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-lBBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn 14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTpR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, Linfotoxina a/TNFp, TNFR2, TNFa, LTpR, Linfotoxina a 1β2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, e NGFR (*veja, por exemplo*, Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00: 1).

[00492] As respostas das células T podem ser estimuladas por uma combinação de anticorpos anti-MICA/B tendo as regiões variáveis de,

por exemplo, MICA.36, MICA.52, MICA.54, MICA.2 e 71C2, e um ou mais dos seguintes agentes:

(1) Um antagonista (inibidor ou agente de bloqueio) de uma proteína que inibe a ativação de células T (por exemplo, inibidores de ponto de checagem imune), como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, GITR e LAG-3, Galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-3 e TIM-4; e/ou

(2) Um agonista de uma proteína que estimula a ativação de células T, como B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 e CD28H.

[00493] Agentes exemplares que modulam uma das proteínas acima e podem ser combinados com anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, aqueles aqui descritos, para o tratamento do câncer, incluem: YERVOY® (ipilimumabe) ou Tremelimumabe (para CTLA-4), galiximabe (para B7.1), BMS-936558 (para PD-1), MK-3475 (para PD-1), atezolizumabe (TECENTRIQ®), AMP224 (para B7DC), BMS-936559 (para B7-H1), MPDL3280A (para B7-H1), MEDI-570 (para ICOS), AMG557 (para B7H2), MGA271 (para B7H3), IMP321 (para LAG-3), BMS-663513 (para CD137), PF-05082566 (para CD137), CDX -1127 (para CD27), anti-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (para OX40L), Atacicepte (para TACI), CP-870893 (para CD40), Lucatumumabe (para CD40), Dacetuzumabe (para CD40), Muromonab-CD3 (para CD3); anticorpos anti-GITR MK4166, TRX518, Medi1873, INBRX-110, LK2-145, GWN-323, GITRL-Fc ou qualquer combinação dos mesmos.

[00494] Outras moléculas que podem ser combinadas com anticorpos anti-MICA/B para o tratamento do câncer incluem antagonistas dos receptores inibidores em células NK ou agonistas de receptores ativadores em células NK. Por exemplo, os anticorpos anti-MICA/B

podem ser combinados com antagonistas de KIR (por exemplo, lirilumabe).

[00495] A ativação de células T também é regulada por citocinas solúveis e os anticorpos anti-MICA/B podem ser administrados a um indivíduo, por exemplo, tendo câncer, com antagonistas de citocinas que inibem a ativação de células T ou agonistas de citocinas que estimulam a ativação de células T.

[00496] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-MICA/B podem ser usados em combinação com (i) antagonistas (ou inibidores ou agentes de bloqueio) de proteínas da família IgSF ou família B7 ou da família TNF que inibem a ativação de células T ou antagonistas de citocinas que inibem a ativação de células T (por exemplo, IL-6, IL-10, TGF-β, VEGF; "citocinas imunossupressoras") e/ou (ii) agonistas dos receptores estimuladores da família IgSF, família B7 ou da família TNF ou de citocinas que estimulam a ativação de células T, para estimular uma resposta imune, por exemplo, para tratar doenças proliferativas, como o câncer.

[00497] Ainda outros agentes para terapias de combinação incluem agentes que inibem ou esgotam macrófagos ou monócitos, incluindo, porém, não se limitando a antagonistas de CSF-1R, como anticorpos antagonistas de CSF-1R, incluindo RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, W013/87699, W013/119716, WO13/132044) ou FPA-008 (WO11/140249; W013169264; WO14/036357).

[00498] Os anticorpos anti-MICA/B também podem ser administrados com agentes que inibem a sinalização de TGF-β.

[00499] Agentes adicionais que podem ser combinados com um anticorpo anti-MICA/B incluem agentes que realçam a apresentação do antígeno tumoral, por exemplo, vacinas de células dendríticas, vacinas celulares secretoras de GM-CSF, oligonucleotídeos CpG e imi-

quimode, ou terapias que realçam a imunogenicidade das células tumorais (por exemplo, antraciclinas).

[00500] Ainda outras terapias que podem ser combinadas com um anticorpo anti-MICA/B incluem terapias que esgotam ou bloqueiam as células Treg, por exemplo, um agente que se liga especificamente a CD25.

[00501] Outra terapia que pode ser combinada com um anticorpo anti-MICA/B é uma terapia que inibe uma enzima metabólica, como indolamina dioxigenase (IDO), dioxigenase, arginase ou óxido nítrico sintetase. Antagonistas de IDO adequados incluem, por exemplo, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), indoximode, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) ou F001287.

[00502] Outra classe de agentes que podem ser usados com um anticorpo anti-MICA/B inclui agentes que inibem a formação de adenosina, por exemplo, inibidores de CD73, ou inibem o receptor de adenosina A2A.

[00503] Outras terapias que podem ser combinadas com um anticorpo anti-MICA/B para o tratamento do câncer incluem terapias que revertem/previnem a anergia ou exaustão das células T e terapias que desencadeiam uma ativação imune inata e/ou inflamação em um sítio de tumor.

[00504] Um anticorpo anti-MICA/B pode ser combinado com mais de um agente imuno-oncológico e pode ser, por exemplo, combinado com uma abordagem combinatória que direciona vários elementos da via imune, como um ou mais dos seguintes: uma terapia que realça a apresentação do antígeno tumoral (por exemplo, vacina de células dendríticas, vacinas celulares secretoras de GM-CSF, oligonucleotídeos CpG, imiquimode); uma terapia que inibe a regulação imune negativa, por exemplo, pela inibição da via CTLA-4 e/ou PD1/PD-L1/PD-

L2 e/ou esgotamento ou bloqueio de Tregs ou outras células imunossupressoras; uma terapia que estimula a regulação imune positiva, por exemplo, com agonistas que estimulam a via CD-137, OX-40 e/ou CD40 ou GITR e/ou estimulam a função efetora das células T; uma terapia que aumenta sistemicamente a frequência de células T antitumorais; uma terapia que esgota ou inibe Tregs, como Tregs no tumor, por exemplo, usando um antagonista de CD25 (por exemplo, daclizumabe) ou por esgotamento de contas anti-CD25 *ex vivo*; uma terapia que impacta a função das células mieloides supressoras no tumor; uma terapia que realça a imunogenicidade de células tumorais (por exemplo, antraciclinas); transferência de células T adotivas ou células NK incluindo células geneticamente modificadas, por exemplo, células modificadas por receptores de antígenos quiméricos (terapia com CAR-T); uma terapia que inibe uma enzima metabólica, como indoleamina dioxigenase (IDO), dioxigenase, arginase ou óxido nítrico sintetase; uma terapia que reverte/previne a anergia ou exaustão das células T; uma terapia que desencadeia uma ativação imune inata e/ou inflamação em um sítio do tumor; administração de citocinas imunoestimuladoras; ou bloqueio de citocinas imunorrepressivas.

[00505] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser usados em conjunto com um ou mais dos agentes agonísticos que ligam receptores coestimuladores positivos, agentes bloqueadores que atenuam a sinalização através de receptores inibidores, antagonistas e um ou mais agentes que aumentam sistemicamente a frequência de células T antitumorais, agentes que superam as vias imunossupressoras distintas dentro do microambiente tumoral (por exemplo, bloqueiam o envolvimento do receptor inibidor (por exemplo, interações PD-L1/PD-1), esgotam ou inibem Tregs (por exemplo, usando um anticorpo monoclonal anti-CD25 (por exemplo, daclizumabe) ou por esgotamento de contas anti-CD25 *ex vivo*), inibem as enzimas metabólicas,

como IDO, ou revertem/previvem a anergia ou exaustão de células T) e agentes que desencadeiam a ativação imune inata e/ou inflamação em sítios de tumor.

[00506] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B é administrado a um indivíduo juntamente com um inibidor de BRAF se o indivíduo for positivo para a mutação BRAF V600.

[00507] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MICA/B é administrado a um indivíduo juntamente com um anticorpo que se liga especificamente a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-8, IL-2, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CD27, VISTA, CD96, GITR ou qualquer combinação dos mesmos.

[00508] Os anticorpos anti-MICA/B e as terapias de combinação aqui descritas também podem ser usados em conjunto com outras terapias bem conhecidas que são selecionadas por sua utilidade particular contra a indicação a ser tratada (por exemplo, câncer). As combinações dos anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser utilizadas sequencialmente com agente(s) farmaceuticamente aceitável(éis) conhecido(s).

[00509] Por exemplo, os anticorpos anti-MICA/B e as terapias de combinação aqui descritas podem ser usados em combinação (por exemplo, simultaneamente ou separadamente) com um tratamento adicional, como irradiação e/ou quimioterapia, por exemplo, usando camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracila (5-FU), cisplatina, doxorrubicina, irinotecana, paclitaxel, gencitabina, cisplatina, paclitaxel, carboplatina-paclitaxel (Taxol), doxorrubicina ou camptotecina + apo21/TRAIL (um combo 6X)), um ou mais inibidores de proteassoma (por exemplo, bortezomibe ou MG132), um ou mais inibidores de Bcl-2 (por exemplo, antagonistas de BH3I-2' (inibidor de bcl-xl), inibidor de indoleamina dioxigenase-1 (por exemplo, INCB24360, indoximode, NLG-919 ou

F001287), AT-101 (derivado de R-(-)-gossipol), ABT-263 (molécula pequena), GX-15-070 (obatoclax) ou MCL-1 (proteína de diferenciação de células de leucemia mieloide-1)), antagonistas de iAP (inibidor da proteína de apoptose) (por exemplo, smac7, smac4, mimético de smac de molécula pequena, peptídeos smac sintéticos (veja, Fulda *et al*., *Nat Med* 2002; 8: 808-15), ISIS23722 (LY2181308), ou AEG-35156 (GEM-640)), inibidores de HDAC (histona desacetilase), anticorpos anti-CD20 (por exemplo, rituximabe), inibidores de angiogênese (por exemplo, bevacizumabe), agentes antiangiogênicos direcionados a VEGF e VEGFR (por exemplo, Avastin), triterpenoides sintéticos (veja, Hyer *et al*, *Cancer Research* 2005; 65: 4799-808), moduladores c-FLIP (proteína inibidora de FLICE celular) (por exemplo, ligantes naturais e sintéticos de PPARy (receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ), 5809354 ou 5569100), inibidores de cinase (por exemplo, Sorafenibe), Trastuzumabe, Cetuximabe, Tensirolimus, inibidores de mTOR como rapamicina e tensirolimus, Bortezomibe, inibidores de JAK2, inibidores de HSP90, inibidores de PI3K-AKT, Lenalildomida, inibidores de GSK3P, inibidores de IAP e/ou fármacos genotóxicos.

[00510] Os anticorpos anti-MICA/B e as terapias de combinação aqui descritas podem ainda ser usados em combinação com um ou mais agentes citotóxicos antiproliferativos. As classes de compostos que podem ser usados como agentes citotóxicos antiproliferativos incluem, porém, não estão limitados aos seguintes:

Agentes de alquilação (incluindo, sem limitação, mostardas de nitrogênio, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureias e triazenos): Mostarda de uracila, Clormetina, Ciclofosfamida (CYTOXAN®) fosfamida, Melfalana, Clorambucila, Pipobromano, Trietilenotiofosforamina, Bussulfano, Carmustina, Lomustina, Estreptozocina, Dacarbazina e Temozolomida.

Antimetabólitos (incluindo, sem limitação, antagonistas do

ácido fólico, análogos da pirimidina, análogos da purina e inibidores da adenosina desaminase): Metotrexato, 5-Fluorouracila, Floxuridina, Citarabina, 6-Mercaptopurina, 6-Tioguanina, Fosfato de fludarabina, Pentostatina e Gencitatina.

[00511] Agentes antiproliferativos adequados para combinação com anticorpos anti-MICA/B, sem limitação, taxanos, paclitaxel (paclitaxel está disponível comercialmente como TAXOL™), docetaxel, discodermolida (DDM), dictiostatina (DCT), Pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona Bl, [17]-desidrodesoxiepotilona B, [18]desidrodesoxiepotilonas B, C12,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A em ponte de C6-C8, trans-9,10-desidroepotilona D, cis-9,10-desidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona BIO, discoderomolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (Discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (cloridrato de tasidotina), Halicondrina B, Mesilato de eribulina (E-7389), Hemiasterlina (HTI-286), E-7974, Criptoficinas, LY-355703, LY-355703 Imunoconjugados de maitansinoide (DM-1), MKC-1, ABT-751, Tl-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesibe), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetóxi-2-etóxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-desidróxi-14,16-didemetil-(+)- discodermolidas e criptotilona 1, além de outros agentes estabilizadores de microtubulina conhecidos na técnica.

[00512] Nos casos em que é desejável tornar as células aberrantemente proliferativas quiescentes em conjunto com ou antes do tratamento com anticorpos anti-MICA/B aqui descritos, hormônios e esteroides (incluindo análogos sintéticos), como 17a-Etinilestradiol, Dietilestilbestrol, Testosterona, Prednisona, Fluoximesterona, Propionato de dromostanolona, Testolactona, Acetato de megestrol, Metilpred-

nisolona, Metil-testosterona, Prednisolona, Triancinolona, Clorotrianiseno, Hidroxiprogesterona, Aminoglutetimida, Estramustina, Acetato de medroxiprogesterona, Leuprolida, Flutamida, Toremifeno, ZOLADEX®, também podem ser administrados ao paciente. Ao usar os métodos ou composições aqui descritos, outros agentes usados na modulação do crescimento do tumor ou metástase em um ambiente clínico, como os antimiméticos, também podem ser administrados conforme desejado.

[00513] Em algumas modalidades, a combinação do anticorpo anti-MICA/B e um segundo agente aqui discutido pode ser administrada simultaneamente como uma única composição em um veículo farmaceuticamente aceitável, ou simultaneamente como composições separadas com o anticorpo anti-MICA/B e o segundo agente em um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a combinação do anticorpo anti-MICA/B e o segundo agente pode ser administrada sequencialmente. A administração dos dois agentes pode começar em horários que são, por exemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias ou uma ou mais semanas de intervalo, ou a administração do segundo agente pode começar, por exemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias ou uma ou mais semanas após o primeiro agente ter sido administrado.

[00514] Em algumas modalidades, um anticorpo antineoplásico que pode ser combinado com um anticorpo anti-MICA/B e/ou um segundo agente inclui RITUXAN® (rituximabe), HERCEPTIN® (trastuzumabe), BEXXAR® (tositumomabe), ZEVALIN® (ibritumomabe), CAMPATH® (alentuzumabe), LYMPHOCIDE® (eprtuzumabe), AVASTIN® (bevacizumabe) e TARCEVA® (erlotinibe) ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o segundo anticorpo útil para a terapia

de combinação com um anticorpo anti-MICA/B pode ser um conjugado anticorpo-fármaco.

[00515] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B sozinho ou em combinação com outro agente é usado simultaneamente ou sequencialmente com o transplante de medula óssea para tratar uma variedade de tumores de origem hematopoética.

[00516] São fornecidos aqui métodos para alterar um evento adverso associado ao tratamento de uma doença hiperproliferativa (por exemplo, câncer) com um agente imunoestimulador, compreendendo a administração de um anticorpo anti-MICA/B com ou sem um segundo agente, a um indivíduo. Por exemplo, os métodos descritos aqui fornecem um método para reduzir a incidência de colite ou diarreia induzida por anticorpos terapêuticos imunoestimulantes por administração de um esteroide não absorvível ao paciente. Quando aqui usado, um "esteroide não absorvível" é um glicocorticoide que exibe extenso metabolismo de primeira passagem de modo que, após o metabolismo no fígado, a biodisponibilidade do esteroide seja baixa, isto é, menos de cerca de 20%. Em algumas modalidades aqui descritas, o esteroide não absorvível é budesonida. A budesonida é um glicocorticosteroide de ação local, que é amplamente metabolizado, primeiramente pelo fígado, após administração oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) é uma formulação oral de budesonida dependente do pH e do tempo desenvolvida para otimizar a liberação do fármaco ao íleo e ao longo do cólon. ENTOCORT EC® é aprovado nos EUA para o tratamento da doença de Crohn leve a moderada envolvendo o íleo e/ou cólon ascendente. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MICA/B em conjunto com um esteroide não absorvível pode ser ainda combinado com um salicilato. Os salicilatos incluem agentes de 5-ASA, como, por exemplo: sulfassalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & Up John); olsalazina (DJPENTUM®, Pharmacia & Up John); balsalazida (COLA-

ZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); e mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

Tabela 1. Sequências.

SEQ ID	Descrição	Sequências
1	19G6-MICA.36 VH1	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT CTCCTGTG-CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCCATGCAC-TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCGAGGGGCTGGAATGGGTGGCACTTATATGG-TATGATGGAAGTAATAAATTCTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGA-CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGCGCCGAGGACACGGCTGTG-TATTACTGTGCGAGAGAGGGAAGTGGGCACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
2	19G6-MICA.36 VH1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQAPGEGLEWVALIWYDGSNKF YG-DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTAVYYCAREGSGHYWGQGTLVTVSS
3	19G6-MICA.36 VK1	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC CATCACTT-GCCGGGCAAGTCAGGGCATCAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC-CAGGGAAAGTTCCTAAGTCCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTT-GGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC-CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA-TAGTTACCCGATCACCTTCGGCCA AGGGACACGACTGGAGATTAAA
4	19G6-MICA.36 VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKSLIYDASSLESGVP SRFSGSGSGTDFT-LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIK
5	19G6-MICA.36 VH1_CDR1	NYAMH
6	19G6-MICA.36 VH1_CDR2	LIWYDGSNKFYGDSVKG
7	19G6-MICA.36 VH1_CDR3	EGSGHY
8	19G6-MICA.36 VK1_CDR1	RASQGISSALA
9	19G6-MICA.36 VK1_CDR2	DASSLES
10	19G6-MICA.36 VK1_CDR3	QQFNSYPIT
11	16A5-MICA.52 VH1	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCA GGTG-CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCGTCTG-GATTCACCTTCAGTAACTATAACATACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAG-TGGGTGGCAGTTATAAGGTATGATGGAATTAATAAA-TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG-TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTG-TATTACTGTGCGAGCGGGCCCCCTGATGCTTTTAATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
12	16A5-MICA.52 VH1	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYNIHWVRQA PGKGLEWVAVIRYD-GINKYYADSVKGRFIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGP PDAFNIWGQGTMVTVSS
13	16A5-MICA.52 VK1	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATG TGCCATCCAGTT-GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG-CAAGTCAGGGCATCAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC-CAGGGAAAGTTCCTAAGTCCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTT-GGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC-CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA-TAGTTACCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
14	16A5-MICA.52 VK1	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQK PGKVPKSLIYDAS-SLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIK
127	16A5-MICA.52 VK2	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC CAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG AGTCACCATCAC-TTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCA GAAACCAGGGAAAGCTCCTAA-GCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGG-GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT GCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA-TAGTTACCCATTCACTTT CGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
128	16A5-MICA.52 VK2	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDAS-SLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPFTFGPGTKVDIK
15	16A5-MICA.52	NYNIH

SEQ ID	Descrição	Sequências
	VH1_CDR1	
16	16A5-MICA.52 VH1_CDR2	VIRYDGINKYYADSVKG
17	16A5-MICA.52 VH1_CDR3	GPPDAFNI
18	16A5-MICA.52 VK1_CDR1	RASQGISSALA
19	16A5-MICA.52 VK1_CDR2	DASSLES
20	16A5-MICA.52 VK1_CDR3	QQFNSYPIT
21	24G11-MICA.54 VH1	ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCCCTCCTCCTGGCTGTTCTCCAAGGAGTCTGTGCCGA GGTG-CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTC CTGTAAGGGTTCTG-GATACAGTTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCC CGGGAAAGGCCTGGAGTGGTTGGG-GATCATCCATCCTGGTGACTCTTATACCAGATACAG CCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCAC-CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACAC-CGCCATATATTACTGTGCGAGAGAGGGTAT AGCAGCAACTCCCTTTGAC-TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
22	24G11-MICA.54 VH1	MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQM PGKGLEWLGIIHPGDSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCAREG IAATPFDYWGQGTLVTVSS
23	24G11-MICA.54 VK1	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGG AGAAATTGTGTT-GACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAG-TCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTTCCAACAGAAACC TGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGC CAGGTTCAG-TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCC TGAAGATTTTGCAG-TTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGACGTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
24	24G11-MICA.54 VK1	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWFQQK PGQAPRLLI-YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFG QGTKVEIK
25	24G11-MICA.54 VH1_CDR1	NYWIG
26	24G11-MICA.54 VH1_CDR2	IIHPGDSYTRYSPSFQG
27	24G11-MICA.54 VH1_CDR3	EGIAATPFDY
28	24G11-MICA.54 VK1_CDR1	RASQSVSSYLA
29	24G11-MICA.54 VK1_CDR2	DASNRAT
30	24G11-MICA.54 VK1_CDR3	QQRSNWPPT
31	3F5-MICA.2 VH1	ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGATTTTCCTTGTTGCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTG-CAACTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG-CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAC-CTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATT-AGTTATCGTAGTCGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA-GACAATGCCAGGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTG-TATTACTGTGCGAGATGGGGCTATGGTTCGGGGGGCTTTGAC-TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
32	3F5-MICA.2 VH1	MELGLCWIFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVR-QAPGKGLEWVSYISYRSRTIYYADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRD-EDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
33	3F5-MICA.2 VK1	ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA-GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA-GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAG-CAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGG-CATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG-CAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCATTCAC-TTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
34	3F5-MICA.2 VK1	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL-AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSFTFGPGTKVDIK
35	3F5-MICA.2 VH1_CDR1	TYSMN
36	3F5-MICA.2	YISYRSRTIYYADSVKG

SEQ ID	Descrição	Sequências
	VH1_CDR2	
37	3F5-MICA.2 VH1_CDR3	WGYGSGGFDY
38	3F5-MICA.2 VK1_CDR1	RASQSVSSSYLA
39	3F5-MICA.2 VK1_CDR2	GASSRAT
40	3F5-MICA.2 VK1_CDR3	QQYGSSFT
41	71C2 VH1	ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGA AGTGCAGCTGGTG-GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCAC-CTTTAATAATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCC AGGGAAGGGCCTGGAG-TGGGTCTCAGGTATTACTTGGAATAGTGATAGCATAGGCTATGC GGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAC-CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCT GCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC-GGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATTCCGT ATTACTATGGTTCGGGGGTATGGAC-GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC A
42	71C2 VH1	MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNNYAMHWVRQA PGKGLEWVSGIT-WNSDSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDS VLLWFGGMDVWGQGTTVTVSS
43	71C2 VK1	ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGG AGAAATTGTGTT-GACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAG-TCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAA AC-CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCC AGACAGGTTCAG-TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTG-TATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCCGTACACTTT TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
44	71C2 VK1	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASS-RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYT FGQGTKLEIK
45	71C2 VH1_CDR1	NYAMH
46	71C2 VH1_CDR2	GITWNSDSIGYADSVKG
47	71C2 VH1_CDR3	DSVLLWFGGMDV
48	71C2 VK1_CDR1	RASQSVSSSYLA
49	71C2 VK1_CDR2	GASSRAT
50	71C2 VK1_CDR3	QQYGSSPPYT
58	Cadeia Pesada AA de 19G6-MICA.36 G236A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQAPGEGLEWVALIWYDGSNKFYG-DSVKGRFTISRD-NSKNTLYLQMNSLSAEDTAVYYCAREGSGHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG-TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC-NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMIS-RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK-TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK-TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN-NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
59	Cadeia Pesada NT de 19G6-MICA.36 G236A	caggtgcaactggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctga-gactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatgccatgcac-tgggtccgccaggctccaggcgaggggctggaatgggtggcacttatatgg-tatgatggaagtaataaattctatggagactccgtgaagggccgcttcaccatctccagaga-caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagcgccgaggacacggctgtg-tattactgtgcgagagagggaagtgggcactactggggccagggaaccctggtcac-cgtctcctcagctagcaccaagggcccatcggtcttcccccctggcaccctcctccaagag-cacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaac-cggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcc-tacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggg-cacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagag-ttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac-ctgaactcctggcgggaccgtcag-tcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccg-gaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa-gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa-gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac-caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa-gccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac-cacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgac-ctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg-cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctc-tatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac-

SEQ ID	Descrição	Sequências
		gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggt
60	Cadeia Leve AA de 19G6-MICA.36	aiqltqspsslsasvgdrvtitcrasqgissalawyqqkpgkvpksliydas- slesgvpsrfsgsgsgtdftltisslqpedfatyycqqfnsypitfgqgtrleikrt- vaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
61	Cadeia Leve NT de 19G6-MICA.36	gccatccagttgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcac- catcacttgccgggcaagtcagggcatcagcagtgctttagcctggtatcagcagaaac- cagggaaagttcctaagtccctgatctatgatgcctccagttt- ggaaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagatttcactctcac- catcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaa- tagttacccgatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgtacggtggctgcac- catctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt- gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac- gccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcac- ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac- gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt
62	Cadeia Pesada AA de 16A5-MICA.52	QVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYNIHWVRQAPGKGLEWVAVIRYD- GINKYYADSVKGRFIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGPPDAF- NIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG- TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC- NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS- RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK- TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK- TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN- NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
63	Cadeia Pesada NT de 16A5-MICA.52	caggtgcagctggtggagtctgggggagacgtggtccagcctgggaggtccctga- gactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactataacatacac- tgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcag- ttataaggtatgatggaattaataaatactatgcagactccgtgaagggccgat- tcatcatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga- gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagcgggccccctgatgcttttaa- tatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagctagcac- caagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg- cacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtg- gaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcag- gactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagac- ctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt- gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac- ctgaactcctgggggggaccgtcag- tcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccg- gaccccgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa- gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa- gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac- caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa- gccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac- cacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgac- ctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg- cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctc- tatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac- gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggt
64	Cadeia Leve AA de 16A5-MICA.52	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKSLIYDAS- SLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIKRT- VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE- QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
65	Cadeia Leve NT de 16A5-MICA.52	gccatccagttgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcac- catcacttgccgggcaagtcagggcatcagcagtgctttagcctggtatcagcagaaac- cagggaaagttcctaagtccctgatctatgatgcctccagttt- ggaaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagatttcactctcac- catcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaa- tagttacccgatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgtacggtggctgcac- catctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt- gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac- gccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcac- ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac- gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

SEQ ID	Descrição	Sequências
66	Cadeia Pesada AA de 24G11-MICA.54	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIG- WVRQMPGKGLEWLGIIHPGDSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS- SLKASDTAIYYCAREGIAATPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG- TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC- NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS- RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK- TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK- TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN- NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	Cadeia Pesada NT de 24G11-MICA.54	gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaa- gatctcctgtaagggttctggatacagttttaccaactactg- gatcggctgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctggagtggttggg- gatcatccatcctggtgactcttataccagatacagcccgtccttccaaggccaggtcac- catctcagccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcagtggagcagcctgaaggcctcg- gacaccgccatatattactgtgcgagagagggtatagcagcaactccctttgac- tactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagctagcac- caagggcccatcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg- cacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtg- gaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcag- gactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagac- ctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt- gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac- ctgaactcctgggggggaccgtcag- tcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccg- gaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa- gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa- gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac- caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa- gccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac- cacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgac- ctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg- cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctc- tatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac- gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggt
68	Cadeia Leve AA de 24G11-MICA.54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWFQQKPGQAPRLLIYDASNRAT- GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRT- VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE- QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	Cadeia Leve NT de 24G11-MICA.54	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaa- gagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagc- tacttagcctggttccaacagaaac- ctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactgg- catcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatcag- cagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtag- caactggcctccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcac- catctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt- gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac- gccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcac- ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac- gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt
70	Cadeia Pesada AA de 3F5-MICA.2	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfstysmnwvrqapgkglewvsyisyrsrtiy- yadsvkgrftisrdnarnslylqmnslrdedtavyycarwgyg- sggfdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsgg- taalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyic- nvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmis- rtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak- tkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiek- tiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpen- nykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg
71	Cadeia Pesada NT de 3F5-MICA.2	gaggtgcaactggtggaatctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctga- gactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtac- ctatagcatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtttcatacatt- agttatcgtagtcgtaccatatactacgcagactctgtgaagggccgattcaccatctccaga- gacaatgccaggaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagacgaggacacggctgtg-

SEQ ID	Descrição	Sequências
		tattactgtgcgagatggggctatggttcgggggctttgac- tactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagctagcac- caagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg- cacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtg- gaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcag- gactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagac- ctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt- gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcac- ctgaactcctgggggggaccgtcag- tcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccg- gaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa- gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa- gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac- caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa- gccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac- cacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgac- ctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg- cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctc- tatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac- gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggt
72	Cadeia Leve AA de 3F5-MICA.2	eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassratgip- drfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygssftfgpgtkvdikrt- vaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssttltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
73	Cadeia Leve NT de 3F5-MICA.2	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaa- gagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctacttagcctggtaccag- cagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatccagcagggccactgg- catcccagacaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatcag- cagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtatggtagctcattcac- tttcggccctgggaccaaagtggatatcaaacgtacggtggctgcac- catctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt- gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac- gccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcac- ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac- gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt
51	MICA Humano	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT- KTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPR- NIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAGCCYFCYYYFLCPLL
109	MICA1 (Variante de MICA)	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLTEVHLDGQPFLRCDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT- KTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNI- TLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTS- DHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGA
110	MICA*002	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSGDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRCDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT- KTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNI- TLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTS- DHRDATQLGFQPLMSDLGSTGSTEGT
111	MICA*004	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT- KTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRRVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPR- NITLSTRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVG- TSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
112	MICA*008	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT-

SEQ ID	Descrição	Sequências
		KTHYHAMHADCLQELRRYLESGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPR- NIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCC
113	MICA*009	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLRYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT- KTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPR- NITLTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTS- DHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGT
114	MICA*010	MGLGPVFLLLAGIFPFAPPGAAAEPHSLPYNLTVLSWDGSVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDR- QKCRAKPQGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHE- DNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTVPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT- KTHYHAMHADCLQELRRYLESSVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASSFYPR- NIILTWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICRGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPV- PSGKVLVLQSHWQTFHVSAVAAAAAIFVIIIFYVRCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVG- TSDHRDATQLGFQPLMSALGSTGSTEGA
115	VH de MICA.20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISYRSRTIY- YADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
116	VL de MICA.20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP- DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
117	VH de MICA.21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISYRSRTIY- YADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
118	VL de MICA.21	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP- DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLEIK
119	VH de MICA.22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISYRSRTIY- YADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
120	VL de MICA.22	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP- DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
121	VH de MICA.38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISYRSRTIY- YADSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARWGYGSGGFDYWGQGTLVTVSS
122	VL de MICA.38	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP- DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSSFTFGPGTKVDIK
127	VK2 NT de 16A5-MICA.52	atggacatgagggtccccgctcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgc cagatgtgccatccagttgacccagtctccatcctccctgtctg- catctgtaggagacag agtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcattagcagtgctttagcctggtatcagca gaaaccagggaaagctcctaag- ctcctgatctatgatgcctccagtttggaaagtggggt cccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcct gcag- cctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatagttacccattcacttt cggccctgggaccaaagtggatatcaaa
128	VK2 AA de 16A5-MICA.52	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASS- LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPFT FGPGTKVDIK
130	Cadeia Pesada AA de 19G6-MICA.36 (236G)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQAPGEGLEWVALIWYDGSNK- FYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTAVYYCAREGSGHYWGQGTLVTVSSASTKG- PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS- LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS- TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT- KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN- VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
131	Cadeia Pesada NT de 19G6-MICA.36 (236G)	caggtgcaactggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagac- tctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatgccatgcactgggtccgccagg- ctccaggcgaggggctggaatgggtggcacttatatggtatgatggaagtaataaattctatg- gagactccgtgaagggccgcttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg- caaatgaacagcctgagcgccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagagggaagtggg- cactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatcgg- tcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctg- cctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgacca- gcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcg- tggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaag- cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatg- cccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaac- ccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag- ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa- gacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccg- tcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaag-

SEQ ID	Descrição	Sequências
		ccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca- ggtgtacaccctgccccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctg- cctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgga- gaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatag- caagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg- catgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggt

[00517] A prática da presente descrição usará, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de biologia celular, cultura de células, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante e imunologia, que estão dentro dos conhecimentos da técnica. Tais técnicas são explicadas por completo na literatura. Veja, por exemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooks, Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications, 2nd Ed. CRC Press (2007) and in Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[00518] Os seguintes exemplos são apresentados a título de ilus-

tração e não de limitação.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Geração e Rastreamento de Anticorpo

[00519] Camundongos transgênicos de IgG humanos (Hco7: 01 [J/K] (BALB/c)) foram imunizados com células de CHO transfectadas com MICA/B humano de tamanho natural. As células do baço do camundongo imunizado foram fundidas ao par de fusão SP2/0. Os sobrenadantes de hibridoma foram primeiro rastreados quanto à presença de anticorpos IgG humanos usando um ensaio de HTRF. A especificidade do antígeno foi, então, determinada por ligação em ELISA para hMICA, seguido por ensaios FACS com células de CHO expressando vários alelos de MICA/B humano. Estes mAbs FACS-positivos foram submetidos à caracterização adicional quanto à afinidade e desempenho em ensaios funcionais. O hibridoma 3F5, 16A5, 71C2, 19G6 e 24G11 foram clones de anticorpo representativos.

Exemplo 2. Expressão recombinante de anticorpos MICA/B

[00520] Os anticorpos anti-MICA/B aqui descritos podem ser expressos usando técnicas de clonagem e expressão recombinante comumente disponíveis na técnica. Por exemplo, o RNA total foi preparado a partir do clone de hibridoma 3F5 e cDNAs de VH e VK foram preparados. As regiões variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL) do anticorpo foram clonadas e sequenciadas (FIGs. 4A e 4C, respectivamente). A sequência 3F5 VH (SEQ ID NO: 31) foi clonada no vetor pICOFSCpurG que contém a sequência de sinal de osteonectina e a região constante de IgG.1f humana, gerando o plasmídeo pICOFSCpurG(MICA.2). A sequência 3F5 VL (SEQ ID NO: 33) foi clonada no vetor pICOFSCneoK que contém a sequência de sinal de osteonectina e a região constante capa humana, gerando o plasmídeo pICOFSCneoK(MICA.2). Os plasmídeos pICOFSCpurG(MICA.2) e pICOFSCneoK(MICA.2) foram cotransfectados em células de CHO-S e clo-

nes estáveis foram selecionados e rastreados quando à expressão recombinante. O anticorpo recombinante de 3F5 é referido como "MICA.2." Mutações na VL, por exemplo, CDR3, de MICA.2 foram feitos para melhorar a solubilidade do anticorpo. Tais mutantes de MICA.2 incluem MICA.20 (VH: SEQ ID NO: 115; VL: SEQ ID NO: 116), MICA.21 (VH: SEQ ID NO: 117; VL: SEQ ID NO: 118), MICA.22 (VH: SEQ ID NO: 119; VL: SEQ ID NO: 120), MICA.38 (VH: SEQ ID NO: 121; VL: SEQ ID NO: 122), MICA.39 (VH: SEQ ID NO: 123; VL: SEQ ID NO: 124) e MICA 40 (VH: SEQ ID NO: 125; VL: SEQ ID NO: 126). Estes mutantes contêm mutações ou inserções em ou próximas à posição 96 na VL de MICA.2.

[00521] Anticorpos compreendendo os CDRs e/ou domínios variáveis de anticorpos de hibridoma 19G6 (MICA.36; veja FIGs. 1A e 1C para VH e VL, respectivamente), 16A5 (MICA.52 (FIGs. 2A e 2C para VH e VL, respectivamente) e MICA.53), e 24G11 (MICA.54; veja FIGs. 3A e 3C para VH e VL, respectivamente) também foram expressos de forma recombinante em células hospedeiras. Os anticorpos recombinantes são aqui referidos com os nomes como MICA.36 (19G6), MICA.52 e MICA.53 (16A5) e MICA.54 (24G11). Ao se referir a qualquer um desses anticorpos recombinantes por seus nomes, nenhuma região constante específica é referida, ou seja, anticorpos MICA.2, MICA.20, MICA.21, MICA.22, MICA.36, MICA.38, MICA.39 e MICA.40, MICA.52, MICA.53 e MICA.54 podem ter qualquer região constante desejada. Uma mutação G236A (por numeração EU) foi feita na região constante de cadeia pesada de MICA.36 para criar o anticorpo MICA.36-G236A. O anticorpo anti-MICA/B não fucosilado MICA.36-IgG1-NF-G236A foi expresso por clonagem das sequências MICA.36-G236A nas células de CHO nocaute FUT8 (Células POTELLIGENT®) disponíveis na BioWa, Inc. (Princeton, NJ).

Exemplo 3. Afinidade de Ligação de Anticorpos anti-MICA/B para

alelos de MICA humanos determinados por Ressonância de Plasmônio Superficial

[00522] A cinética e a afinidade dos anticorpos anti-MICA/B para os alelos de MICA humanos foram determinadas em um instrumento Biacore T200 a 37°C com tampão fluente em pH 7,4 (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tensoativo P20 0,05% em v/v, 1 mg/mL de BSA). Os anticorpos anti-MICA/B foram capturados para superfícies Fc α-humanas. Os antígenos do alelo de MICA foram injetados em altas e baixas concentrações nanomolares (500 nM e 50 nM, exceto quando indicado de outra forma). Os resultados para os anticorpos MICA.36 e MICA.38 (MICA.2 com uma Ser inserida entre os resíduos 95 e 96 na cadeia leve) são mostrados na Tabela 2 abaixo. Ajustes cinéticos de alelos de MICA dos anticorpos MICA.36 e MICA.38 são mostrados nas FIGs. 6A-6H.

Tabela 2. Afinidade de anticorpo para alelos de MICA por SPR.

Anticorpo	**Alelo de MICA (antígeno)**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (nM)**
MICA.36hIgG1	MICA*002	2,86E+04	1,61E-02	> 250 (>½ de conc. de analisado mais alta)
	MICA*004	4,62E+04*	6,37E-04*	6,2-13,8
		9,52E+04	5,91E-04	
	MICA*008	1,20E+05*	6,06E-04*	4,0-5,1
		1,40E+05	5,65E-04	
	MICA*009	5,41E+04*	6,42E-04*	8,6-11,9
		7,01E+04	6,03E-04	
MICA.38_3F5_S95k	MICA*002	1,03E+06	1,27E-01	123
	MICA*004	4,10E+05	4,26E-02	104
	MICA*008	6,00E+05	7,80E-02	130
	MICA*009	3,97E+05	5,02E-02	126

*Esses resultados foram obtidos usando concentrações de antígeno de 100 nM e 10 nM.

[00523] A cinética e a afinidade dos anticorpos anti-MICA/B MICA.2, 19G6, 16A5 e 71C2 em relação aos alelos de MICA humanos (alelo huMICA-his *002, *004, *008 e *009) também foram determinadas em um instrumento Biacore 3000 usando as seguintes condições:

- Tampão Fluente: Tampão Fluente HES-EP
- Chip: CM5 Proteína G Chip Fc1: Branco. Fc2- 4: ~ 200Rus

- Ab: 5ug/mL, 10uL@ 10uL/min

- Ligação de Ag: associação de 5 min, dissociação de 7 min @ 25uL/min,

- Regeneração: Glicina 1,7, 10uL @ 100uL/min seguido por lavagem de 60s por HES-EP

[00524] Os resultados da análise Biacore são mostrados na Tabela 3 abaixo. Ajustes cinéticos de alelos de MICA de MICA.2, 19G6, 16A5 e 71C2 são mostrados nas FIGs. 6I-6L.

Tabela 3: Afinidade de anticorpo para alelos de MICA por SPR

Anticorpo	**Alelo de MICA (antigen)**	**KD (nM)**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**
MICA.2	MICA*002	27,5	3,80	10,4
	MICA*004	54,6	5,21	28,4
	MICA*008	40,5	6,09	24,6
	MICA*009	61,5	3,77	23,2
19G6	MICA*002	219	0,37	8,14
	MICA*004	9,78	2,34	2,28
	MICA*008	5,23	3,58	1,87
	MICA*009	13,7	1,57	2,15
16A5	MICA*002	147	0,71	10,4
	MICA*004	6,89	2,50	1,72
	MICA*008	4,55	3,79	1,72
	MICA*009	12,9	1,66	2,15
71C2	MICA*002	3010	0,03	11,6
	MICA*004	262	1,15	30,3
	MICA*008	39,9	2,72	10,9
	MICA*009	1400	0,23	32,5

Exemplo 4. Afinidade de Ligação de anticorpos anti-MICA/B para MICA/B de humanos e Cino determinada por Análise de Scatchard

[00525] O anticorpo MICA.36 foi radioiodado com ^{125}I-Na (1 mCi; PerkinElmer Catálogo NEZ033H001 MC) usando o reagente de iodação de fase sólida IODO-GEN® (1,3,4,6-tetracloro-3a-6a-difenilglicourila; Pierce, Catálogo 28601). O excesso de iodeto foi re-

movido usando uma coluna de dessalinização (Pierce, Catálogo 43243). As frações do anticorpo marcado foram coletadas e analisadas quanto à radioatividade em um contador gama Wizard 1470. A concentração do anticorpo ^{125}I-MICA.36 em cada fração foi calculada com o fluorômetro Qubit de Invitrogen. A radiopureza foi estabelecida por cromatografia em camada fina de proteína de pico e frações radioativas (Pinestar Technology, Catálogo 151-005).

[00526] A ligação do anticorpo MICA.36 radioiodado ao MICA/B humano expresso endogenamente em células 786-0 e SW480, bem como células de CHO transduzidas por MICA humano, MICB humano ou MICA/B de cino foi demonstrada incubando as células com uma titulação de ^{125}I-MICA.36. A ligação não específica foi determinada por ligação na presença de uma titulação de um excesso molar de 100 vezes de anticorpo não marcado e foi subtraída da contagem total por minuto (CPM) para calcular a ligação específica. Uma curva padrão linear de concentração de ^{125}I-MICA.36 versus CPM foi usada para extrapolar a atividade específica, ^{125}I-MICA.36 ligado em nM máximo e, assim, calcular o número do receptor por célula.

[00527] A atividade específica do MICA.36 iodado foi determinada plotando-se titulações de anticorpos contra os CPMs associados em uma curva padrão (FIG. 7A). A atividade específica foi calculada como sendo 164.214 CPM em 1 nM de ^{125}I-MICA.36. O número de receptores por célula foi calculado pela seguinte equação: (Bmáx) x (número de Avogadro) x (Volume do Ensaio) / # de células por cavidade.

[00528] Os resultados mostram que o anticorpo MICA.36 tem uma afinidade de cerca de 1-2 nM para MICA*008 humano superexpresso (FIG. 7B) e MICB*005 (FIG. 7C) em células de CHO, uma afinidade de cerca de 5-11 nM para MICA/B de cino superexpresso (FIGs. 7D e 7E), e uma afinidade de cerca de 0,4 nM para MICA/B humano expresso endogenamente em células 786-0 (FIG. 7F) e SW480 (FIG.

7G).

Exemplo 5. Ligação de Anticorpos Anti-MICA/B ao MICA/B Humano de Superfície Celular e Reatividade Cruzada para Moléculas de MICA/B de Cinomolgos em Citometria de Fluxo

[00529] Diluições em série de mAb de MICA.36-IgG1-NF-G236A foram incubadas com células de CHO transduzidas com alelos comuns de MICA/B humanos ou linhagens celulares tumorais humanas que expressam endogenamente MICA/B. As células foram, então, lavadas duas vezes e os anticorpos ligados às células foram detectados usando um anticorpo anti-humano secundário conjugado com um fluoróforo. As análises de citometria de fluxo foram realizadas usando um citômetro de fluxo FACSCantoII ou FACS Fortessa X-20. A intensidade de fluorescência média geométrica do mAb de MICA.36-IgG1-NF-G236A ligado às células foi determinada usando o software de análise FlowJo. As curvas de dose-resposta foram geradas e as EC50s calculados usando o software Prism.

[00530] Para medir a reatividade cruzada para as moléculas de MICA/B de Cinomolgos ("cino"), diluições em série de mAb de MICA.36-IgG1-NF-G236A foram incubadas com células de CHO transfectadas com dois clones de MICA/B de cino. O anticorpo ligado à célula foi detectado usando um anticorpo anti-humano secundário conjugado com um fluoróforo. As análises de citometria de fluxo foram realizadas usando um Fortessa X-20. Depois de controlar em parâmetros FSC-SSC-7AAD para excluir detritos e células mortas, a intensidade média de fluorescência de mAb de MICA.36-IgG1-NF-G236A foi determinada usando o software de análise FlowJo.

[00531] Em um experimento de citometria de fluxo, a titulação do mAb 19G6 em células de CHO que expressam ectopicamente alelos comuns de MICA/B humano mostrou 19G6 bem ligado a moléculas de MICA/B humanas nativas. Os dados são mostrados nas FIGs 8A e 8B.

[00532] A reatividade cruzada de 19G6 com MICA/B de macaco cinomolgo foi demonstrada pela ligação de 19G6 a dois clones de MICA/B de cino transfectados em células de CHO. Em experimentos de citometria de fluxo, o 19G6 se ligou bem ao clone # 4 de MICA de cino de CHO e ao clone # 6 de MICA de cino de CHO. Os dados de um experimento representativo são mostrados na FIG. 8C. A EC50 foi de 1,08 nM para o clone #4 de cino e 22,02 nM para o clone #6 de cino, indicando que 19G6 se liga ao MICA/B de cino com potência semelhante ao MICA/B humano.

[00533] MICA.36-IgG1-NF-G236A é ligado ao MICA/B expresso endogenamente em uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas (FIG. 8B). Os valores de EC50 para ligação às linhagens celulares tumorais humanas que expressam alelos de MICA (entre parênteses) 786-0 (*008), HeLa (*008), A2058 (*008/*018) e RPMI-8226 foram 1,37 nM, 1,76 nM, 5,4 nM e 3,90 nM, respectivamente.

[00534] Outros anticorpos anti-MICA/B, por exemplo, 24G11, 71C2, 16A5 (#1 e #2 são derivados de duas linhagens de hibridoma do mesmo clone), foram testados usando método semelhante (Tabelas 4 e 5 abaixo) (FIG. 8D- 8H)

Tabela 4: EC50 (nM) de anticorpos anti-MICA/B para alelos de MICA/B humanos comuns e MICA/B de cino

Ab	***002**	***004**	***008**	***009**	***010**	**MICB**	**cino#4**	**cino#6**
MICA.2	5,367	2,938	2,138	1,56	6,912	5,996	1,967	4,011
24G11	1065	517,5	247,7	496,9	722,5	262,2	394,5	330,6
71C2	264,3	26,21	10,03	10,15	80,01	9,813	23,43	231,7
19G6	151,7	11,39	9,229	8,21	18,48	1,826	1,076	22,02
16A5 (#1)	25,32	1,043	2,219	0,9019	15,15	8,159	0,856	9,256
16A5 (#2)*	613,6	65,25	394,6	122,1	246,5	21,62	2,384	13,77

Tabela 5: EC50 (nM) de anticorpos anti-MICA/B para MICA/B expresso endogenamente em linhagens celulares tumorais humanas

	EC50 de FACS (nM)			
Ab	**786-O**	**A2058**	**HeLa**	**RPMI-8226**
MICA.2	4,951	2,609	1,738	41,89
24G11	146,7	260,7	192,3	103,9
71C2	13,75	33,54	10,15	36,92
19G6	1,369	5,394	1,756	3,891
16A5 (#1)	2,484	7,685	3,761	7,998
16A5 (#2)	11,63	10,95	16,2	2,442

Exemplo 6. Depósito de Anticorpos Anti-MICA/B

[00535] Os experimentos de depósito foram realizados em um instrumento Octet HTX a 25 °C em solução salina tamponada com HEPES (HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 150mM, tensoativo P20 0,05% em v/v e 1 mg/mL de BSA). Os anticorpos anti-MICA/B e NKG2D-mFc foram capturados nas pontas anti-Fc e os sítios de captura restantes foram bloqueados com um excesso de IgG de controle negativo. MICA solúvel recombinante (alelo 8) foi ligado e a ligação subsequente ("sanduíche") de anticorpos anti-MICA/B foi testada.

[00536] Os anticorpos testados caíram em duas caixas de epítopos não sobrepostas. Os membros de cada caixa não podem se ligar simultaneamente ao MICA (indicando epítopos sobrepostos), porém, os membros de caixas diferentes podem.

[00537] Os resultados dos experimentos de depósito são apresentados na Tabela 6. Os anticorpos MICA.2, MICA.38, MICA.39 e MICA.40 estavam na mesma caixa de epítopo. Os anticorpos 24G11 (MICA.54) e MICA.36 formaram uma segunda caixa não sobreposta. Esses anticorpos não bloqueiam a ligação de NKD2D a MICA.

Tabela 6. Depósito de Anticorpos Anti-MICA/B.

Ligante (Ab)	MICA.2	MICA.38	MICA.39	MICA.40	24G11	MICA.36
MICA.2	0	0	0	0	1	1
MICA.38	0	0	0	0		1
MICA.39	0	0	0	0		1
MICA.40	0	0	0	0		1
24G11	1	1	1	1	0	0
MICA.36	1	1	1	1	0	0

(“0” = sem ligação simultânea; “1” = ligação simultânea)

Exemplo 7. Mapeamento de epítopo por HDX

[00538] A espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS), em ambos os modos normal e de alta resolução, foi utilizada para sondar epítopos de ligação de MICA com mAbs MICA.2, MICA.39, MICA.40, MICA.36 NF G236A e MICA .36.

[00539] A HDX-MS testa a conformação da proteína e a dinâmica conformacional em solução monitorando a taxa e a extensão da troca de deutério dos átomos de hidrogênio da amida de cadeia principal. O nível de HDX depende da acessibilidade ao solvente dos átomos de hidrogênio da amida de cadeia principal e das ligações de hidrogênio da proteína. O aumento de massa da proteína em HDX pode ser medido com precisão por MS. Quando esta técnica é combinada com a digestão enzimática, as características da estrutura no nível do peptídeo podem ser resolvidas, permitindo a diferenciação dos peptídeos expostos à superfície daqueles dobrados para dentro. A adição da fragmentação em fase gasosa para as regiões de peptídeo selecionadas por MS fornece informações de HDX de alta resolução no nível de aminoácidos. Normalmente, a marcação de deutério e subsequentes experimentos de extinção são realizados, seguidos por digestão enzimática, separação de peptídeos e análise por MS.

[00540] Antes dos experimentos de mapeamento de epítopo, experimentos não deuterados foram realizados para gerar uma lista de peptídeos comuns para o domínio extracelular de tamanho natural recom-

binante (ECD) do marcador MICA-His humano (Alelo 08, 15 µM), gerado internamente, e complexo de proteína de MICA e mAb (relação molar de 1:1). No experimento de HDX-MS, 5 µL de cada amostra (MICA ou MICA com mAb) foram diluídos em 55 µL de tampão D_2O (tampão de fosfato 10 mM, D_2O, pH 7,0) para iniciar as reações de marcação. As reações foram realizadas em diferentes períodos de tempo: 20 seg, 1 min, 10 min e 240 min. Ao final de cada período de reação de marcação, a reação foi extinta pela adição de tampão de extinção (TECP 1M em uréia 8M, pH 2,5, 1:1, v/v) e 50 µL de amostra extinta foram injetados no sistema Waters HDX-MS para análise. Os níveis de captação de deutério de peptídeos pépticos comuns foram monitorados na ausência/presença de mAbs de MICA/B. Para os experimentos de HDX de alta resolução, HDX diferencial foi monitorado entre MICA e MICA com Fab do anticorpo MICA.36, e as regiões de peptídeo em MICA mostrando redução significativa de HDX em Fab da ligação ao anticorpo de MICA.36 foram ainda fragmentadas por MS/MS. Os níveis de captação de deutério de resíduos de aminoácidos foram monitorados na ausência/presença de Fab de MICA.36.

[00541] A análise de dados de HDX-MS em MICA.2 (FIG. 9A), MICA.39 (FIG. 9B) e MICA.40 (FIG. 9C) em MICA indica que todos os três mAbs têm epítopos de ligação idênticos compreendidos por duas regiões de MICA:

Região 1: ^{201}LRRTVPPMVNVTRSEASEGN^{220} (SEQ ID NO: 56)

Região 2: ^{238}TWRQDGVSLSHDTQQ^{252} (SEQ ID NO: 57)

[00542] Com base nas diferenças relativas de captação de deutério, a região 2 tem as mudanças mais significativas na captação de deutério.

[00543] A análise de dados de HDX-MS em MICA.36 NF G236A e MICA.36 em MICA indica que ambas as moléculas têm epítopos idên-

ticos, que são compreendidos por três regiões de MICA (FIGs. 9D e 9E). A remoção da fucose e da mutação G236A não tem impacto no epítopo de ligação.

Região 1: ^{150}WTVPQSSRAQTLAM^{163} (SEQ ID NO: 52)

Região 2: ^{231}YPRNIILT^{238} (SEQ ID NO: 53)

Região 3: ^{253}WGDVLPDGNGTYQTW^{267} (SEQ ID NO: 55)

[00544] Com base nas diferenças relativas de captação de deutério, três regiões de peptídeo podem ser classificadas como região 3 > 2 > 1 com a região 3 tendo as mudanças mais significativas na captação de deutério.

[00545] Este estudo de HDX indica que as variantes de estabilização de MICA.2 (MICA.39 e MICA.40) mantiveram mapas de epítopos idênticos para MICA.2. O epítopo de ligação de MICA.36 em MICA foi caracterizado por conter regiões de ligação descontínuas como: ^{150}WTVPQSSRAQTLAM^{163} (SEQ ID NO: 52), ^{231}YPRNIILT^{238} (SEQ ID NO: 53) e ^{253}WGDVLPDGNGTYQTW^{267} (SEQ ID NO: 55), e a remoção de fucose e a mutação G236A não têm impacto no epítopo de ligação.

[00546] Em experimentos de HDX de alta resolução usando Fab MICA.36, as regiões 2 e 3 do epítopo de MICA.36 foram selecionadas, com base nos níveis de redução de HDX, para fragmentação em fase gasosa. Os resultados de HDX de alta resolução permitem o refinamento de epítopos para:

Região 1: ^{150}WTVPQSSRAQTLAM^{163} (SEQ ID NO: 52)

Região 2: ^{234}N, ^{237}L

Região 3: ^{255}DVLPDGNGTYQ^{265} (SEQ ID NO: 54), ^{267}W

[00547] FIG. 9F mostra esses resíduos sobrepostos na estrutura de cristal de MICA ligado a NKG2D.

Exemplo 8. Mapeamento de epítopo por exibição de levedura

[00548] A biblioteca de clones MICA-ECD foi gerada usando o kit

de mutagênese Genemorph II. Esta biblioteca de moléculas de MICA-ECD mutantes foi exibida na superfície de *S.cerevisiae* sob um promotor indutível por galactose, usando uma fusão myc-Aga1 de terminal C. As células de levedura induzidas por galactose foram marcadas primeiro com 100 nM de anticorpos anti-MICA/B humanos e 100 nM de anticorpo anti-myc de camundongo 9E10. As células foram, então, marcadas com anticorpos anti-humanos de cabra conjugados com PE e conjugados com Alexa-633. Para isolar as populações da biblioteca que bloqueiam a interação anticorpo-antígeno, as células marcadas que mostraram boa ligação ao anticorpo anti-myc, porém, ligação reduzida para os anticorpos anti-MICA/B foram classificadas usando classificação de células ativadas por fluorescência. As populações de células classificadas foram, então, cultivadas e enriquecidas por outro ciclo de marcação e classificação, conforme descrito acima. O DNA foi isolado do segundo ciclo de células classificadas e da biblioteca inicial. As amostras de DNA foram preparadas para o sequenciamento de NGS usando o kit de preparação da biblioteca Nextera XT, multiplexadas e sequenciadas usando o sequenciamento Miseq NGS. As leituras de sequência de DNA resultantes foram analisadas para identificar as sequências encontradas nas populações classificadas que são especialmente enriquecidas em relação à biblioteca inicial. Estas mutações enriquecidas foram mapeadas sobre a estrutura do complexo MICA-NKG2D (PDB ID: 1HYR) e mostraram manchas bem definidas na superfície da proteína (FIGs. 10D-10F). Os anticorpos MICA.36, MICA.2 e 24G11 (MICA.54) ligaram-se ao domínio α3 de MICA. Os epítopos eram os seguintes:

MICA.36: G254, D255, L257, Y264, W267 (FIG. 10A)

MICA.2: R240, Q241, D242, V244, R279 (FIG. 10B)

24G11: P258, G260, G262, Y264 (FIG. 10C)

Exemplo 9. Retenção de MICA de Superfície e Redução de MICA

solúvel (sMICA) *in vitro* por anticorpo anti-MICA/B

[00549] Linhagens celulares não humanas que expressam ectopicamente MICA/B foram cultivadas por 48 horas com MICA.36-IgG1-NF-G236A ou controle de isótipo. Após a cultura, as células foram coletadas e o nível de de MICA/B de superfície foi medido por manchamento com anticorpo anti-MICA/B clone 6D4. O sobrenadante foi coletado e o nível de MICA solúvel (sMICA) foi medido usando um kit MICA ELISA (Abcam ab100592). MICA.36-IgG1-NF-G236A aumentou o nível de superfície de MICA nas células, medido por citometria de fluxo (FIGs.11A-11D), e reduziu a quantidade de sMICA no sobrenadante de cultura, quantificado por ELISA (Figura 12A-12D), em comparação ao controle de isótipo (IgG1 NF).

[00550] Além disso, as linhagens celulares humanas que expressam MICA endogenamente foram cultivadas por 48 horas com MICA.36-IgG1-NF-G236A ou controle de isótipo. Após a cultura, as células foram coletadas e o nível de de MICA/B de superfície foi medido por manchamento com anticorpo anti-MICA/B clone 6D4. MICA.36-IgG1-NF-G236A aumentou o nível de MICA de superfície nas células, medido por citometria de fluxo (FIGs. 13A-13E), e reduziu a quantidade de sMICA no sobrenadante de cultura, quantificado por ELISA (FIG. 14A-14C). Assim, MICA.36-IgG1-NF-G236A mantém MICA/B na superfície da célula tumoral e leva à redução de sMICA/B. EC50 de retenção de MICA EC50 (nM) e redução em IC50 de sMICA (nM) são mostradas na Tabela 7:

Tabela 7: Retenção de MICA de superfície e redução de sMICA

Linhagem celular	Alelo de MICA	EC50 de Ligação (nM)	EC50 de retenção de MICA (nM)	Aumento da duplicação em MICA de superfície	Redução em EC50 de sMICA (nM)	% de diminuição em sMICA
786-O	008	1,37	0,057	1,47	0,14	66
HELA	008	1,76	0,032	1,43	0,10	32
A2058	008/018	5,4	0,093	2,41		15
HCT116	001/009	0,37	0,043	1,98	0,075	62

Exemplo 10: MICA.36-IgG1-NF-G236A mostrou afinidade realçada para CD16a e CD32a

[00551] MICA.36-IgG1-NF-G236A, um anticorpo IgG1 humano não fucosilado (NF) contendo uma mutação modificada na cadeia pesada, G236A, mostrou maior afinidade para CD16a (FcγRIIIa) e CD32a (FcγRIIa) do que IgG1 nativo. A ligação de FcγRs humanos a MICA.36-IgG1-NF-G236A foi estudada por ressonância de plasmônio superficial (SPR) e comparada a anticorpos MICA.36 com os isotipos IgG1, IgG1f-G236A e IgG1f-NF humanos tipo selvagem, também como anticorpos NF e IgG1 humanos de controle de ligação não MICA. Para estes estudos, a proteína A foi imobilizada nas células de fluxo 1-4 do chip sensor CM5 usando química de etil (dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimida (NHS) padrão, com bloqueio de etanolamina, em um tampão fluente de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA3 mM, tensoativo p20 0,05%, a uma densidade de ~ 3000 RU. Anticorpos em 3 μg/mL foram capturados na superfície da proteína A a uma densidade de ~ 200 - 400 RU, e a ligação de analisados de FcγR foi testada em tampão fluente consistindo em NaPO4 10 mM, NaCl 130 mM, p20 0,05%, tampão (PBS-T) pH 7,1 a 25ºC, usando tempo de associação de 120 s e tempo de dissociação de 180 s em uma taxa de fluxo de 30 μL/min. Para determinar a cinética e a afinidade de ligação, uma série de concentração de FcγR (diluição 3:1) de 1 μM até 0,15 nM (proteínas CD64) ou 10 μM até 1,5 nM (todos os outros FcγRs) foi testada. Os dados cinéticos foram ajustados a um modelo Langmuir 1:1 ou a um modelo em estado estacionário usando o software de avaliação Biacore T200.

[00552] A Tabela 8 mostra afinidades de ligação realçadas de MICA.36-IgG1-NF-G236A para alelos CD16a e CD32a humanos, conforme medido por SPR.

Tabela 8: Valores de Afinidade de Ressonância de Plasmônio Superficial para FcγRs humanos

Anticorpo	hCD16a-V158	hCD16a-F158	hCD32a-H131	hCD32a-R131
MICA.36-IgG1-NF-G236A	31	420	140	220
MICA.36 IgG1	360	>5000	780	1300
MICA.36 IgG1 NF	8	140	730	770
MICA.36 IgG1 G236A	850	>5000	130	260
IgG1 de Controle	480	>5000	1000	1700
NF de IgG1 de Controle	9,1	170	860	860

Exemplo 11: Fagocitose celular dependente de anticorpo realçada mediada por MICA.36-IgG1-NF-G236A (ADCP) e apresentação cruzada de antígeno

[00553] As células dendríticas (DCs) têm a capacidade de englobar células tumorais, processar e apresentar antígeno tumoral e iniciar respostas de células T específicas tumorais. Foi demonstrado que a opsonização de linhagens celulares tumorais de expressão de MICA/B com anticorpo anti-MICA/B pode realçar a apresentação cruzada do antígeno tumoral por células dendríticas e subsequente iniciação de células T CD8+ específicas do antígeno (Groh, V., PNAS 2005; 102:6461-6). O anticorpo MICA.36-IgG1-NF-G236A foi avaliado para ADCP e apresentação cruzada do antígeno. Células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC), de camundongos transgênicos Fc humanos (uma cepa de camundongo onde todos os FcγRs de camundongos foram deletados e FcγRs humanos, codificados como transgenes, foram inseridos, resultando na recapitulação da expressão de FcγR humano) (Smith, P., *et al*., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A.; 109:6181-6) foram usados como efetores. Para preparar BMDC, a medula óssea foi isolada de camundongos transgênicos Fc humanos e cultivados *in vitro* com mGM-CSF (10 ng/ml) e mIL-4 (5 ng/ml) e metade dos meios foi trocado no dia 2 e dia 4. As BMDCs foram colhidas no dia 5. Normalmente, mais de 80% das células total eram positivas para CD11c por manchamento por citometria de fluxo, indicando uma boa indução de BMDC. As células de melanoma B16.F10 transduzidas

com MICB, GFP e Ova, referidas como células B16.F10-MICB-GFP-ova, foram usadas como células alvo.

[00554] Para o ensaio ADCP, as células B16.F10-MICB-GFP-ova foram opsonizadas com Abs MICA.36 por 30 minutos a 4C. As células foram, então, irradiadas para interromper o crescimento e incubadas com BMDC por 24 horas, após o que a cultura foi corada com anticorpo CD11c anticamundongo e a fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo. A fagocitose foi calculada como a porcentagem de células CD11c+ GFP+ das células dendríticas CD11c+ totais. ADCP realçado foi observado com as variantes G236A do anticorpo (MICA.36-IgG1-NF-G236A e MICA.36 IgG1 G236A) em comparação com as variantes de NF de IgG1 ou IgG1 de MICA.36 (FIG. 15A). Uma EC50 de 10,7 nM foi medida para MICA.36-IgG1-NF-G236A quando BMDCs de camundongos transgênicos FcγR humanos foram usadas como efetores e células B16-MICB-GFP-Ova foram usadas como células alvo.

[00555] Para o ensaio de apresentação cruzada de antígeno, a proliferação de células T CD8+ de OT-I específicas para o antígeno ova é um indicador de quão eficiente as BMDCs processam e apresentam-se de forma cruzada o antígeno ova da célula B16.F10-MICB-GFP-ova para células T CD8+.

[00556] Para medir a apresentação cruzada do antígeno, as células B16.F10-MICB-GFP-ova foram opsonizadas com o anticorpo MICA.36 por 30 minutos a 4ºC. As células foram, então, irradiadas para interromper o crescimento e incubadas com BMDC por 24 horas. Em seguida, as células T CD8+ purificadas a partir de baços de camundongos OT-I (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J, The Jackson Laboratory) foram marcadas com Cell Trace Violet e adicionadas à cultura por 4 dias. Em seguida, a proliferação foi avaliada por citometria de fluxo. A proliferação foi calculada como a porcentagem de células T CD8+ com diluição de Cell Trace Violet de células T CD8+ totais. A proliferação

de células T CD8+ de OT-I serve como um indicador de quão eficientes as BMDCs processaram e apresentaram o peptídeo Ova às células T CD8+. A proliferação de células T CD8+ de OT-I realçada foi observada com MICA.36-IgG1-NF-G236A com EC50 de 1,6 nM (FIG. 15A).

Exemplo 12: Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos realçada mediada por MICA.36-IgG1-NF-G236A (ADCC).

[00557] A capacidade dos anticorpos anti-MICA/B de mediar a atividade de ADCC foi testada usando células NK humanas como células efetores e Raji que expressam ectopicamente MICA*009, ou células de melanoma A375 que expressam endogenamente MICA, como as células alvo.

[00558] As células alvo foram semeadas em 5.000 células/cavidade (A375) ou 10.000 células/cavidade (Raji-MICA) em placas de fundo plano brancas (A375) ou de fundo em V (Raji-MICA) de de 96 cavidades. Um volume igual de teste titulado ou anticorpos de controle foi adicionado às células alvo e incubado a 37 °C por 2 dias.

[00559] No dia seguinte, as PBMCs foram purificadas a partir de amostras de sangue total heparinizadas por centrifugação em gradiente de densidade e lavadas com PBS suplementada com 2% de FBS (HyClone). As células NK foram isoladas de PBMCs por seleção negativa usando um kit de separação baseado em contas magnéticas (Miltenyi Biotec). As células NK purificadas foram ressuspensas em $1x10^6$ células/mL em meios MYELOCULT™ (Stemcell Technologies) suplementados com 500 UI/mL de IL-2 e incubados durante a noite a 37 °C.

[00560] Após a incubação durante a noite, as células efetoras NK ativadas foram lavadas duas vezes em meios de ensaio de ADCC (RPMI 1640 com L-glutamina, sem vermelho de fenol suplementado com FBS de IgG ultrabaixo 10%) e a concentração foi ajustada para $5x10^5$ células/mL. As células alvo incubadas com anticorpos de teste

foram lavadas e ressuspensas em 100uL de meios. As células efetoras NK ativadas foram, então, adicionadas (100 μL/cavidade) para resultar em uma relação célula efetora/célula alvo final (E:T) de 10:1. A placa foi, então, colocada em uma incubadora umidificada a 37°C por 4 horas.

[00561] Para células A375 aderentes, as células NK contendo o sobrenadante foram removidas e as células alvo lavadas com meios antes da adição de 100uL de meios. O reagente CellTiter-Glo (Promega) foi preparado e equilibrado à temperatura ambiente antes de 100 μL/cavidade serem adicionados às células alvo. A luminescência foi detectada em uma leitora de placa Envision com o sinal proporcional ao número de células viáveis. A porcentagem de lise celular específica foi calculada usando a fórmula [100 - ((luminescência da Amostra - luminescência de morte máxima)/(luminescência de lise espontânea - luminescência de morte máxima)*100)].

[00562] Para as células Raji-MICA em suspensão, as células alvo e efetoras foram coradas para CD3 e CD56 (Biolegend), com Corante de Viabilidade Fixável eBioscience (Invitrogen), e fluorescência lida por um citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). As células NK (CD3-, CD56+) foram excluídas e as células restantes foram avaliadas quanto à morte celular (FVD+). A porcentagem de lise celular específica foi calculada usando a fórmula [Porcentagem de morte celular da amostra - porcentagem de morte celular espontânea].

[00563] As células alvo sozinhas forneceram o controle da lise espontânea, enquanto as células alvo lisadas com 100 μL/cavidade de tampão de lise Tween-20 5% representaram a morte máxima no ensaio. A porcentagem de lise de células alvo foi plotada para cada anticorpo usando o software Prism v7 de GraphPad Inc.

[00564] ADCC realçada foi observada com as variantes NF do anticorpo (MICA.36-IgG1-NF-G236A e MICA.36 IgG1 NF) em comparação

com as variantes de IgG1 ou IgG1 G236A de MICA.36 (FIGs. 16A e 16B).

Exemplo 13: Estudo de eficácia no modelo de metástase pulmonar B16.F10-MICA

[00565] O MICA/B humano é reconhecido pelo receptor NKG2D de murino, que possibilitou o teste do anticorpo anti-MICA/B em modelos de camundongo totalmente imunocompetentes. A proteína MICA de tamanho natural foi expressa ectopicamente no melanoma B16F10 de murino, adenocarcinoma do cólon MC38 e linhagens celulares de timoma EG7-ova, e a atividade do anticorpo MICA.36 com Fc humano (IgG1 NF G236A, IgG1 NF ou IgG1) ou Fc de camundongo (IgG2a ou IgG1-D265A) foi avaliado usando camundongos FcγR-Tg humanos e cepas de camundongo tipo selvagem (expressando FcγRs de murino), respectivamente.

[00566] No dia 0, os camundongos (camundongos transgênicos C57BL/6 huFcγR) receberam uma injeção intravenosa (IV) de 200 µL de células B16.F10-MICA (células de melanoma B16.F10 transduzidas com MICA) na veia da cauda lateral a uma concentração de 2 X 10^6 células/mL. No dia 3 e no dia 8, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (IP) de MICA.36-IgG1-NF-G236A em 5 mg/kg. No dia 14, os pulmões foram colhidos para medição da metástase de tumor de células B16.F10-MICA. Um mAb não fucosilado de IgG1 humano (interno) serviu como o controle de isótipo.

[00567] Sumariamente, os pulmões foram fotografados com a presença de uma régua dimensionada métrica posicionada no mesmo plano horizontal como os pulmões. Usando o software ImageJ, as imagens foram dimensionadas, os ajustes foram feitos para o equilíbrio de cores, o limiar foi definido e a região de interesse foi selecionada. Uma determinação do tamanho e contagem das partículas de metástase foi realizada. A análise foi feita pela área cumulativa (mm^2) das

metástases em uma determinada área de superfície ou por contagens totais de metástases em uma determinada área de superfície.

[00568] No dia 14, o soro foi coletado e armazenado a -20ºC antes da medição de sMICA usando um kit ELISA (Abcam ab100592).

[00569] Os anticorpos MICA.36 com isótipo de NF de IgG1 (MICA.36-IgG1-NF-G236A e MICA.36 IgG1 NF) foram eficazes na redução da área tumoral total formada por células tumorais B16F10-MICA, bem como o nível de sMICA no soro dos camundongos em comparação com o controle de isótipo (veja, FIGs. 17A e 17B).

Exemplo 14: Estudos de escalonamento de dose no modelo de metástase pulmonar B16.F10-MICA

[00570] No dia 0, os camundongos (camundongos transgênicos C57BL/6 huFcγR) receberam uma injeção intravenosa (IV) de 100 µL de células B16.F10-MICA na veia lateral da cauda a uma concentração de $1x10^7$ células/mL. No dia 1, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (IP) de anticorpo em concentrações especificadas. No dia 14, os pulmões foram colhidos para medição da metástase. Um mAb não fucosilado de IgG1 humano (BMS) serviu como o controle de isótipo.

[00571] Sumariamente, os pulmões foram fotografados com a presença de uma régua dimensionada métrica posicionada no mesmo plano horizontal como os pulmões. Usando o software ImageJ, as imagens foram dimensionadas, os ajustes foram feitos para o equilíbrio de cores, o limiar foi definido e a região de interesse foi selecionada. Uma determinação do tamanho e contagem das partículas de metástase foi realizada. A análise foi feita pela área cumulativa (mm^2) de metástases em uma determinada área de superfície ou por contagens totais de metástases em uma determinada área de superfície.

[00572] Os resultados de dois estudos separados mostraram redução da área total do tumor nos camundongos administrados com MI-

CA.36-IgG1-NF-G236A (MICA.36 NF G236A), em comparação com o controle de isótipo (3 mg/kg) (FIGs. 18A e 18B)

Exemplo 15: Eficácia de MICA.36-IgG1-NF-G236A (MICA.36 NF G236A) em Camundongos Transgênicos de MICA com Tumores de EG7-MICA

[00573] Para avaliar a eficácia terapêutica do anticorpo anti-MICA/B em camundongos tolerantes a MICA, camundongos transgênicos foram gerados nos quais MICA*009 humano foi expresso na glândula da próstata de camundongos C57BL/6 sob o controle do promotor de probasina (camundongos transgênicos(Tg) de MICA) (Liu, G. *et al*., 2013; J. Clin. Invest. 123, 4410-22). Os camundongos machos MICA-Tg foram capazes de tolerar o crescimento de células MC38 que expressam ectopicamente MICA (MC38-MICA), enquanto o mesmo tumor implantado em camundongos C57BL6 ou FcγR-Tg humanos, ou camundongos fêmeas MICA-Tg foram amplamente rejeitados. Assim, após a implantação de MC38-MICA, camundongos machos MICA-Tg mostraram menor produção de autoanticorpos contra MICA humano em comparação com camundongos C57BL6 tipo selvagem ou FcγR-Tg humanos. Juntos, esses resultados sugerem que os camundongos MICA-Tg são tolerantes à proteína MICA e aos tumores de expressão de MICA.

[00574] A eficácia dos anticorpos anti-MICA/B foi avaliada usando implantação subcutânea (SubQ) de EG7, uma linhagem celular de timoma EL4 que expressa níveis elevados de MICA e a ovalbumina de peptídeo. Anticorpo MICA.36 com Fc funcional (MICA.36-mg2a que tem um Fc de camundongo que é mais semelhante a IgG1 NF) ou Fc inerte (MICA.36-mg1-D265A que tem uma mutação em mIgG1 que anula a ligação à CD16 de camundongo) foi testado isoladamente ou em combinação com o anticorpo anti-PD-1.

[00575] O dia da implantação do tumor foi designado como dia 0 no

estudo. Os camundongos transgênicos B6.F10-MICA receberam uma injeção SubQ de 100 µl de células tumorais EG7-MICA a uma concentração de 5 x 10^7 células/mL (5 x 10^6 células/camundongo). Cinco dias após a implantação, os camundongos foram randomizados e a dosagem foi iniciada. Os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal (IP) do anticorpo especificado (anticorpos) em um volume de dose de 10 mL/kg de cada anticorpo uma vez a cada 3 dias para um total de 3 doses. Os seguintes anticorpos foram testados em várias combinações: mIgG1 de PD-1 anti-camundongo com mutação de Fc D265A, mIgG2a de MICA.36 Anti-Humano, mIgG1 de MICA.36 Anti-Humano com mutação de Fc D265A e controles de isotipo mIgG1 (MOPC-21, BioXCell) e mIgG2a mAb (C1.18.4, BioXCell).

[00576] A resposta do tumor foi determinada pela medição dos tumores com um calibrador duas vezes por semana, até que os tumores atingissem um tamanho "alvo" predeterminado de 1 cm^3 (FIGs. 19A e 19B). Os volumes do tumor [mm^3] foram estimados a partir da fórmula: Volume do tumor [mm^3] = (comprimento [mm] x largura [$mm]^2$)/2.

[00577] A porcentagem de inibição do crescimento tumoral (TGI%) para cada grupo de tratamento foi determinada calculando o TGI individual mediana desse grupo (FIG. 19C). O TGI individual no dia 't' calculado a partir de todos os animais de tratamento foi determinado pela fórmula:

$$[1-((T_t/T_0)/(C_t/C_0))]/[(C_t-C_0)/C_t] * 100 \quad \text{[Fórmula 1]}$$

Onde T_t = tamanho do tumor individual do animal tratado no tempo 't', T_0 = tamanho do tumor individual do animal tratado na primeira medição, C_t = tamanho médio dos tumores dos animais controle no tempo 't', C_0 = tamanho médio dos tumores dos animais controle na primeira medição.

[00578] Animais considerados "livres de progressão" no tempo "t" têm tamanhos de tumor (mm^3) que são menos de 4 vezes sua medi-

ção inicial (FIG. 19D).

[00579] O soro foi coletado no dia 11. O nível sérico de sMICA foi medido usando a plataforma Meso Scale Discovery (MSD) (FIG. 19E). MICA.38 foi usado como um anticorpo de captura e MICA.2 foi usado como um anticorpo de detecção. Os anticorpos MICA.36 reduziram o sMICA no soro em comparação com o controle de isótipo (FIG. 19E).

[00580] Enquanto neste estudo, MICA.36-mg2a não exibiu muita atividade do agente único, em outro estudo o anticorpo mostrou efeito na inibição do crescimento tumoral (Exemplo 16). O tratamento combinado com MICA.36-mg2a/anti-PD-1, no entanto, aumentou a regressão do tumor e a sobrevida estendida em comparação com o tratamento com anticorpo único (FIGs. 19C e 19D). 70 % dos camundongos estavam livres de tumor (TF) após o tratamento de combinação, enquanto 10% e 50% eram TF após a administração individual de MICA.36-mg2a e anticorpos anti-PD-1, respectivamente. Consistente com as observações em modelos de metástase pulmonar, os anticorpos MICA.36, sozinhos ou em combinação com o anticorpo anti-PD-1, levaram a uma redução significativa no sMICA sérico (FIG. 19E). A atividade antitumoral aumentada com o tratamento de combinação de MICA.36-mg2a/anti-PD-1 foi associada ao aumento da infiltração de células T e NK no tumor, bem como aumento do nível de Ki67 e expressão do marcador de ativação nas células T e NK na drenagem do tumor linfonodos. MICA.36 Fc inerte (MICA.36-mg1-D265A) não foi ativo como um agente único ou em combinação com o anticorpo anti-PD-1 (embora levasse à redução no sMICA sérico).

Exemplo 16: Estudos *in vivo* em camundongos transgênicos B6-MICA

[00581] Nesta experiência, camundongos transgênicos B6-MICA receberam uma injeção subcutânea (SubQ) de 100 µl de células tumorais EG7-MICA. Seis dias após o implante, os camundongos foram

randomizados e a dosagem foi iniciada. Os camundongos receberam uma combinação de anticorpos mIgG2a CTLA4 anti-camundongo, MICA.36 mIgG2a anti-humano e mAb mIgG2a controle de isótipo (C1.18.4, BioXCell), em um volume de dose de 10 mL/kg de cada anticorpo uma vez a cada 3 dias para um total de 3 doses, conforme descrito no Exemplo 15.

[00582] O anticorpo MICA.36 reduziu o volume do tumor e aumentou a TGI sozinho e em combinação com o anticorpo anti-CTLA4 (FIGs. 20A-20C). A combinação de anticorpos MICA.36 e anti-CTLA4 mostrou sobrevida livre de progressão estendida em comparação com o tratamento com anticorpo único (FIG. 20D).

Exemplo 17: Estudos *in vivo* em camundongos transgênicos B6-MICA

[00583] Camundongos transgênicos B6-MICA receberam uma injeção subcutânea (SubQ) de 100 µl de células tumorais EG7-MICA e foram tratados com os seguintes anticorpos conforme descrito no Exemplo 16 (volume de dose de 10 mL/kg de cada anticorpo uma vez a cada 3 dias para um total de 3 doses): PD-1 mIgG1 anti-camundongo com mutação Fc D265A, MICA.36 mIgG2a anti-humano e controles de isótipo mIgG1 (MOPC-21, BioXCell), mIgG2a mAb (C1.18.4, BioXCell).

[00584] O anticorpo MICA.36 reduziu o volume do tumor e aumentou a TGI sozinho e em combinação com o anticorpo anti-PD-1 (FIGs. 21A-21C). A combinação de MICA.36 e anticorpo anti-PD-1 prolongou a sobrevivência livre de progressão (FIG. 21D).

Exemplo 18. Solubilidade de anticorpos anti-MICA/B

[00585] Os anticorpos MICA.2 e MICA.36 foram expressos em células de CHO por métodos recombinantes. Um frasco congelado de 1 mL de clone de CHO de MICA.36 ou clone de CHO de MICA.2 foi descongelado para uma produção em escala. A cultura de células foi in-

cubada em meio CD CHO suplementado com 8 mM de glutamina, 1x HT e 500 ug/mL G418 em uma incubadora com ponto de ajuste a 37°C e 8% de CO_2. As células foram inicialmente cultivadas em um frasco de agitação de 250 mL em um volume de trabalho de 100 mL e aumentadas para 2L em dois frascos Corning Fernbach de 3L para produção em batelada. As culturas foram incubadas por 10 dias durante a fase de produção e colhidas quando a viabilidade caiu abaixo de 40%. A cultura foi clarificada e filtrada com filtro estéril de 0,8/0,2 um, e submetida ao processamento posterior.

[00586] O sobrenadante da cultura celular foi aplicado a uma coluna de cromatografia de afinidade com Proteína A pré-equilibrada com PBS a pH 7,5. A coluna foi lavada com PBS (5 volumes de coluna). O anticorpo foi eluído usando tampão citrato 0,1 M a pH 3. A fração contendo o anticorpo foi imediatamente neutralizada com tampão Tris 2 M a pH 8,5 para levar o pH final a 7,2. O anticorpo foi então dialisado contra PBS ou tampão sacarose histidina. O anticorpo foi armazenado em 4-8ºC.

[00587] O anticorpo MICA.2 mostrou baixa solubilidade. Apresentou turbidez durante as etapas de eluição e neutralização, e considerável precipitação durante a diálise e armazenamento mesmo em baixa concentração (<2 mg/ml) a 4-8ºC. Devido à precipitação, houve considerável perda de material. A solubilidade máxima do anticorpo MICA.2 foi de 2 mg/ml em pH neutro ou ligeiramente ácido. Os esforços de formulação não puderam aumentar a solubilidade do anticorpo MICA.2 para mais de 15 mg/ml que não será aceitável para fins de fabricação.

[00588] O anticorpo MICA.36 não apresentou turvação durante todas as etapas de purificação e armazenamento nas concentrações de 7,88 mg/ml a 4 ºC. Não precipita durante o armazenamento em tampão aquoso em pH neutro ou ligeiramente ácido, mesmo em concentrações acima de 7 mg/ml. O anticorpo MICA.36-NF-G236A, uma vari-

ante do anticorpo MICA.36, foi estável por 3 meses a 40 ºC na concentração de 50 mg/ml.

[00589] Portanto, os anticorpos MICA.36 e MICA.36-NF-G236A têm propriedades de solubilidade superiores em comparação com o anticorpo MICA.2.

Exemplo 19. Mapeamento de epítopo por cocristalografia de raios X

Expressão e purificação de proteínas:

[00590] O ECD de MICA*02 foi clonado no vetor pVL1393 com um peptídeo sinal de melitina de abelha melífera de terminal N e um marcador His_6 de terminal C e expresso em células T.ni (SISTEMAS DE EXPRESSÃO). A cadeia pesada e as cadeias leves de MICA.36 foram clonadas individualmente no vetor pTT5 com um peptídeo sinal de osteonectina de terminal N. A cadeia pesada também foi fundida a um marcador His6 de terminal C. O Fab MICA.36 foi expresso em células em suspensão Expi293. O ECD de MICA e o Fab de MICA.36 foram purificados usando resina Ni sefarose.

Cristalização e determinação da estrutura:

[00591] O complexo MICA.36:ECD de MICA foi formado a uma relação molar de 1,2:1 e o complexo foi purificado a partir de Fab não ligado por filtração em gel em NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8. Os cristais foram cultivados por difusão de vapor em queda livre em 20°C através da mistura de 0,2 µL de amostra de proteína concentrada (22 mg/mL) com 0,2 µL de licor-mãe (tartarato de sódio dibásico desidratado 0,2 M, PEG MME 550 30%). Os cristais foram resfriados rapidamente em nitrogênio líquido e os dados de difração foram coletados a 3,6 Å na linha de feixe IMCA-CAT 17-ID na Advanced Photon Source. O conjunto de dados foi processado no grupo espacial $P6_5$ usando XDS e a estrutura foi determinada por substituição molecular com Phaser usando o domínio constante Fab de PDB ID 4NM4, o domínio

variável Fab aparado por CDR de PDB ID 1HEZ e o domínio MICA α3 de PDB ID 1HYR. O domínio MICA α1-α2 não pôde ser encontrado por substituição molecular. Uma cópia do complexo MICA α3:Fab de MICA.36 foi encontrada na unidade assimétrica e foi refinada usando Phenix e construída usando COOT.

Análise estrutural:

[00592] A área de superfície acessível ao solvente em MICA enterrada na ligação de Fab foi calculada usando AREAIMOL com raio de sonda de 1,4Å. Os resíduos de MICA enterrados na ligação de MICA.36 foram: T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269 (FIGs. 22A-22C).

Exemplo 20. Estudos comparativos sobre a ligação a MICA

[00593] MICA.2 foi comparado com anticorpos Ab2 (CM24002 Ab2) e Ab29 (CM33322 Ab29) anti-MICA, que são descritos na Publicação do Pedido de Patente Internacional WO2013/049517, bem como Ab28 (CM33322 Ab28), que é descrito no Publicação do Pedido de Patente Internacional WO2015085210, para ligação a células que expressam MICA.

[00594] Os anticorpos Ab2, Ab28 e Ab29 também foram expressos em células de CHO por métodos recombinantes (MICA.5, MICA.7 e MICA.6, respectivamente). As células de CHO transduzidas com os alelos MICA 002, 004, 008.009, 010 foram semeadas a 100.000 células/cavidade. As células foram incubadas com anticorpos anti-MICA/B purificados por 30 minutos. A ligação dos anticorpos às células foi detectada usando um anticorpo secundário anti-$F(ab')_2$ humano conjugado a um fluoróforo. As análises de citometria de fluxo foram realizadas usando um citômetro FACSCantoII. A intensidade de fluorescência média geométrica dos anticorpos ligados às células foi determinada usando o software de análise FlowJo. MICA.2 mostrou ligação signifi-

cativamente mais forte a todas as linhagens celulares de CHO que expressam vários alelos MICA do que MICA.5, MICA.7 e MICA.6 (FIGs. 23A e 23B).

[00595] Os anticorpos também foram testados quanto à ligação a células RPMI-8226 humanas. As células foram semeadas a 100.000 células/cavidade e incubadas com anticorpos anti-MICA/B por 30 minutos. A ligação dos anticorpos foi detectada usando um anticorpo secundário anti $F(ab')_2$ humano conjugado a um fluoróforo. As análises de citometria de fluxo foram realizadas usando um citômetro FACSCantoII. A intensidade de fluorescência média geométrica dos anticorpos ligados às células foi determinada usando o software de análise FlowJo. MICA.1 e MICA.2 mostraram ligação significativamente mais forte a células RPMI-8226 do que Ab2, Ab28 e Ab29 e os sobrenadantes ("*supe*") de linhagens celulares de CHO que expressam suas contrapartes recombinantes MICA.5, MICA.7 e MICA. 6 (FIGs. 24A e 24B).

Exemplo 21. Medição de sMICA de soro

[00596] Camundongos transgênicos B6-MICA receberam uma injeção subcutânea (SubQ) de 100 µl de células EG7-MICA a uma concentração de células 5e7/mL (células 5e6/camundongo). O dia da implantação do tumor foi designado como dia 0. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (IP) do anticorpo especificado em um volume de dose de 10 mL/kg no dia 5. Amostras de soro foram coletadas nos dias 8 e 12 (72 e 168 horas após dosagem de anticorpo) para medição de sMICA.

[00597] Um ensaio de ligação de ligante qualificado na plataforma Meso Scale Discovery (MSD) foi usado para medir MICA solúvel total (sMIC A) em soro de camundongo EG7-MICA. Sumariamente, uma placa de ouro MSD de estreptavidina de 96 cavidades foi primeiro revestida com um anticorpo MICA de captura biotinilado (MICA.1-bioína). A placa foi então incubada com amostras e permitiu a captura de sMI-

CA na placa. Um anticorpo MICA de detecção rutenilado (MICA.2-Ru) foi adicionado para completar o imunoensaio em sanduíche. O ensaio de sMICA total detectou as formas de MICA recombinante e endógena na presença do MICA.36-mIgG2a. A leitura do ensaio foi eletroquimioluminescente (ECL). O ECL foi obtido após adicionar Read Buffer e ler a placa em um instrumento MSD SECTOR. O ECL resultante é uma medida quantitativa da quantidade de sMICA que está presente na amostra. 72 horas após a dosagem do anticorpo, os camundongos tratados com MICA.36-mIgG2a a 1 mg/kg e 10 mg/kg apresentaram aumento da quantidade de sMICA em seu soro; tal aumento não foi observado 168 horas após a dosagem do anticorpo (FIG. 25).

Exemplo 22. Estudo de farmacocinética (PK) de sMICA

[00598] Para medir PK IV, sMICA*009 foi avaliado em doses de 0,1 e 10 ug/kg em camundongos transgênicos B6-MICA (não portadores de tumor) na presença e ausência do anticorpo MICA.36-mIgG2a. Em primeiro lugar, uma dose de 10 mpk (10 mg/kg) de anticorpo MICA.36-mIgG2a ou controle de isótipo KLH foi administrada por meio da via intraperitoneal (IP). Em seguida, sMICA*009 foi administrado como uma injeção de bolo IV 72 h após a dosagem do anticorpo MICA.36-mIgG2a. Amostras de soro para análise de PK foram coletadas em 2 min, 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 24 h, 72 h, 168 h e 336 h após a dosagem de sMICA aos camundongos. A análise de PK não compartimental foi usada para estimar os parâmetros PK do anticorpo sMICA e MICA.36-mIgG2a. Os níveis de sMICA em animais dosados com 0,1 µg/kg estavam abaixo do nível de quantificação (BLQ). O T1/2 de 10 ug/kg de sMICA quando administrado sozinho é de 0,07 h, mas a meia-vida de sMICA é significativamente maior na presença de MICA.36-mIgG2a (3,5 h) (FIG. 26), provavelmente devido a um $T_{1/2}$ mais longo do complexo sMICA-mAb em relação ao do sMICA. A PK de MICA.36-mIgG2a é consistente com estudos anteriores e não foi afe-

tada pela dosagem de sMICA.

[00599] A descrição anterior das modalidades específicas revelará tão completamente a natureza geral da invenção que outros podem, aplicando o conhecimento dentro da perícia da técnica, facilmente modificar e/ou adaptar para várias aplicações tais modalidades específicas, sem experimentação indevida, sem afastamento do conceito geral da presente invenção. Portanto, tais adaptações e modificações destinam-se a estar dentro do significado e faixa de equivalentes das modalidades descritas, com base nos ensinamentos e orientações aqui apresentados. Deve ser entendido que a fraseologia ou terminologia aqui tem o propósito de descrição e não de limitação, de modo que a terminologia ou fraseologia da presente especificação deve ser interpretada pelo versado na técnica à luz dos ensinamentos e orientação.

[00600] Outras modalidades da invenção serão evidentes para os versados na técnica a partir da consideração do relatório descritivo e da prática da invenção aqui descrita. Pretende-se que a especificação e os exemplos sejam considerados apenas exemplificativos, com um verdadeiro escopo e espírito da invenção sendo indicado pelas seguintes reivindicações.

[00601] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes aqui descritos são incorporados por referência na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

[00602] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº 62/647.556, depositado em 23 de março de 2018, e 62/667.170, depositado em 4 de maio de 2018, que são incorporados por referência aqui em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga especificamente à sequência A relacionada ao polipeptídeo classe I de MHC humana (MICA) e/ou à sequência B relacionada ao polipeptídeo classe I de MHC humana (MICB), compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL); caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma região determinante de complementaridade de VH (CDR) 1, uma VH-CDR2 e uma VH-CDR3 e a VL compreende uma VL-CDR1, uma VL-CDR2 e uma VL-CDR3; em que a VH-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 7, 17, 27, 37 e 47.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 16, 26, 36 e 46.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a VH-CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 5, 15, 25, 35 e 45.

4. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a VL-CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8, 18, 28, 38 e 48.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a VL-CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 9, 19, 29, 39 e 49.

6. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a VL-CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que

consiste em SEQ ID NOs: 10, 20, 30, 40 e 50.

7. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que

(a) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 6, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 8, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 9, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 10;

(b) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 15, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 16, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 17, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 18, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 19, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 20;

(c) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 25, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 26, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 27, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 28, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 29, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 30;

(d) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 35, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 36, a VH-CDR3

compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 37, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 38, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 39, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 40; ou

(e) a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 45, a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 46, a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 47, a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 48, a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 49, e a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 50.

8. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, o anticorpo caracterizado pelo fato de ter uma ou mais propriedades selecionadas a partir do grupo que consiste em:

(a) o anticorpo inibe a eliminação de MICA por uma célula tumoral;

(b) o anticorpo aumenta o MICA ligado à membrana em uma célula tumoral;

(c) o anticorpo reduz o nível de MICA solúvel no soro em um paciente;

(d) o anticorpo media ADCC e/ou ADCP realçado;

(e) o anticorpo media o processamento de antígeno realçado e/ou apresentação cruzada por uma célula;

(f) o anticorpo inibe o crescimento e/ou metástase tumoral;

(g) o anticorpo reduz o volume do tumor;

(h) o anticorpo aumenta a sobrevida livre de progressão;

(i) o anticorpo aumenta a sobrevida global; e

(j) qualquer combinação dos mesmos.

9. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32 e 42.

10. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 12, 22, 32 e 42.

11. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a VL compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34 e 44.

12. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a VL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 14, 24, 34 e 44.

13. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que

(a) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4;

(b) a VH compreende a sequência de aminoácidos apre-

sentada na SEQ ID NO: 12 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 14;

(c) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 22 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 24;

(d) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 32 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 34; ou

(e) a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 42 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 44.

14. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que:

(a) o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60;

(b) o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60;

(c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 62, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 64;

(d) o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 66, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 68; ou

(e) o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreen-

dendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 70, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 72.

15. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo um ou mais resíduos de aminoácidos de MICA humano selecionados a partir do grupo que consiste em G254, D255, L257, Y264, W267, e qualquer combinação dos mesmos correspondendo à SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

16. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo G254, D255, L257, Y264 e W267 correspondendo à SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

17. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo os resíduos de aminoácidos W150-M163 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

18. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo os resíduos de aminoácidos Y231-T238 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

19. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo os resíduos de aminoácidos D255-Q265 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

20. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o epítopo compreende os resíduos de aminoácidos W253-W267 correspondentes à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

21. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo L201-N220 correspondente à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

22. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e 21, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo T238-Q252 correspondente à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS) .

23. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 21 e 22, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo L201-N220 e T238-Q252 correspondendo à SEQ ID NO: 51, conforme determinado por espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS).

24. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo no MICA humano compreendendo R240, Q241, D242, V244 e R279 correspondendo à SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

25. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo P258, G260, G262 e Y264 correspondendo à SEQ ID NO: 51, conforme determinado pela exibição da superfície de levedura.

26. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo pelo menos um resíduo selecionado a partir de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, WG254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X.

27. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo pelo menos dois resíduos selecionados de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X.

28. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo pelo menos três resíduos selecionados a partir de T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X.

29. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que se liga a um epítopo em MICA humano compreendendo T222, T224, R226, W233, N234, H248, D249, Q251, Q252, W253, G254, D255, V256, L257, P258, D259, G260, N261, Y264, Q265, W267 e A269, conforme determinado por cocristalografia de raios X.

30. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a MICA humano com uma K_D de cerca de 1 x 10^{-4} M M ou menos, em que K_D é medida por análise de ressonância de plasmônio superficial

(Biacore).

31. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente ao MICA humano com uma taxa on (k_{on}) de cerca de 1 x 10^{-4} M 1/Ms ou mais, em que a taxa k_{on} é medida pela análise de ressonância de plasmônio superficial (Biacore).

32. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente ao MICA humano com uma taxa off (k_{off}) de cerca de 1 x 10^{-4} M 1/s ou menos, em que a k_{off} é medida pela análise de ressonância de plasmônio superficial (Biacore).

33. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 32, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste em uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3, uma IgG4 ou uma variante das mesmas.

34. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo IgG1.

35. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 34, caracterizado pelo fato de que não é fucosilado.

36. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que compreende uma região constante na cadeia pesada, e em que a região constante compreende uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 em SEQ ID NO: 58.

37. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

38. Anticorpo que se liga especificamente à sequência A relacionada ao polipeptídeo classe I de MHC humana (MICA) e/ou à sequência B relacionada ao polipeptídeo classe I de MHC humana

(MICB), compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL); caracterizado pelo fato de que a VH compreende uma região determinante de complementaridade de VH (CDR) 1, uma VH-CDR2 e uma VH-CDR3 e a VL compreende uma VL-CDR1, uma VL-CDR2 e uma VL-CDR3; em que

a VH-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 5,

a VH-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 6,

a VH-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7,

a VL-CDR1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 8,

a VL-CDR2 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 9, e

a VL-CDR3 compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 10; e

em que o anticorpo é não fucosilado.

39. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a VH compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 2 e a VL compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 4.

40. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que compreende uma região constante na cadeia pesada que compreende uma mutação de G para A em uma posição que corresponde ao resíduo 234 na SEQ ID NO: 58.

41. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 40, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de

aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60

42. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 130, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 60

43. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, caracterizado pelo fato de que não é fucosilado.

44. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, caracterizado pelo fato de que é hipofucosilado.

45. Anticorpo que se liga especificamente à sequência A relacionada ao polipeptídeo classe I de MHC humana (MICA) e/ou à sequência B relacionada ao polipeptídeo classe I de MHC humana (MICB), caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 58, e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 60, em que o anticorpo é não fucosilado.

46. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, caracterizado pelo fato de que é produzido por uma linhagem celular que reduziu ou eliminou a expressão de fucosiltransferase.

47. Anticorpo, de acordo com as reivindicações 43 a 45, caracterizado pelo fato de que é produzido por uma linhagem celular que não possui o gene FUT8 ou possui um gene FUT8 funcionalmente interrompido (codificando α-(1,6) fucosiltransferase).

48. Polinucleotídeo ou um conjunto de polinucleotídeos, caracterizado pelo fato de que codificam o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47.

49. Vetor ou um conjunto de vetores, caracterizado pelo fa-

to de que compreende o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos, como definido na reivindicação 48.

50. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47, o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos como definido na reivindicação 48, ou o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49.

51. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47, e um agente terapêutico.

52. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico é selecionado a partir do grupo que consiste em uma citotoxina, um fármaco não citotóxico, um agente radioativo, um segundo anticorpo, uma enzima, um agente antineoplásico e qualquer combinação dos mesmos.

53. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que a citotoxina é selecionada a partir do grupo que consiste em dolastatina, monometil auristatina E (MMAE), maitansina, duocarmicina, caliqueamicina, pirrolobenzodiazepina, duocarmicina, centanamicina, SN38, doxorrubicina, um derivado dos mesmos, um análogo sintético dos mesmos, e qualquer combinação dos mesmos.

54. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a citotoxina compreende Citotoxina A.

55. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47, o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos como definido na reivindicação 48, o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49, ou o imunoconjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 51 a 54, e um excipiente far-

maceuticamente aceitável.

56. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47 e um segundo anticorpo.

57. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo se liga especificamente a uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, TIM3, NKG2a, OX40, ICOS, CD137, KIR, TGFβ, IL-10, IL-8, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CD27, GITR e qualquer combinação dos mesmos.

58. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-PD-1.

59. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 58, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende nivolumabe ou pembrolizumabe.

60. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-PD-L1.

61. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-CTLA-4.

62. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 compreende tremelimumabe ou ipilimumabe.

63. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-LAG3.

64. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-LAG3 compre-

ende 25F7.

65. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-CD137.

66. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 65, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-CD137 compreende urelumabe.

67. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-KIR.

68. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-KIR compreende lirilumabe.

69. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que o segundo anticorpo compreende um anticorpo anti-GITR.

70. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-GITR compreende MK4166 ou TRX518.

71. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 70, caracterizada pelo fato de que é formulada para administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural, intraesternal, tópica, epidérmica ou mucosal.

72. Método de tratamento de um câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47, o polinucleotídeo ou o conjunto de

polinucleotídeos como definido na reivindicação 48, o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49, a célula hospedeira como definida na reivindicação 50, o imunoconjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 51 a 54, ou composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 55 a 71.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o câncer compreende um tumor.

74. Método, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), NSCLC escamoso, NSCLC não escamoso, glioma, câncer gastrointestinal, câncer renal, carcinoma de células claras, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer colorretal, câncer de endométrio, câncer de rim, carcinoma de células renais (RCC), câncer de próstata, adenocarcinoma de próstata refratário a hormônios, câncer de tireoide, neuroblastoma, câncer pancreático, glioblastoma (glioblastoma multiforme), câncer cervical, câncer de estômago, câncer de bexiga, hepatoma (carcinoma hepatocelular), câncer de mama, carcinoma de cólon, câncer de cabeça e pescoço (ou carcinoma), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), câncer gástrico, tumor de células germinativas, sarcoma pediátrico, exterminadora natural sinonasal, melanoma, melanoma maligno metastático, melanoma maligno cutâneo ou intraocular, mesotelioma, câncer ósseo, câncer de pele, câncer uterino, câncer da região anal, câncer testicular, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, tumores sólidos da infância, câncer do ureter, carci-

noma da pelve renal, neoplasia do sistema nervoso central (CNS), linfoma CNS primário, angiogênese tumoral, tumor do eixo espinhal, câncer cerebral, glioma do tronco cerebral, adenoma hipofisário, sarcoma de Kaposi, câncer epidermoide, câncer de células escamosas, cânceres induzidos pelo ambiente, incluindo aqueles induzidos por amianto, cânceres relacionados a vírus ou cânceres de origem viral, tumores originados ou relacionados ao vírus do papiloma humano (HPV) e combinações dos referidos cânceres.

75. Método, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado dentre leucemia aguda (ALL), leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL) e leucemia mielogenosa crônica (CML), AML não diferenciada, leucemia mieloblástica, leucemia mieloblástica, leucemia promielocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia monocítica, eritroleucemia, leucemia megacarioblástica, sarcoma granulocítico isolado, cloroma, linfoma de Hodgkin (HL), linfoma não Hodgkin (NHL), linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma de células B monocitoides, linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT), linfoma de células grandes anaplásico, linfoma/leucemia de células T do adulto, linfoma de células de revestimento, linfoma de células T angioimunoblástico, linfoma angiocêntrico, linfoma de células T intestinal, linfoma de células B mediastinal primário, linfoma linfoblástico T precursor, linfoblástico T; linfoma de células T periférico, linfoma linfoblástico, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, linfoma histiocítico verdadeiro, linfoma do sistema nervoso central primário, linfoma de efusão primário, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoéticos de linhagem linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma de células grandes imunoblástico, linfoma linfoblástico B precursor, linfoma de células T cutâneo (CTLC),

linfoma linfoplasmacitoide (LPL) com macroglobulinemia de Waldenstrom; mieloma, mieloma de IgG, mieloma de cadeia leve, mieloma não secretor, mieloma latente (mieloma indolente), plasmocitoma solitário, mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de células pilosas; e quaisquer combinações dos referidos cânceres.

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 75, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado dentre câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de bexiga, câncer pancreático, câncer gástrico, câncer de cólon, carcinoma de células renais (RCC), câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), mesotelioma, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, mieloma múltiplo e combinações dos referidos cânceres.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 76, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado dentre câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de bexiga, câncer pancreático, câncer gástrico, câncer de cólon e combinações dos referidos cânceres.

78. Método para inibir a eliminação de MICA por uma célula tumoral em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47, o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos como definido na reivindicação 48, o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49, a célula hospedeira como definida na reivindicação 50, o imunoconjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 51 a 54, ou a composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 55 a 71.

79. Método para reduzir a eliminação de MICA no soro e/ou

reter MICA na superfície de células tumorais em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 47, o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos como definido na reivindicação 48, o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49, a célula hospedeira como definida na reivindicação 50, o imunoconjugado como defenido em qualquer uma das reivindicações 51 a 54, ou a composição farmacêutica como defenida em qualquer uma das reivindicações 55 a 71.

80. Método para matar uma célula tumoral em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração do anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos como definido na reivindicação 48, o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49, a célula hospedeira, como definida na reivindicação 50, o imunoconjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 51 a 54, ou a composição farmacêutica, como definido em qualquer uma das reivindicações 55 a 71.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 80, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem um câncer selecionado dentre câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de bexiga, câncer pancreático, câncer gástrico, câncer de cólon, carcinoma de células renais (RCC), câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), mesotelioma, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, mieloma múltiplo e combinações dos referidos cânceres.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 72, caracterizado pelo fato de que o anticorpo, o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos, o vetor ou o conjunto de veto-

res, a célula hospedeira, o imunoconjugado ou a composição farmacêutica é administrado por via intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinhal, epidérmica, epidural, intraesternal, tópica, epidermal ou mucosal.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 82, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um humano.

84. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 83, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar ao indivíduo uma segunda terapia.

85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína selecionada do Coestimulador de células T Induzíveis (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), NKG2A, CD27, CD96, proteína Relacionada ao TNFR Induzida por Glicocorticoide (GITR) e Mediador de Entrada do Vírus do Herpes (HVEM), Morte Programada-1 (PD-1), Ligante de Morte Programada-1 (PD-L1), CTLA-4, Atenuador de Linfócitos B e T (BTLA), Imunoglobulina de células T e domínio de Mucina-3 (TIM-3), Gene de Ativação de Linfócitos-3 (LAG-3), receptor de adenosina A2a (A2aR), Receptor tipo Lectina de célula Exterminadora G1 (KLRG-1), Receptor de Célula Exterminadora Natural 2B4 (CD244), CD160, Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM (TIGIT) e o receptor para Supressor de Ig de domínio V de Ativação de células T (VISTA), KIR, TGFβ, IL-10, IL-8, B7-H4, ligante Fas, CXCR4, mesotelina, CEACAM-1, CD52, HER2 e qualquer combinação dos mesmos.

86. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-PD-1.

87. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende nivolumabe ou pembrolizumabe.

88. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-PD-L1.

89. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-PD-L1 selecionado a partir de atezolizumabe, durvalumabe e avelumabe.

90. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-CTLA-4.

91. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende tremelimumabe ou ipilimumabe.

92. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-LAG3.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-LAG3 compreende 25F7.

94. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-CD137.

95. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CD137 compreende urelumabe.

96. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-KIR.

97. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-KIR compreende lirilumabe.

98. Método, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico compreende um anticorpo anti-GITR.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GITR compreende MK4166 ou TRX518.

100. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende um agente quimioterápico para câncer, radiação, um agente que ativa as células imunes inatas e/ou um agente que realça a sobrevida de células T NK e/ou CD8+.

101. Método, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende um agente quimioterápico que induz a expressão de MICA/B em células tumorais.

102. Método, de acordo com a reivindicação 100 ou 101, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende um agente quimioterapêutico selecionado a partir de inibidores de proteassoma, IMiDs e inibidores de Bet.

103. Método, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o inibidor de proteassoma é bortezomibe.

104. Método, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende uma fusão de IL-10 e IL-10-Fc pegilada.

105. Método, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende um agente que realça a sobrevida de células T NK e/ou CD8+ selecionadas de IL-2 pegilada.

106. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracteri-

zado pelo fato de que a segunda terapia compreende um agente eleito a partir de doxorrubicina (ADRIAMYCIN®), cisplatina, carboplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucila (LEUKERAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®; NEOSAR®), lenalidomida (REVLIMID®), bortezomibe (VELCADE®), dexametasona, mitoxantrona, etoposídeo, citarabina, bendamustina (TREANDA®), rituximabe (RITUXAN®), ifosfamida, vincristina (ONCOVIN®), fludarabina (FLUDARA®), talidomida (THALOMID®), alentuzumabe (CAMPATH®, ofatumumabe (ARZERRA®), everolimus (AFINITOR®, ZORTRESS®) e carfilzomibe (KYPROLISTM).

107. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que a segunda terapia compreende um antagonista de IDO.

108. Método de preparação de um anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende expressar o polinucleotídeo ou o conjunto de polinucleotídeos como definido na reivindicação 48 ou o vetor ou o conjunto de vetores como definido na reivindicação 49 em uma célula hospedeira sob condições adequadas.

109. Método, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a coleta do anticorpo.

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 12/514

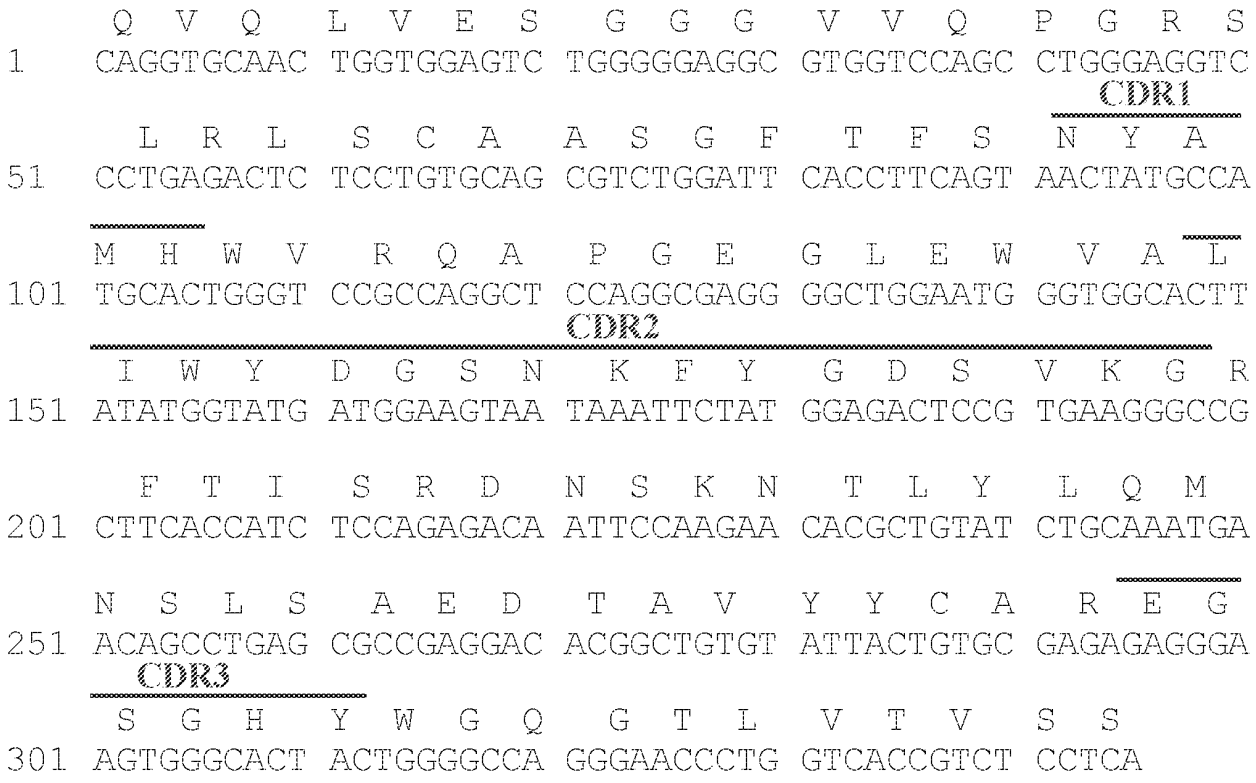


FIG. 1A – 19G6-MICA.36 VH1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 13/514

	Família	LOCUS	RF	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VH3	3-33	pH3v4D		DP-50/hv3019b9...+
Segmento D	Não determinado				.
Segmento J	JH4	4			JH4b
Entrada	19G6.D5.E4-VH1				

3-33	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A
Entrada	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
								_CDR1_____															
3-33	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
Entrada	–	–	–	–	–	–	–	N	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–
				__CDR2_____																			
3-33	W	V	A	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T
Entrada	–	–	–	L	–	–	–	–	–	–	–	–	F	–	G	–	–	–	–	–	–	–	–
3-33	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
Entrada	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–
							__CDR3_____																
3-33	V	Y	Y	C	A	R																	
JH4												Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
Entrada	–	–	–	–	–	–	E	G	S	G	H	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

FIG. 1B – 19G6-MICA.36 VH1

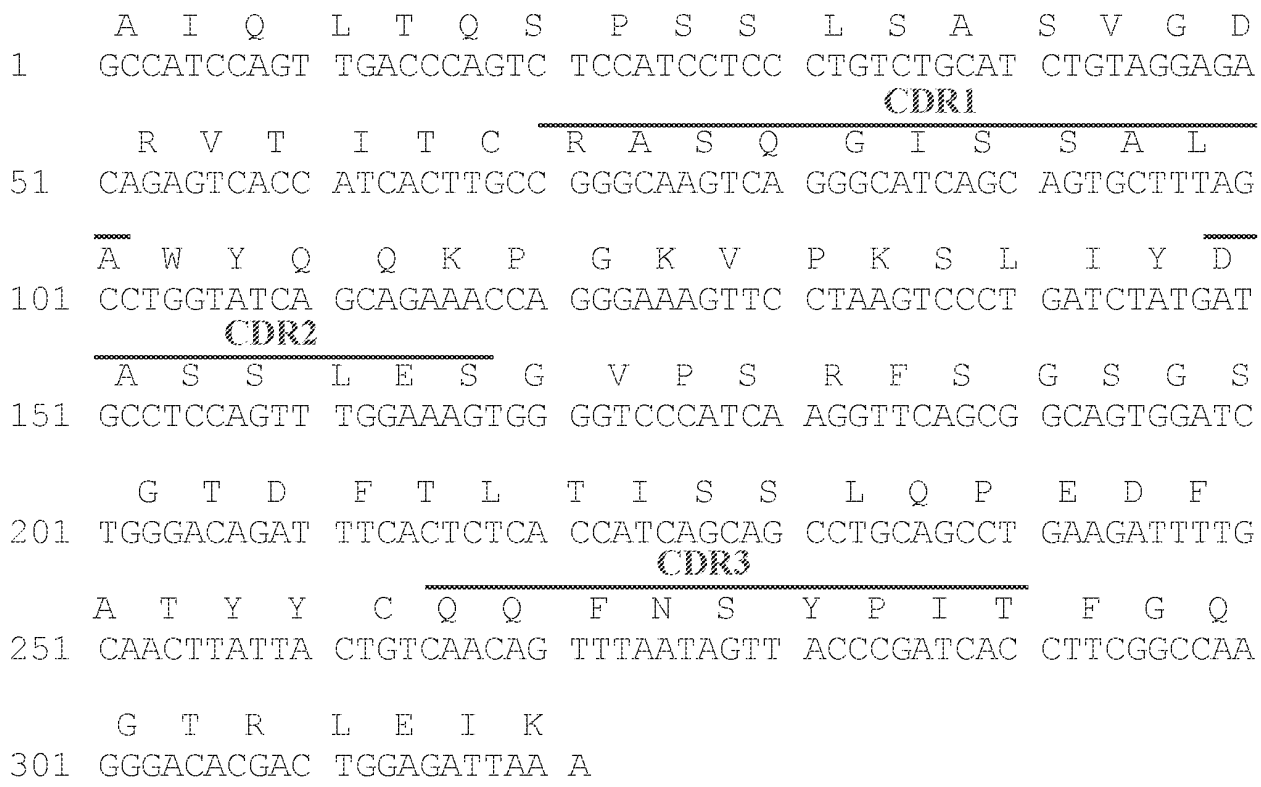


FIG. 1C – 19G6-MICA.36 VK1

	Família	LOCUS	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VK1	L18	Va''+	
Segmento J	JK5	5	JK5	
Entrada	19G6.D5.E4-VK1			

L18	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	_CDR1_____																						
L18	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	S
				_CDR2_____																			
L18	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																				_CDR3_____			
L18	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	N
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L18	N	Y																					
JK5				I	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K								
Entrada	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								

FIG. 1D – 19G6-MICA.36 VK1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 16/514

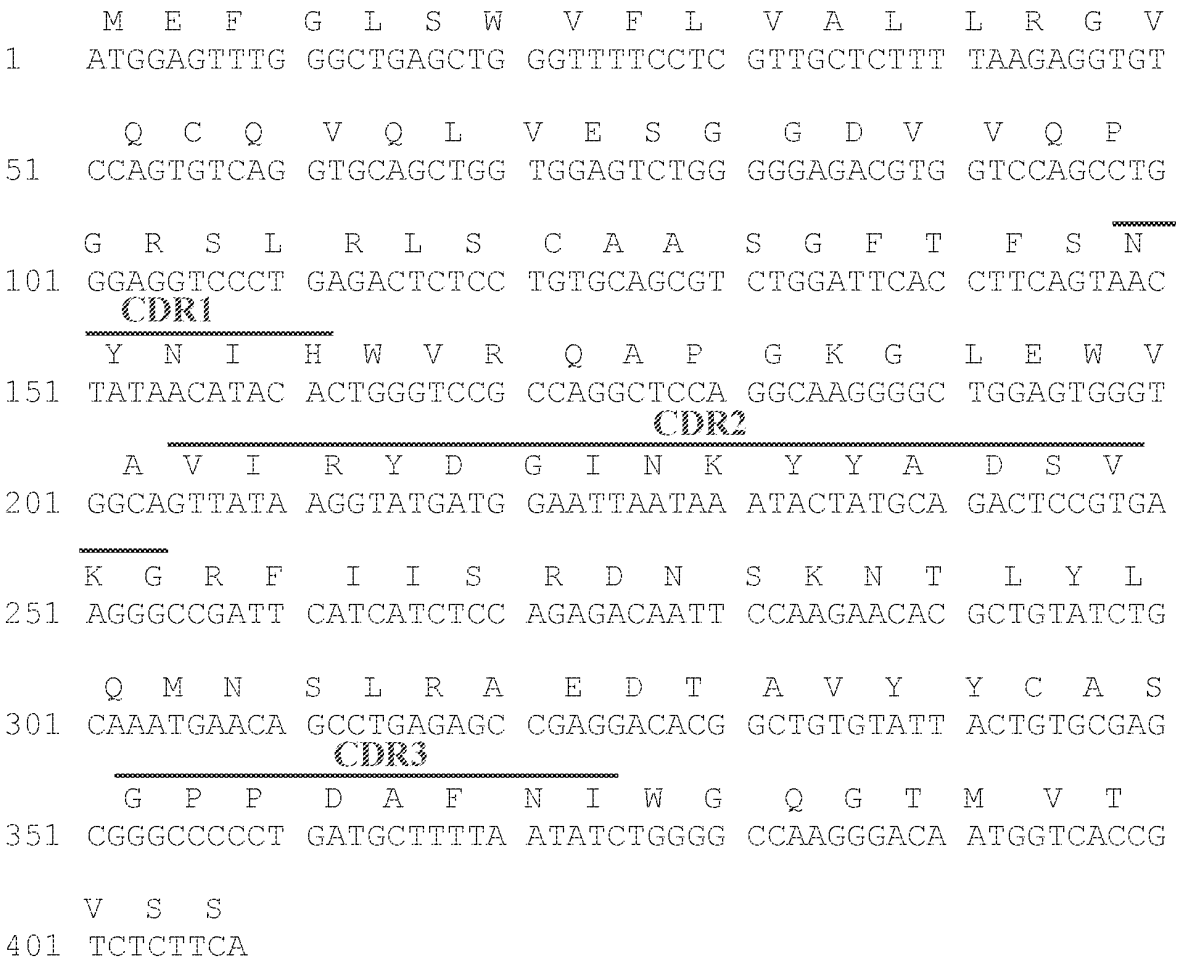


FIG. 2A – 16A5-MICA.52 VH1

	Família	LOCUS	RF	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VH3	3-33		pH3v4D	DP-50/hv3019b9...+
Segmento D	Não determinado				.
Segmento J	JH3	3			JH3b
Entrada	16A5.C1.G2-VH1				

3-33	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A
Entrada	–	–	–	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
									CDR1														
3-33	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
Entrada	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
				CDR2																			
3-33	W	V	A	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T
Entrada	–	–	–	–	–	R	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I
3-33	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
Entrada	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
									CDR3														
3-33	V	Y	Y	C	A	R																	
JH3										D			D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V
Entrada	–	–	–	–	–	S	G	P	P	–	A	F	N	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
JH3	S	S																					
Entrada	–	–																					

FIG. 2B – 16A5-MICA.52 VH1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 18/514

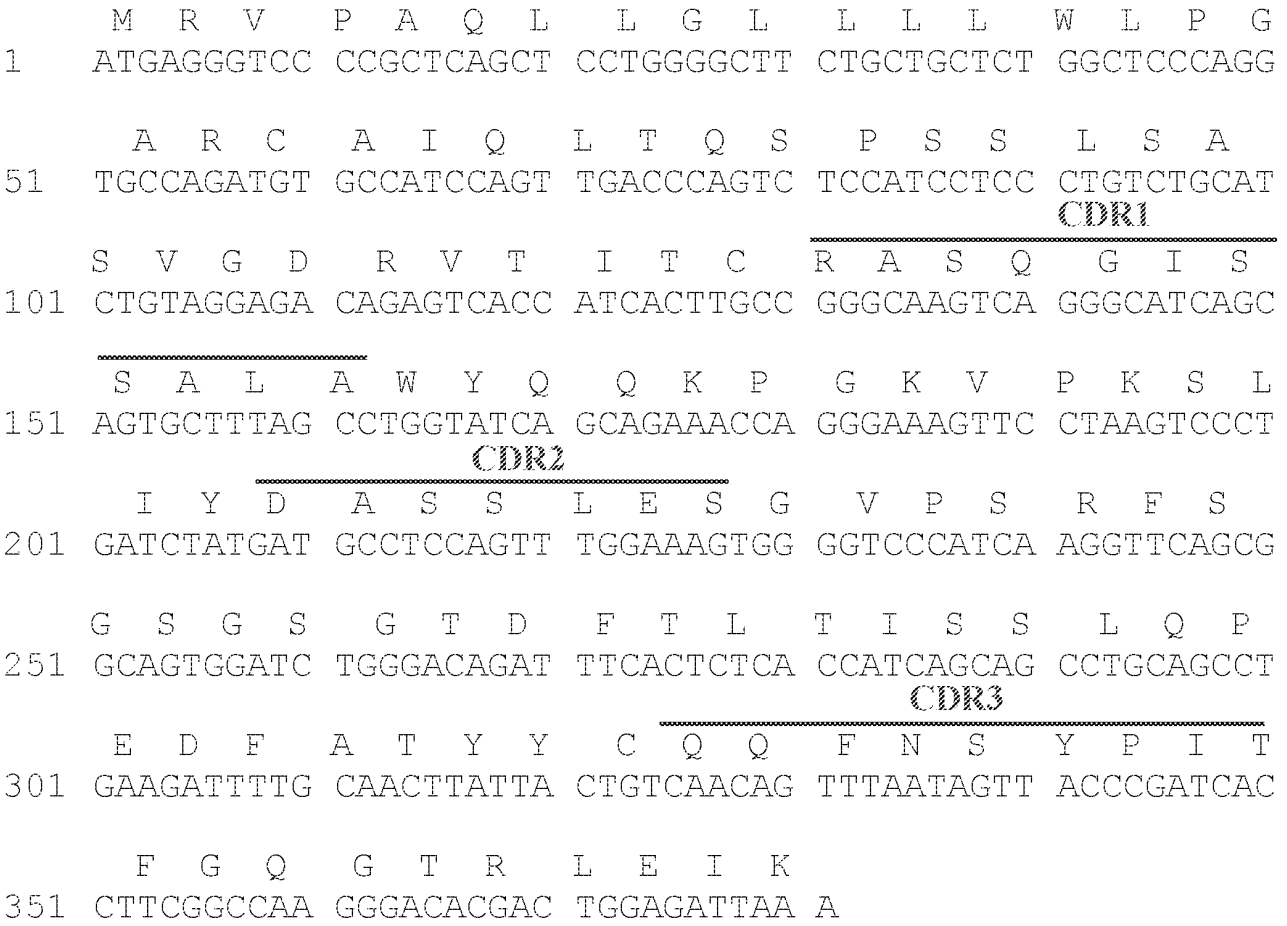


FIG. 2C – 16A5-MICA.52 VH1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 19/514

	Família	LOCUS	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VK1	L18	Va''+	
Segmento J	JK5	5	JK5	
Entrada	16A5.C1.G2-VK1			

L18	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR1																						
L18	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	S
				CDR2																			
L18	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																			CDR3				
L18	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	N
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	N	Y																					
JK5				I	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K								
Entrada	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								

FIG. 2D – 16A5-MICA.52 VH1

```
          A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1         GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  _CDR1_____________________________________
          R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   A   L   A
52        AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

                                                                  _CDR2____
          W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A
103       TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

          ____________________
          S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205       ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                      _CDR3_____________________________
          Y   Y   C   Q   Q   F   N   S   Y   P   F   T   F   G   P   G   T
256       TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC

          K   V   D   I   K
307       AAA GTG GAT ATC AAA
```

FIG. 2E – 16A5-MICA.53 VK2

	Família	LOCUS	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VK1	L18	Va''+	
Segmento J	JK3	3	JK3	
Entrada	16A5.C1.G2-VK2			

L18	A	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR1																						
L18	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				CDR2																			
L18	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																				CDR3			
L18	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	N
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	N	Y																					
JK3				F	T	F	G	P	G	T	K	V	D	I	K								
Entrada	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								

FIG. 2F – 16A5-MICA.53 VK2

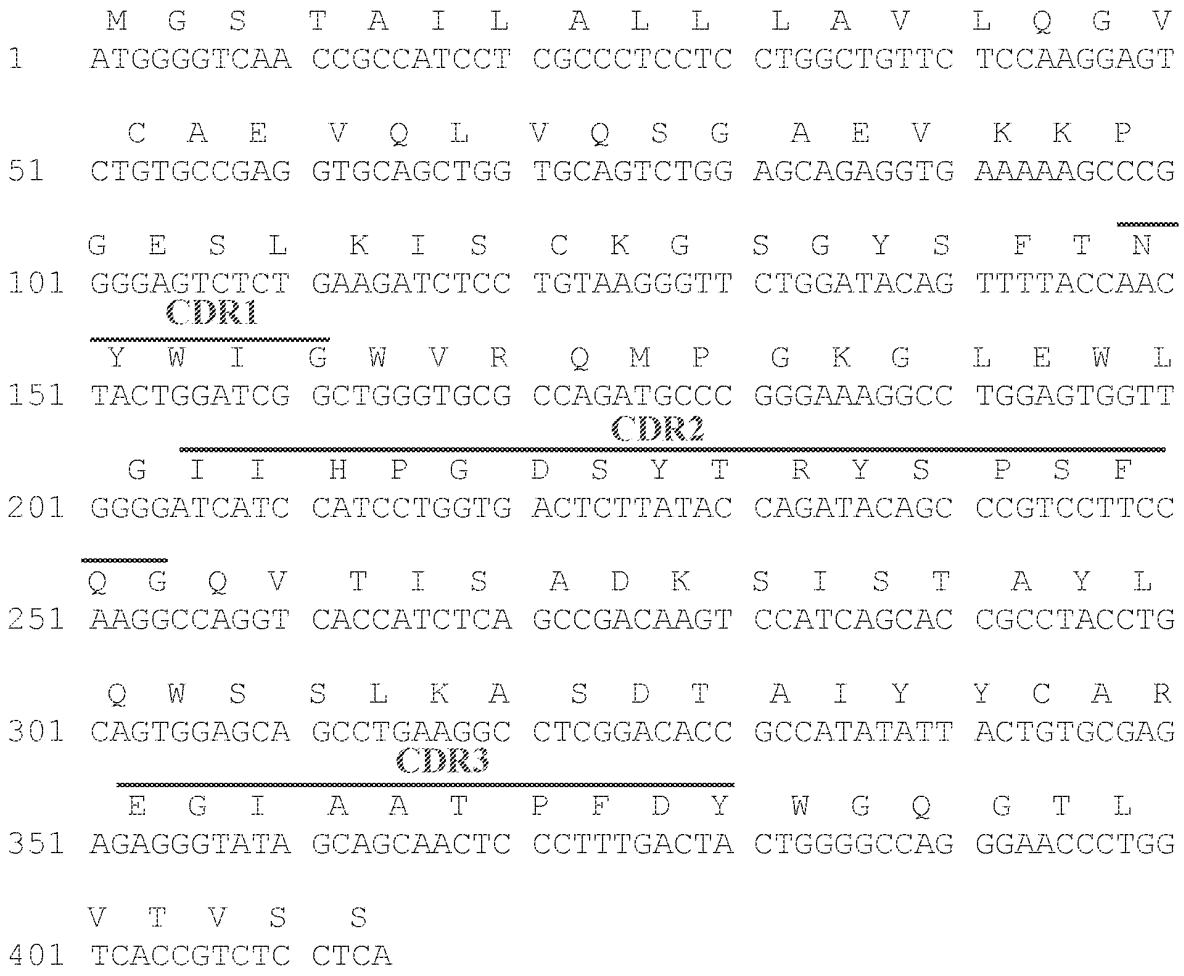


FIG. 3A – 24G11-MICA.54 VH1

	Família	LOCUS	RF	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VH5	5-51	HC2,pVx6		DP-73/V5-51...+
Segmento D	D6	6-13	2		D6-13/DN1
Segmento J	JH4	4			JH4b
Entrada	24G11.A10.E1-VH1				

5-51	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
								_CDR1_____															
5-51	G	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				_CDR2_____																			
5-51	W	M	G	I	I	Y	P	G	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T
Entrada	-	L	-	-	-	H	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-51	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
							_CDR3_____																
5-51	M	Y	Y	C	A	R																	
6-13								G	I	A	A												
JH4														F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
Entrada	I	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	T	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JH4	T	V	S	S																			
Entrada	-	-	-	-																			

FIG. 3B – 24G11-MICA.54 VH1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 24/514

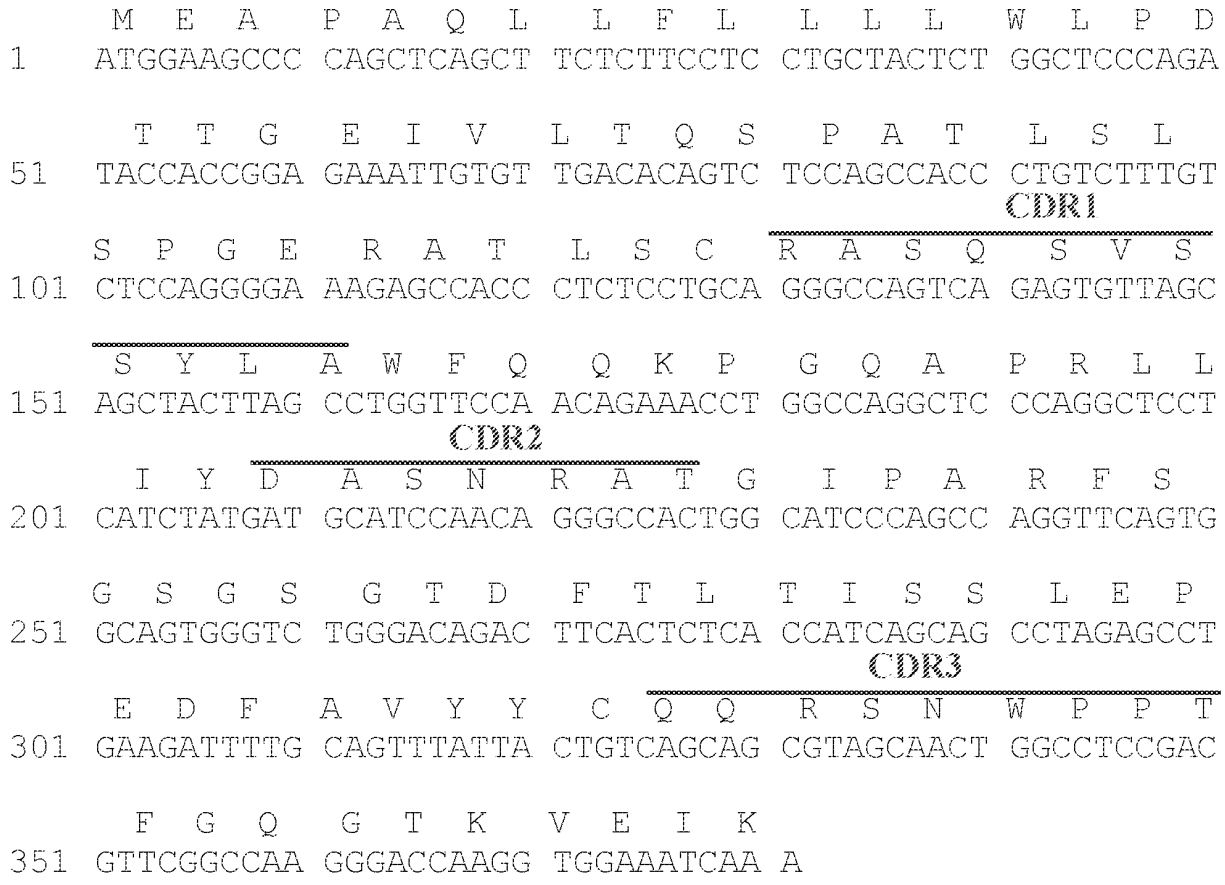


FIG. 3C – 24G11-MICA.54 VK1

	Família	LOCUS	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VK3	L6		Vg/38K...+
Segmento J	JK1	1		JK1
Entrada	24G11.A10.E1-VK1			

L6	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	_CDR1_____																						
L6	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				_CDR2_____																			
L6	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																				_CDR3_____			
L6	D	F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	R	S
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	_____																						
L6	N	W																					
JK1					T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
Entrada	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								

FIG. 3D – 24G11-MICA.54 VK1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 26/514

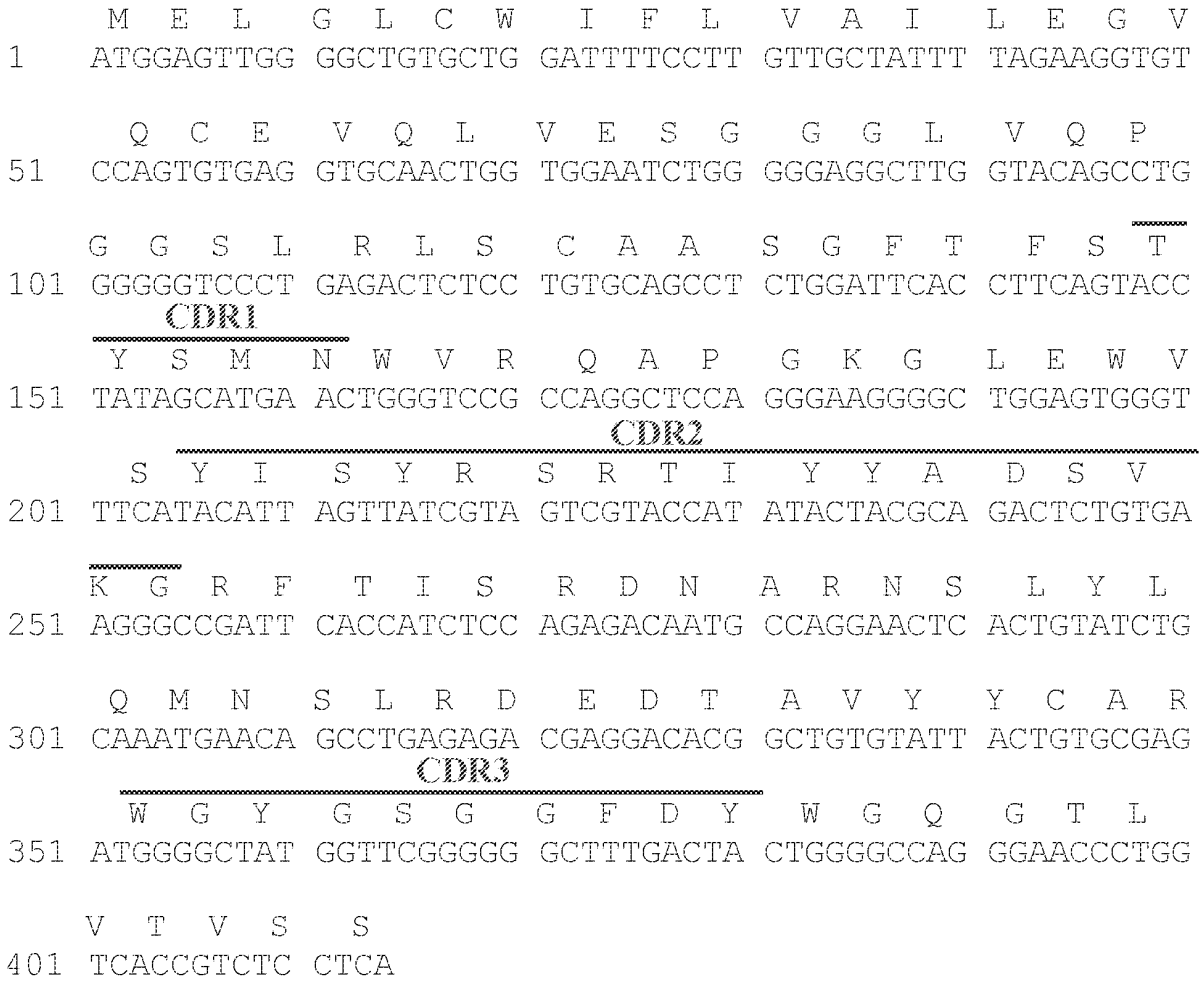


FIG. 4A – 3F5-MICA.2 VH1

CDR1
CDR2
CDR3
3-48 Linha germinativa E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W
3F5 VH - - -

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 28/514

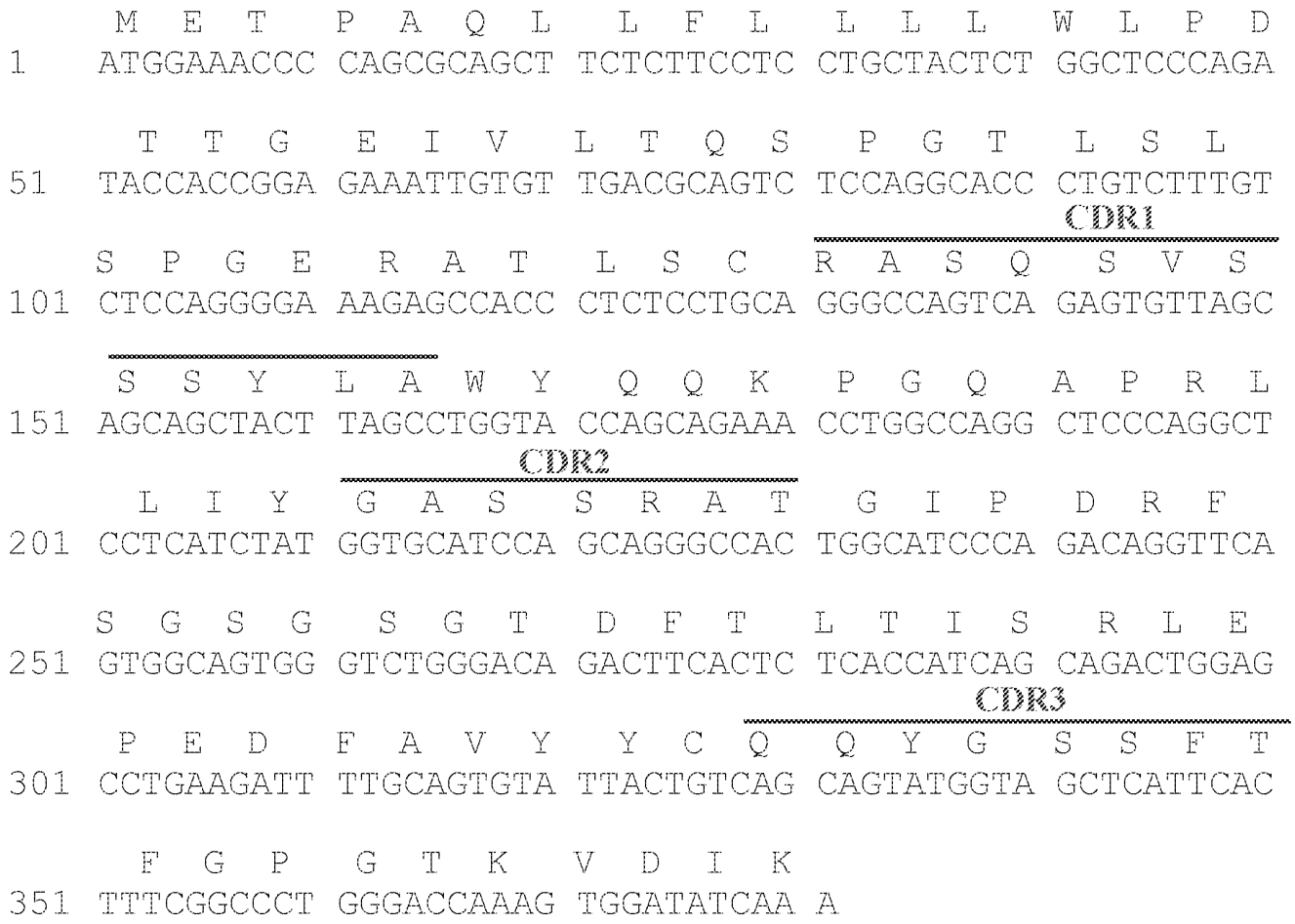


FIG. 4C – 3F5-MICA.2 VK1

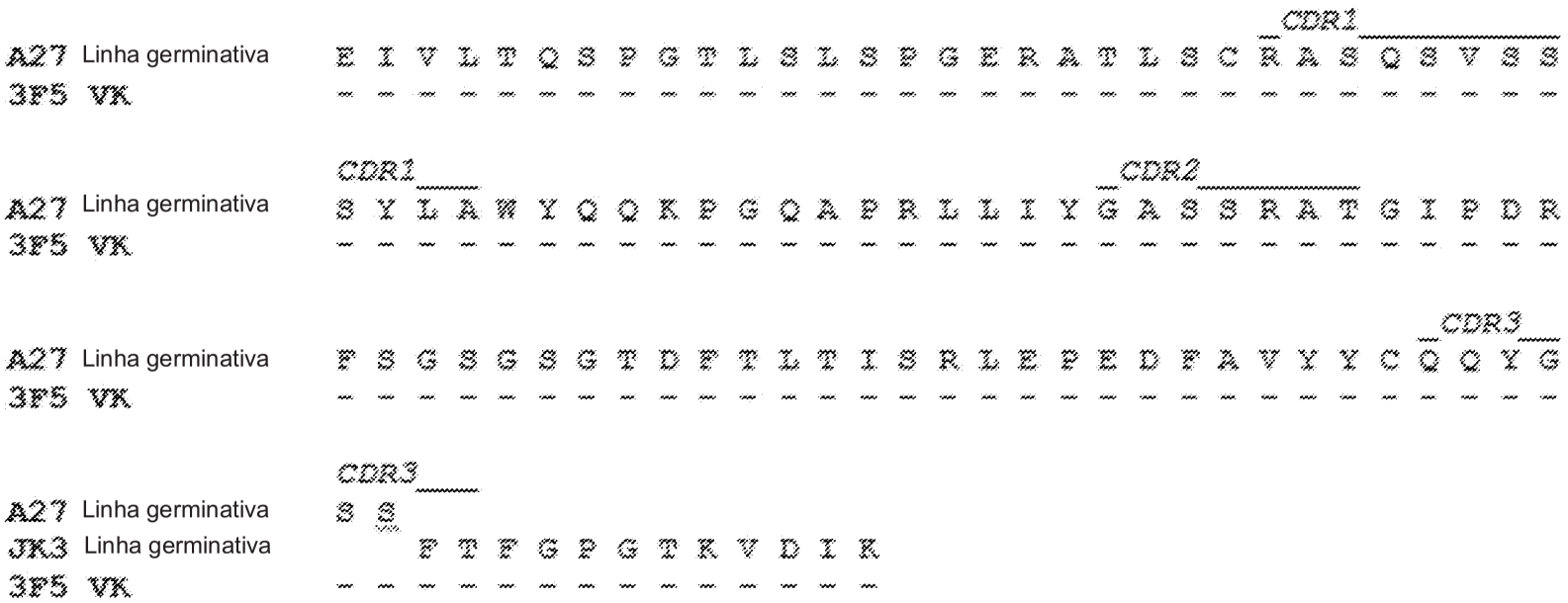


FIG. 4D – 3F5-MICA.2 VK1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 30/514

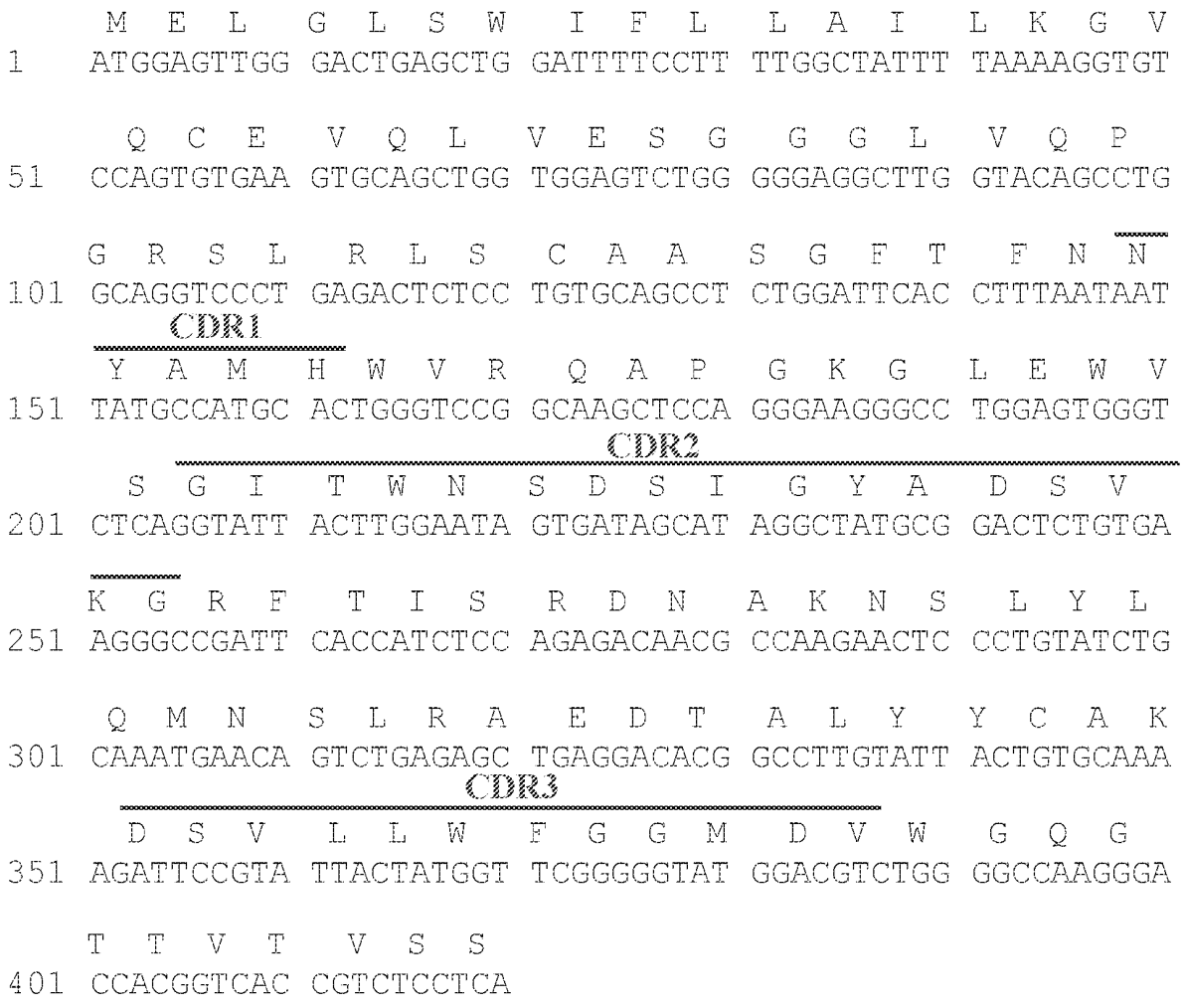


FIG. 5A – 71C2 VH1

	Família		LOCUS	RF	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VH3	3-09				DP-31/V3-9P...+
Segmento D	D3	3-10	1			D3-10/DXP'1
Segmento J	JH6	6				JH6b
Entrada	71C2.D4.C4-VH1					

3-09	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
									_CDR1_____														
3-09	A	S	G	F	T	F	D	D	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
Entrada	-	-	-	-	-	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				_CDR2_____																			
3-09	W	V	S	G	I	S	W	N	S	G	S	I	G	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T
Entrada	-	-	-	-	-	T	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-09	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
							__CDR3_____																
3-09	L	Y	Y	C	A	K	D																
3-10									V	L	L	W	F	G									
JH6										L	L	L		Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-		W	F	G	-	-	-	-	-	-	-	-
JH6	T	T	V	T	V	S	S																
Entrada	-	-	-	-	-	-	-																

FIG. 5B – 71C2 VH1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 32/514

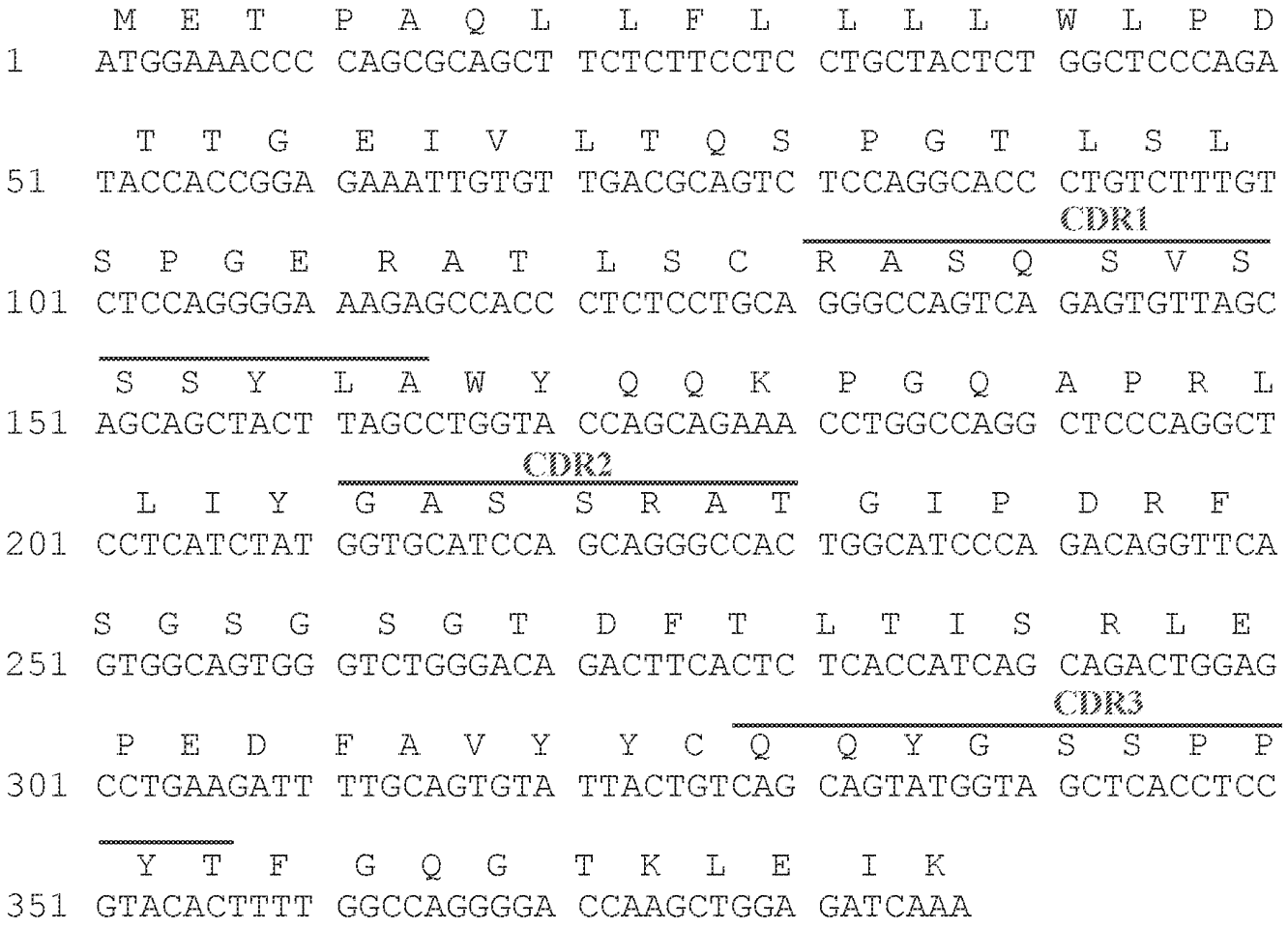


FIG. 5C – 71C2 VK1

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 33/514

	Família	LOCUS	TGL	VBASEENTRY
Segmento V	VK3	A27		DPK22/A27...+
Segmento J	JK2	2		JK2
Entrada	71C2.D4.C4-VK1			

A27	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	_CDR1_____																						
A27	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
					_CDR2_____																		
A27	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
																					_CDR3__		
A27	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y
Entrada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A27	G	S	S																				
JK2						Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K						
Entrada	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

FIG. 5D – 71C2 VK1

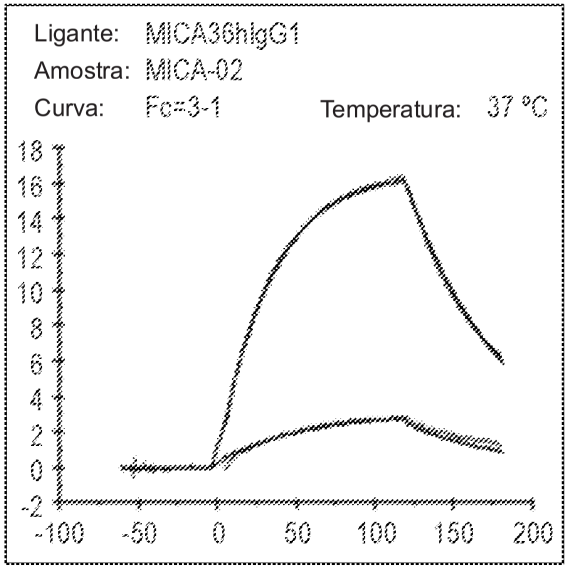


FIG. 6A

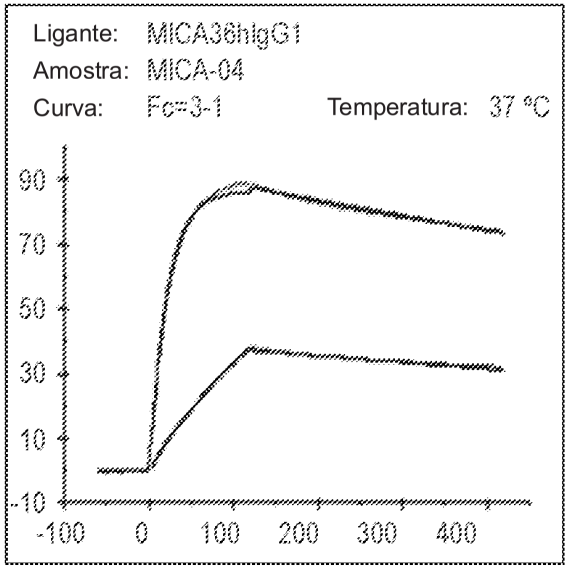


FIG. 6B

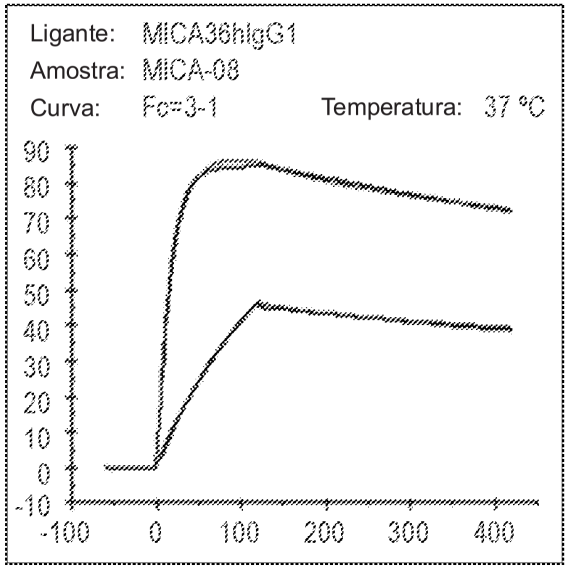


FIG. 6C

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 35/514

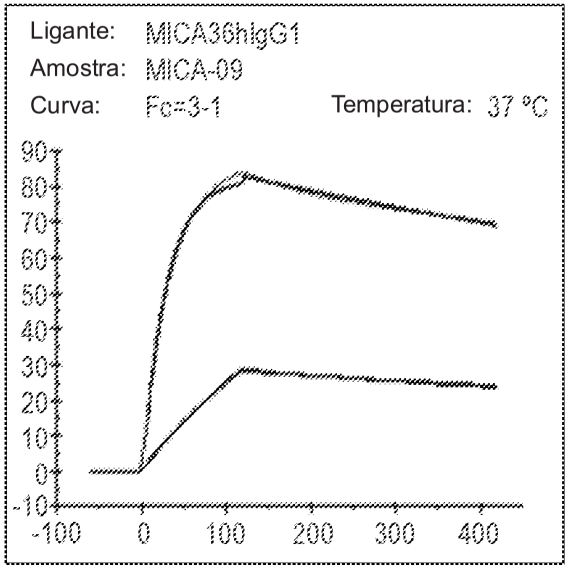


FIG. 6D

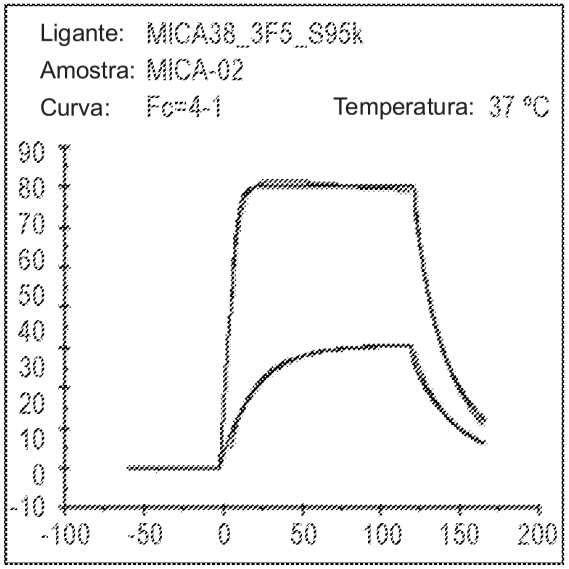


FIG. 6E

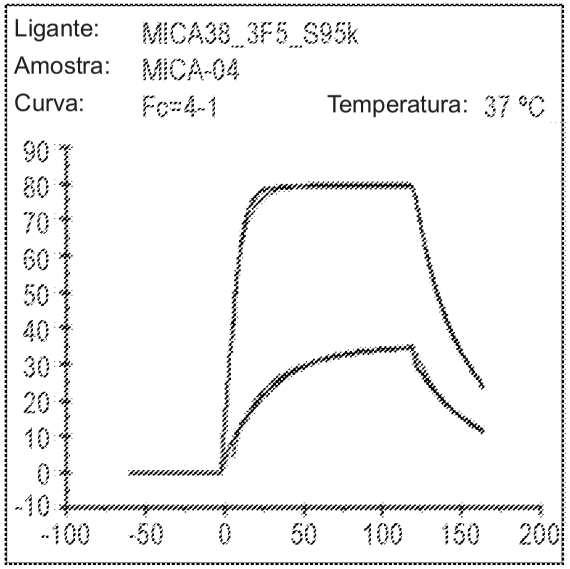


FIG. 6F

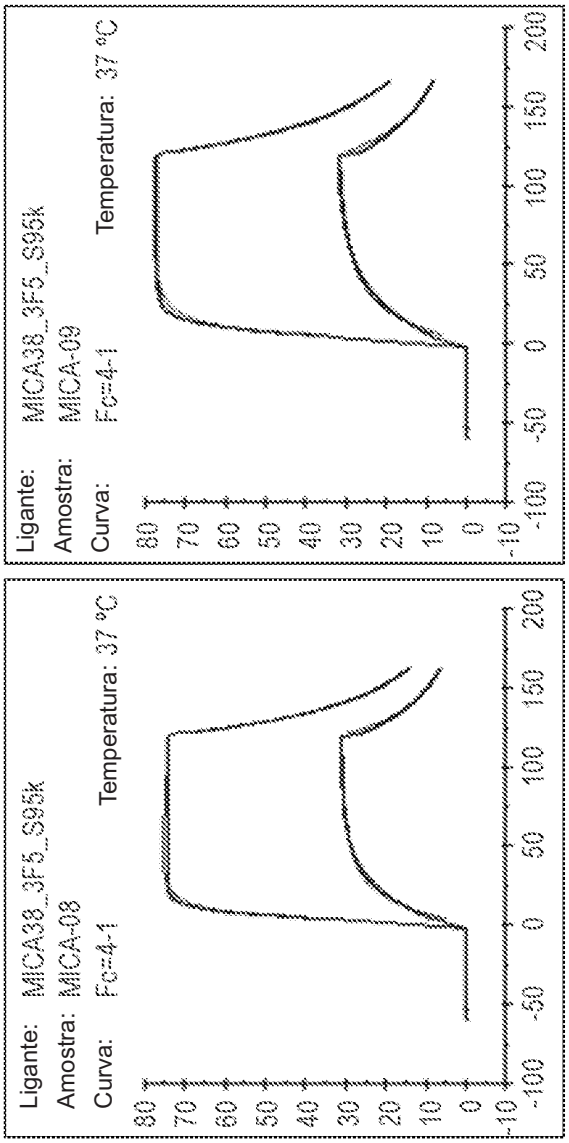

Ligante: MICA38_3F5_S95k
Amostra: MICA-08
Curva: Fc=4-1
Temperatura: 37 °C
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100
-50
0
50
100
150
200

FIG. 6G

Ligante: MICA38_3F5_S95k
Amostra: MICA-09
Curva: Fc=4-1
Temperatura: 37 °C
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100
-50
0
50
100
150
200

FIG. 6H

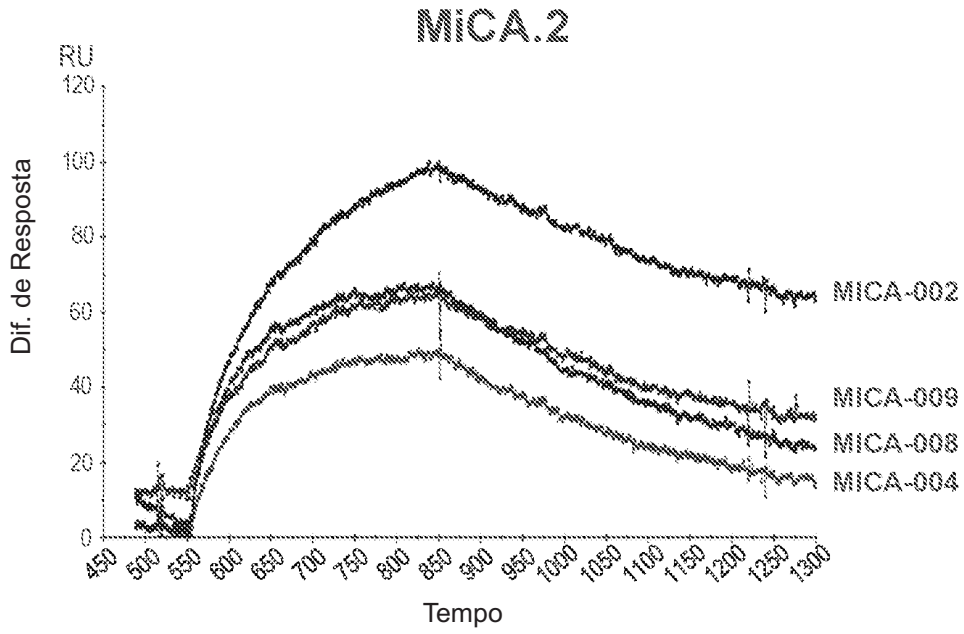

MICA.2
RU
120
100
80
60
40
20
0
Dif. de Resposta
MICA-002
MICA-009
MICA-008
MICA-004
450
500
550
600
650
700
750
800
850
900
950
1000
1050
1100
1150
1200
1250
1300
Tempo

FIG. 6I

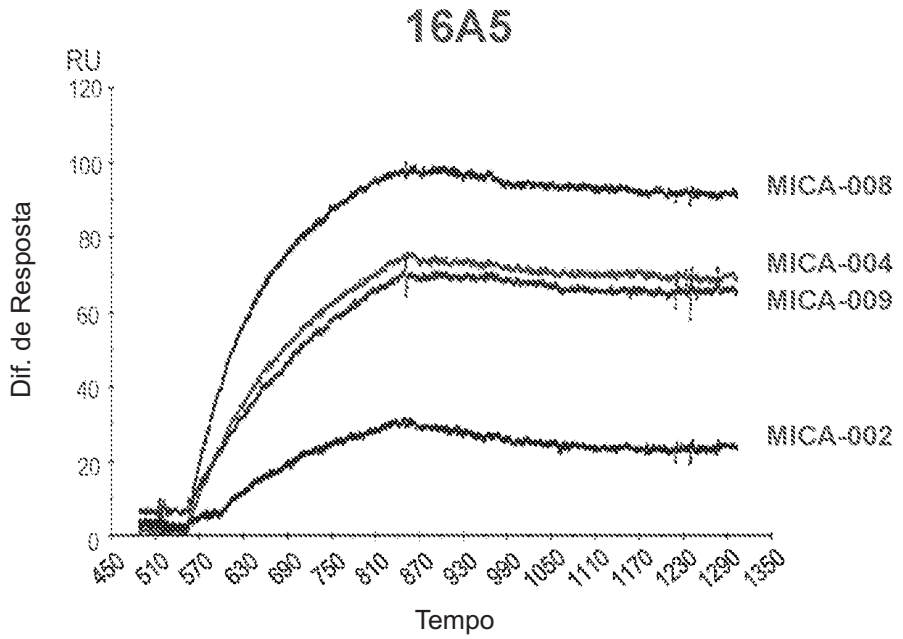

16A5
RU
120
100
80
60
40
20
0
Dif. de Resposta
MICA-008
MICA-004
MICA-009
MICA-002
450
510
570
630
690
750
810
870
930
990
1050
1110
1170
1230
1290
1350
Tempo

FIG. 6J

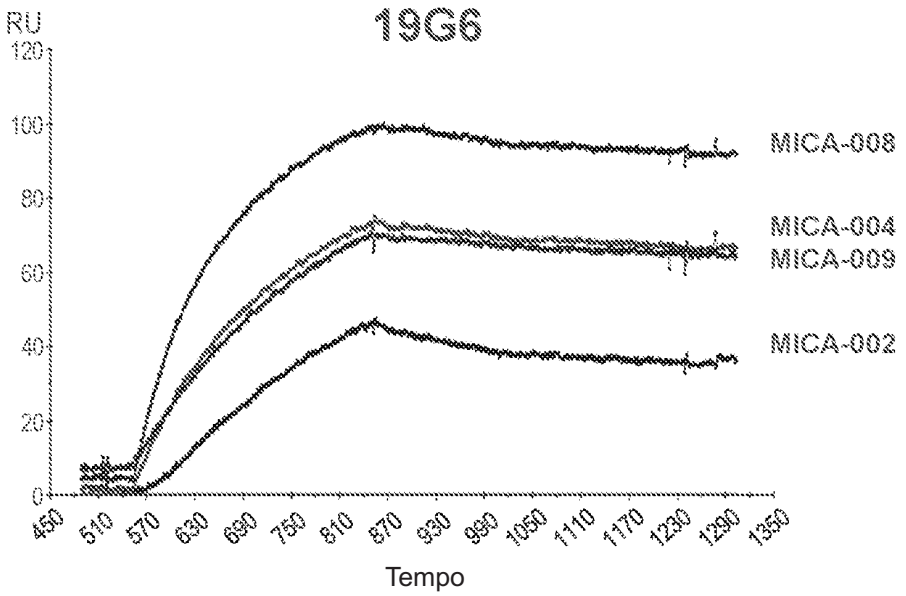

19G6
RU
120
100
80
60
40
20
0
450
510
570
630
690
750
810
870
930
990
1050
1110
1170
1230
1290
1350
Tempo
MICA-008
MICA-004
MICA-009
MICA-002

FIG. 6K

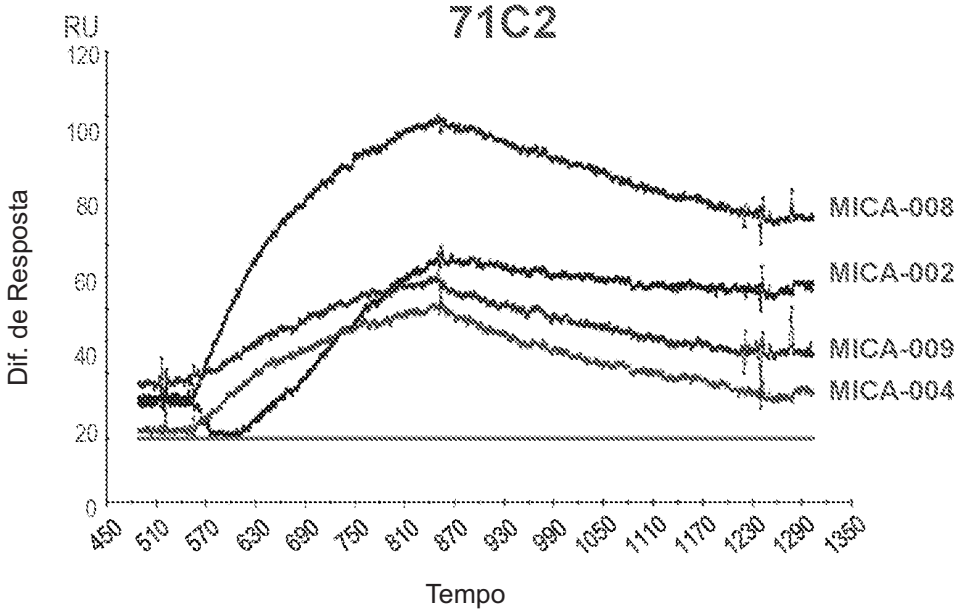

71C2
RU
120
100
80
60
40
20
0
Dif. de Resposta
450
510
570
630
690
750
810
870
930
990
1050
1110
1170
1230
1290
1350
Tempo
MICA-008
MICA-002
MICA-009
MICA-004

FIG. 6L

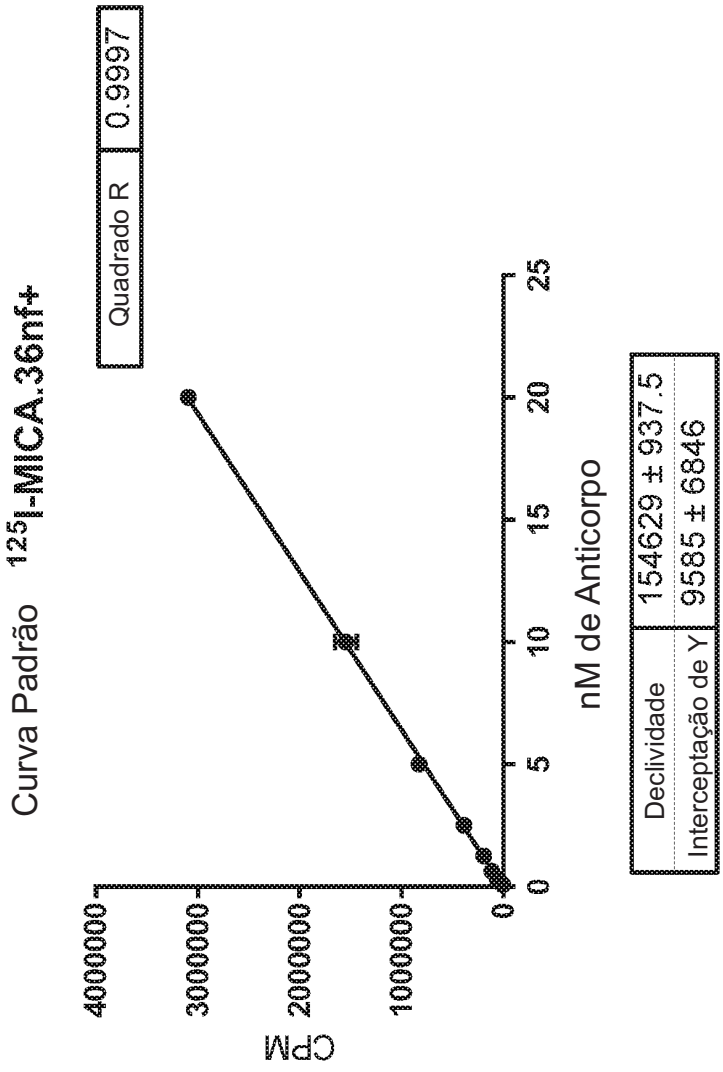
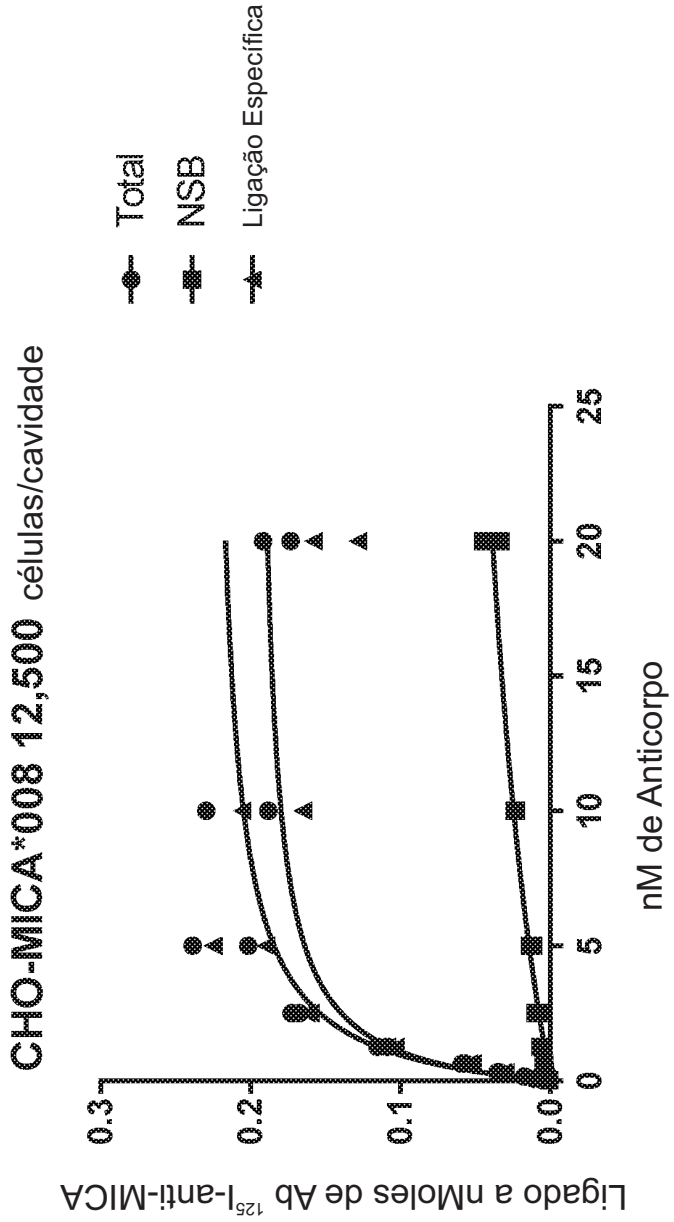

Curva Padrão ^{125}I-MICA.36nf+
Quadrado R 0.9997
CPM
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0
5
10
15
20
25
nM de Anticorpo
Declividade 154629 ± 937.5
Interceptação de Y 9585 ± 6846
y = mX + b
y = 154629(1nM) + 9585
y = 164214
1nM Ab = 164214 cpm

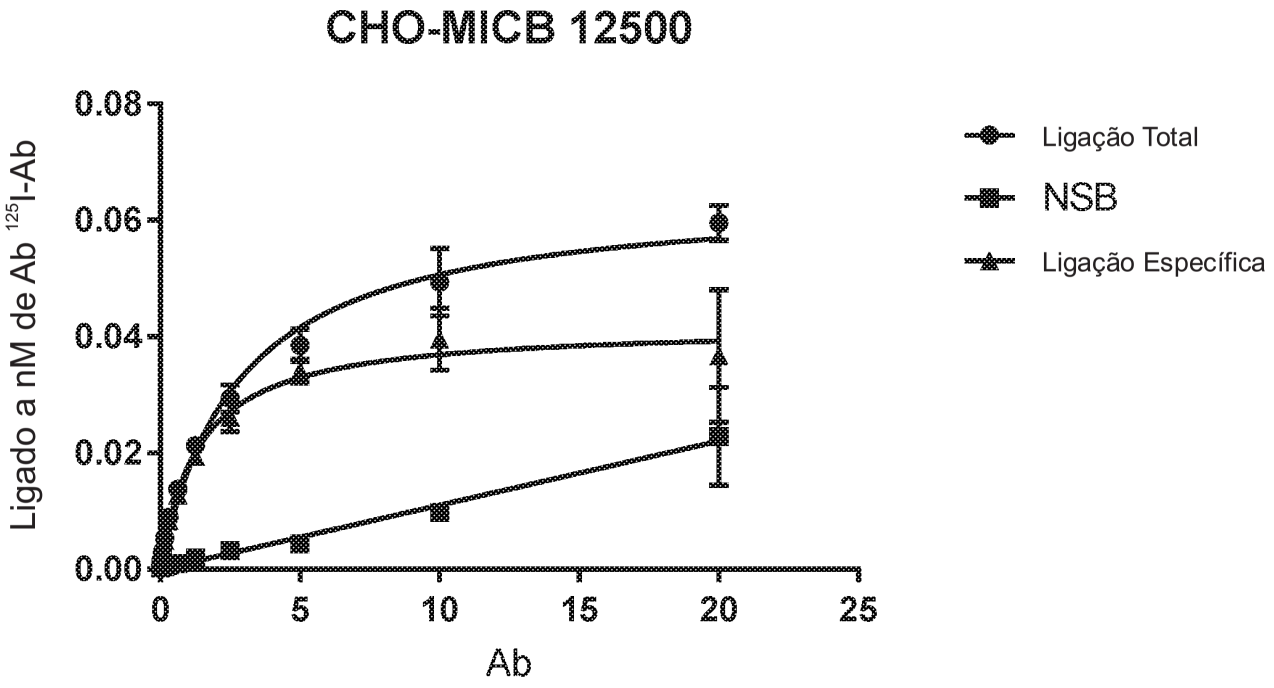
FIG. 7A



	Total	NSB	Ligação Específica
Bmax	0.2304	0.08932	0.1991
Kd	1.241	26.06	1.066

1.5e6 receptores por célula

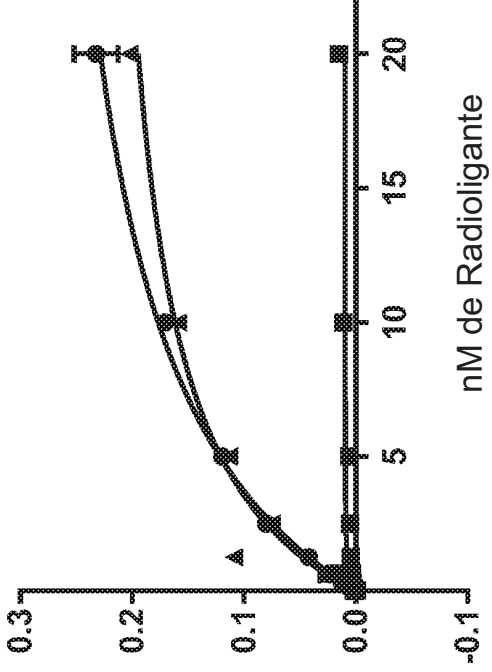
FIG. 7B



	Ligação Total	NSB	Ligação Específica
Bmax	0.06481	~ 24544441154507	0.04191
Kd	2.799	~ 2.226e+015	1.361

0.2e6 receptores por célula

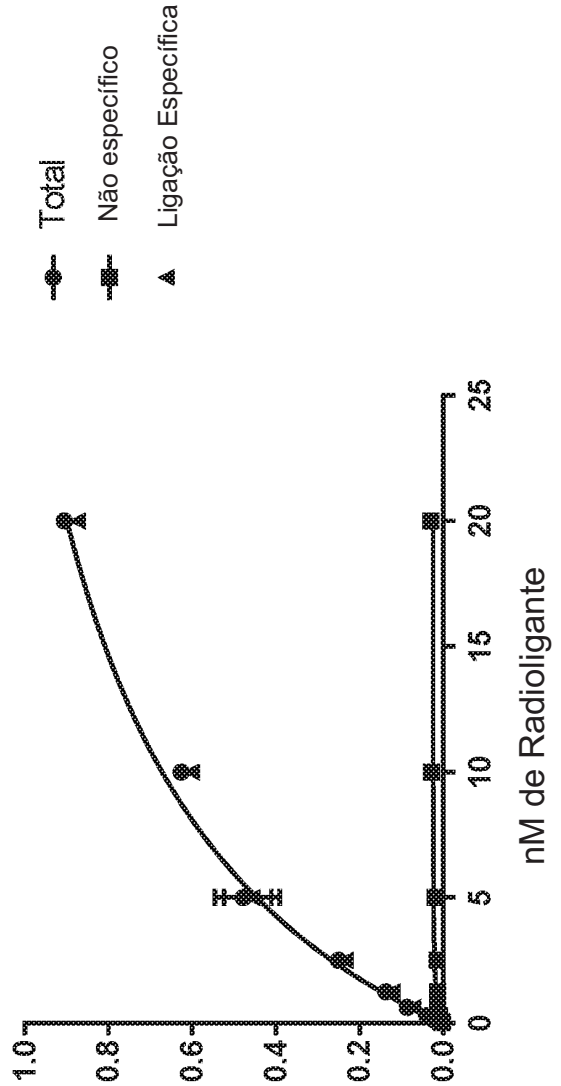
FIG. 7C



	Total	Não específico	Ligação Específica
Bmax	0.3233	0.009976	0.2448
Kd	8.272	0.2264	5.123

587,520 receptores/célula

FIG. 7D

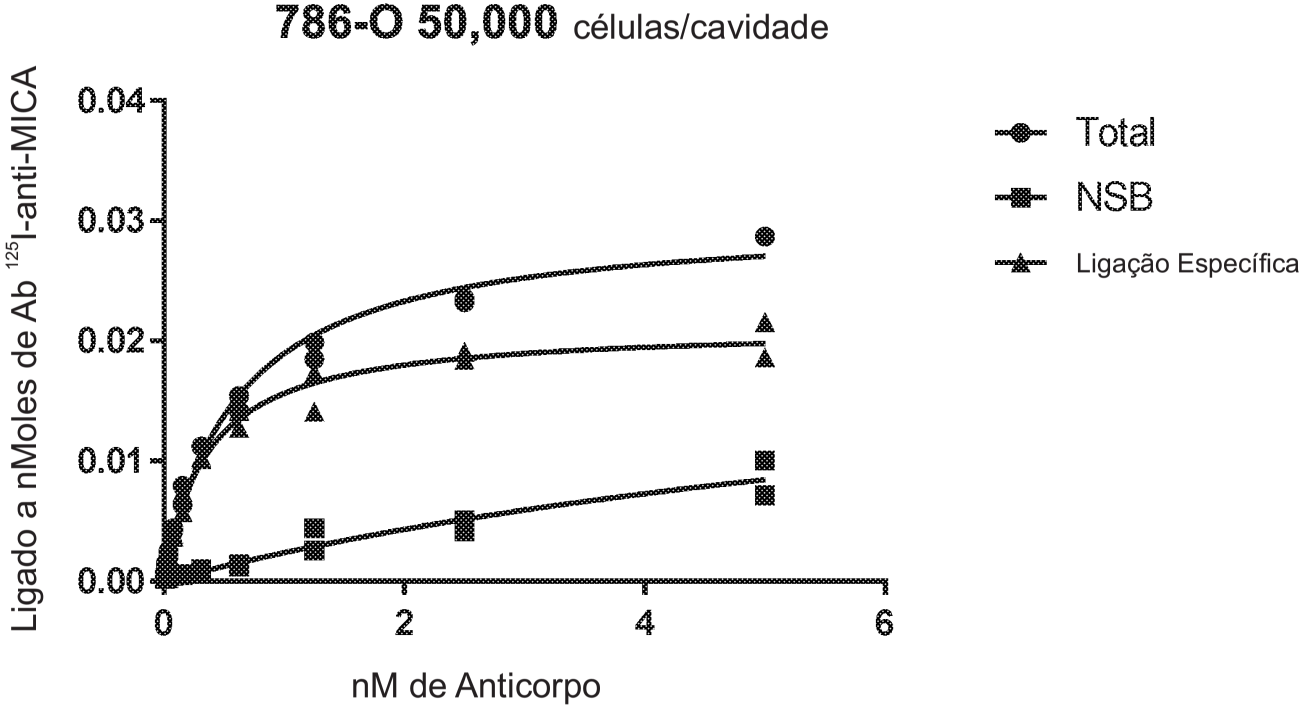


	Total	Não específico	Ligação Específica
Bmax	1.361	0.02652	1.353
Kd	10.25	0.5731	11.04

3.25e6 receptores/célula

FIG. 7E

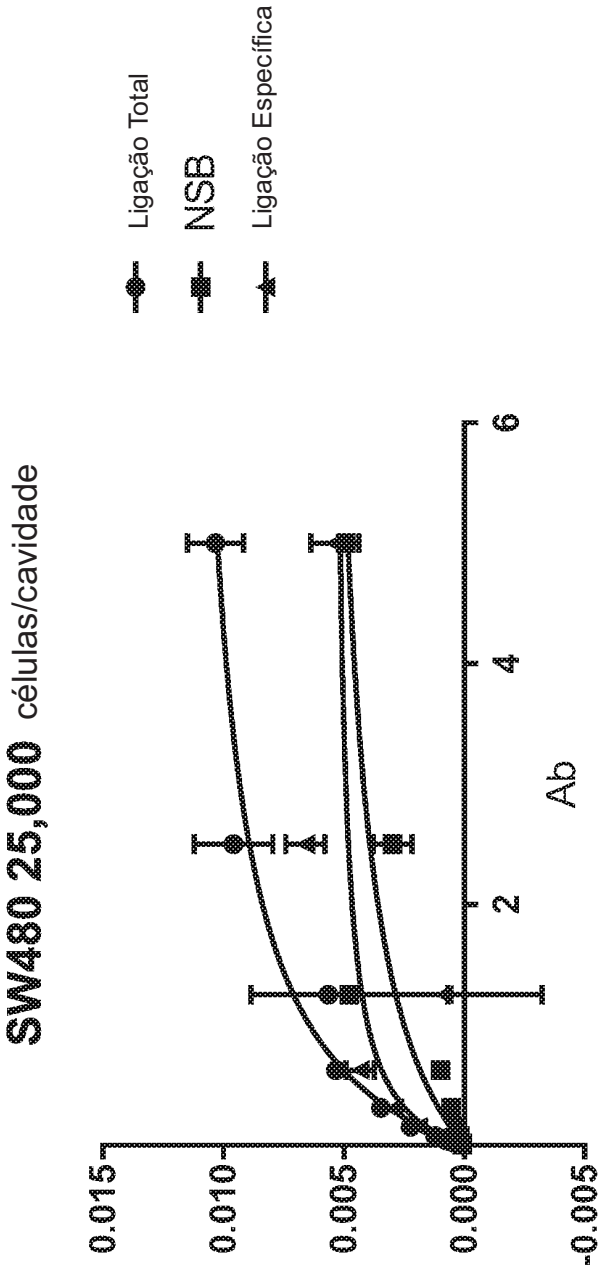
Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 44/514



	Total	NSB	Ligação Específica
Bmax	0.03029	0.02339	0.0212
Kd	0.5996	8.829	0.3564

25,440 receptores por célula

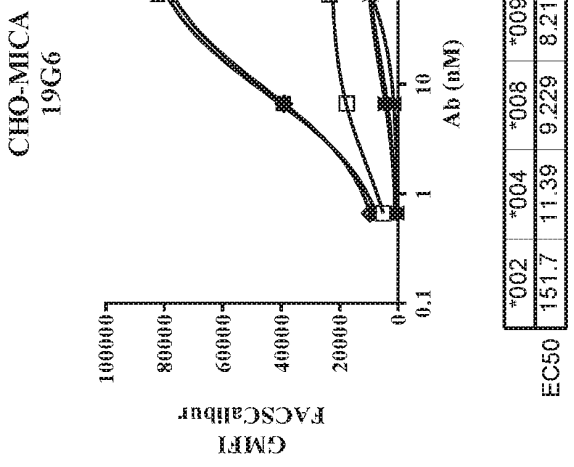
FIG. 7F



	Ligação Total	NSB	Ligação Específica
Bmax	0.01205	0.006298	0.005568
Kd	0.8713	1.506	0.3852

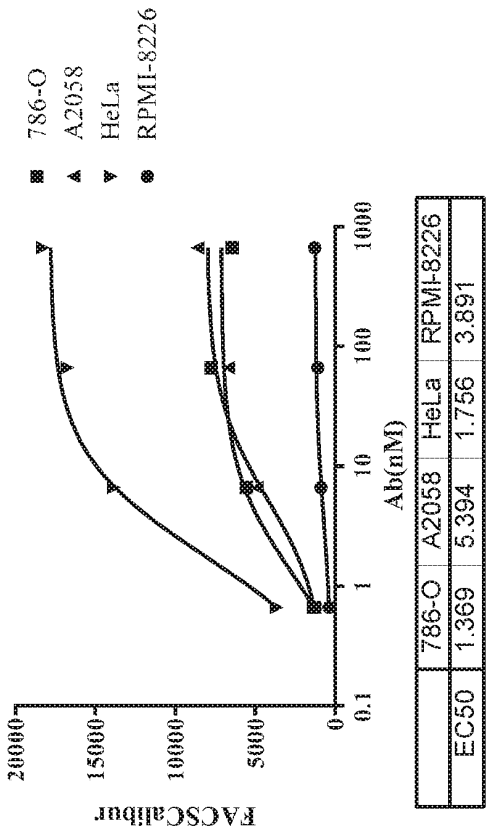
13,200 receptores por célula

FIG. 7G



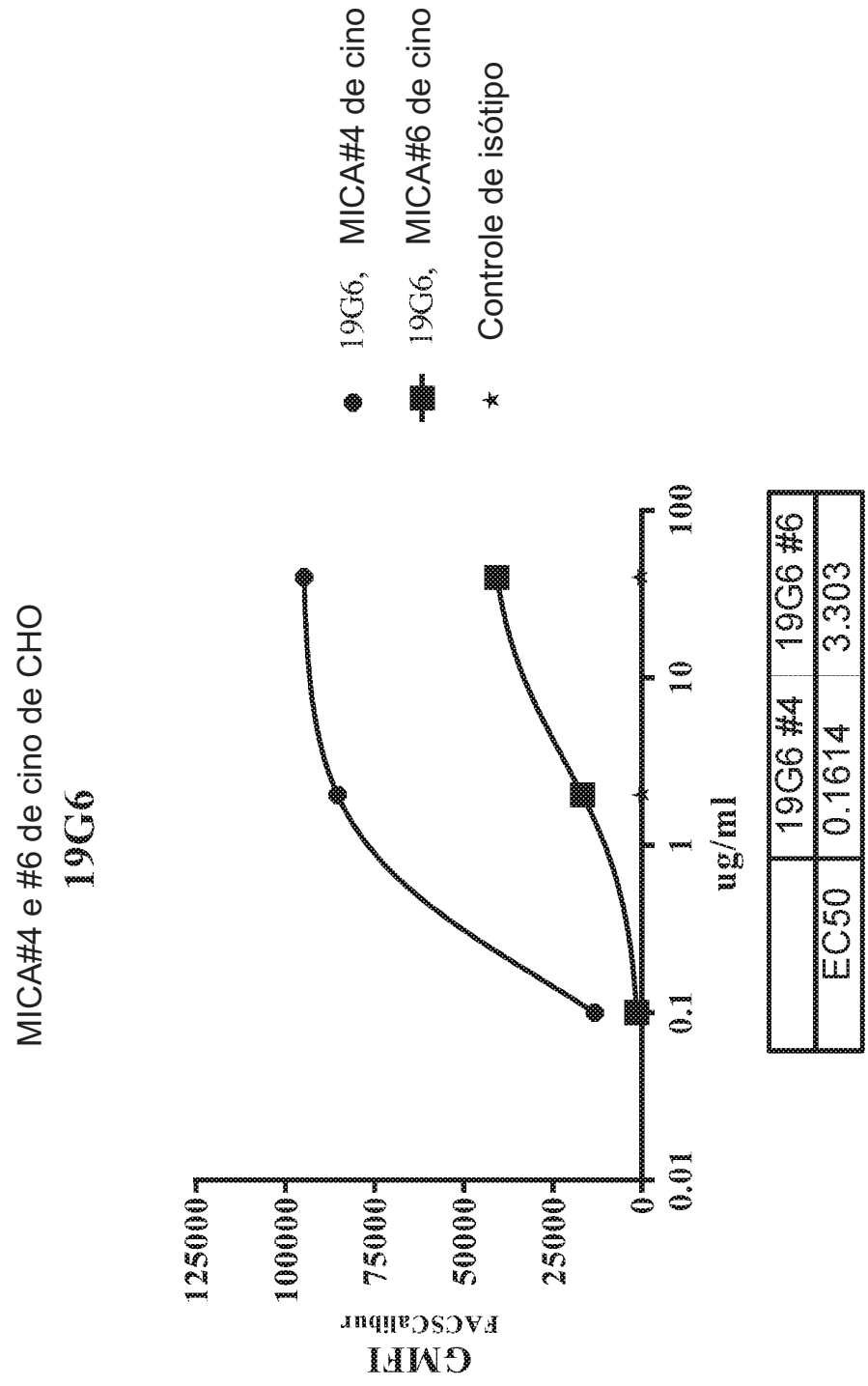
EC50	*002	*004	*008	*009	*010	MCB
	151.7	11.39	9.229	8.21	18.48	1.826

FIG. 8A



	786-O	A2058	HeLa	RPMI-8226
EC50	1.369	5.394	1.756	3.891

FIG. 8B



	19G6 #4	19G6 #6
EC50	0.1614	3.303

FIG. 8C

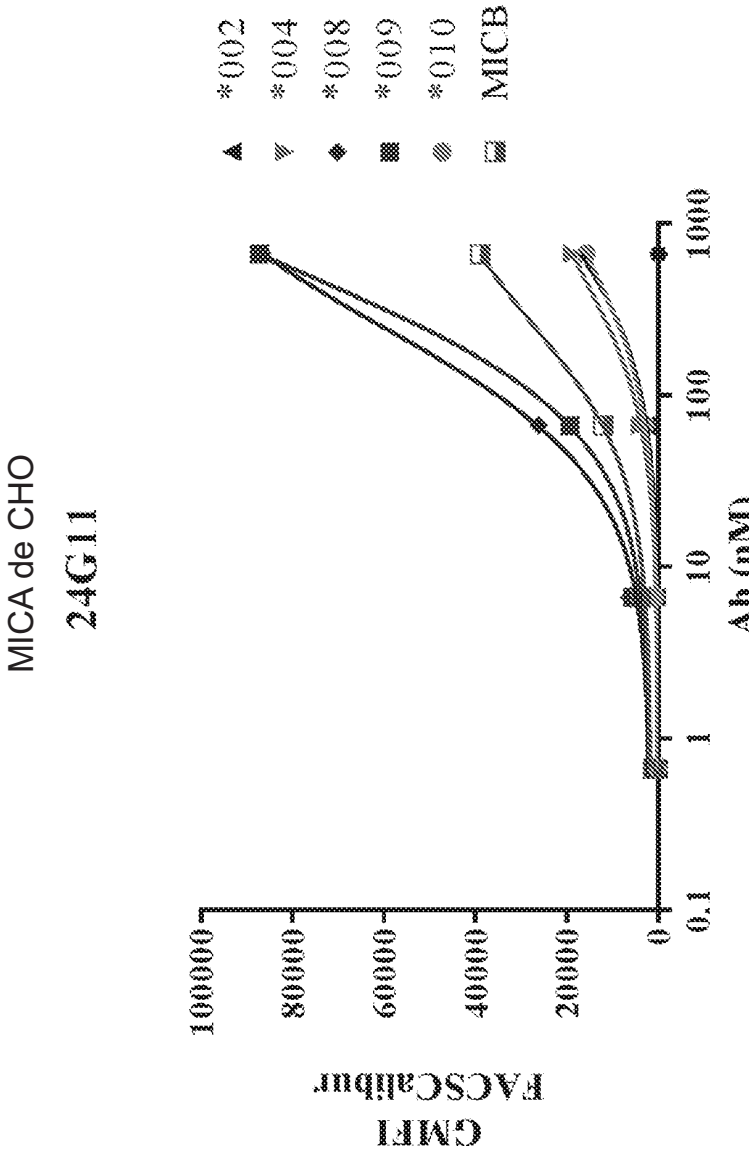

MICA de CHO
24G11
*002
*004
*008
*009
*010
MICB
GMFI
FACSCalibur
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8D

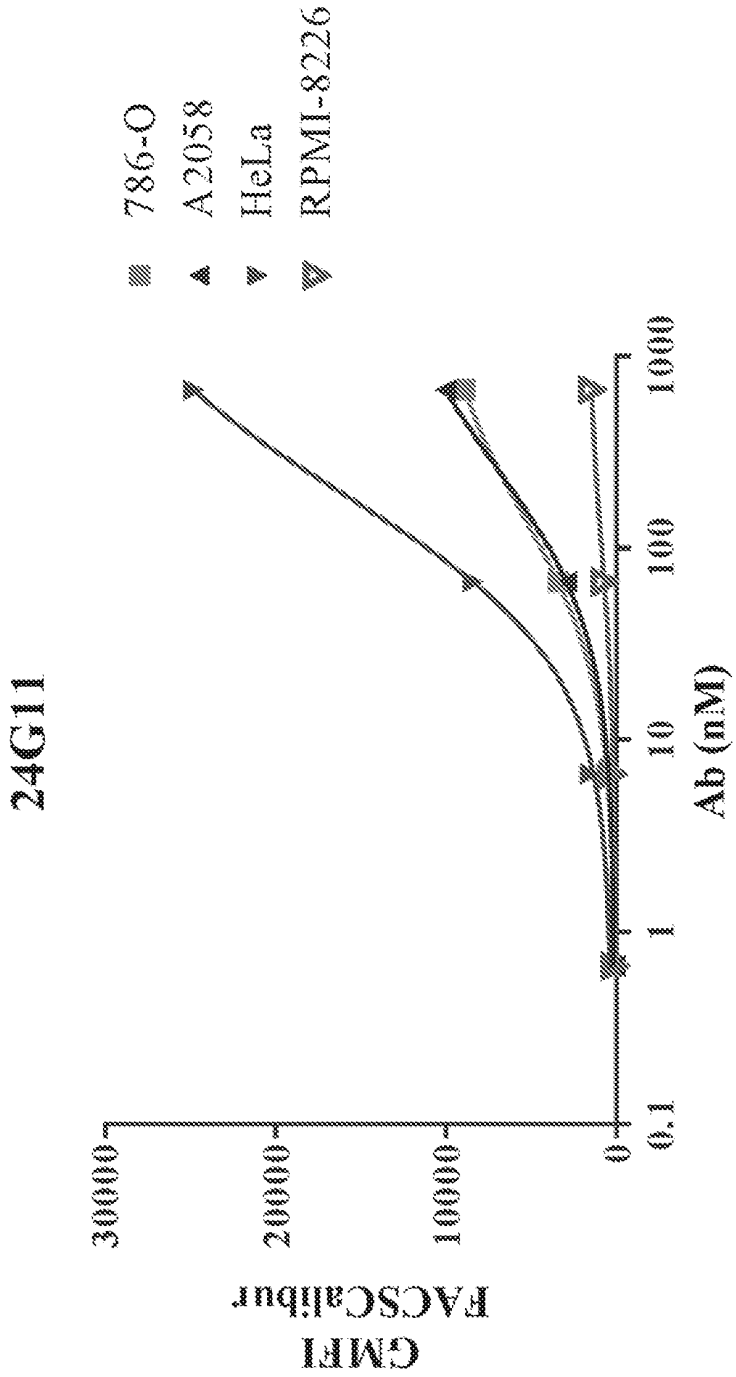

24G11
786-O
A2058
HeLa
RPMI-8226
CMFI
FACSCalibur
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8E

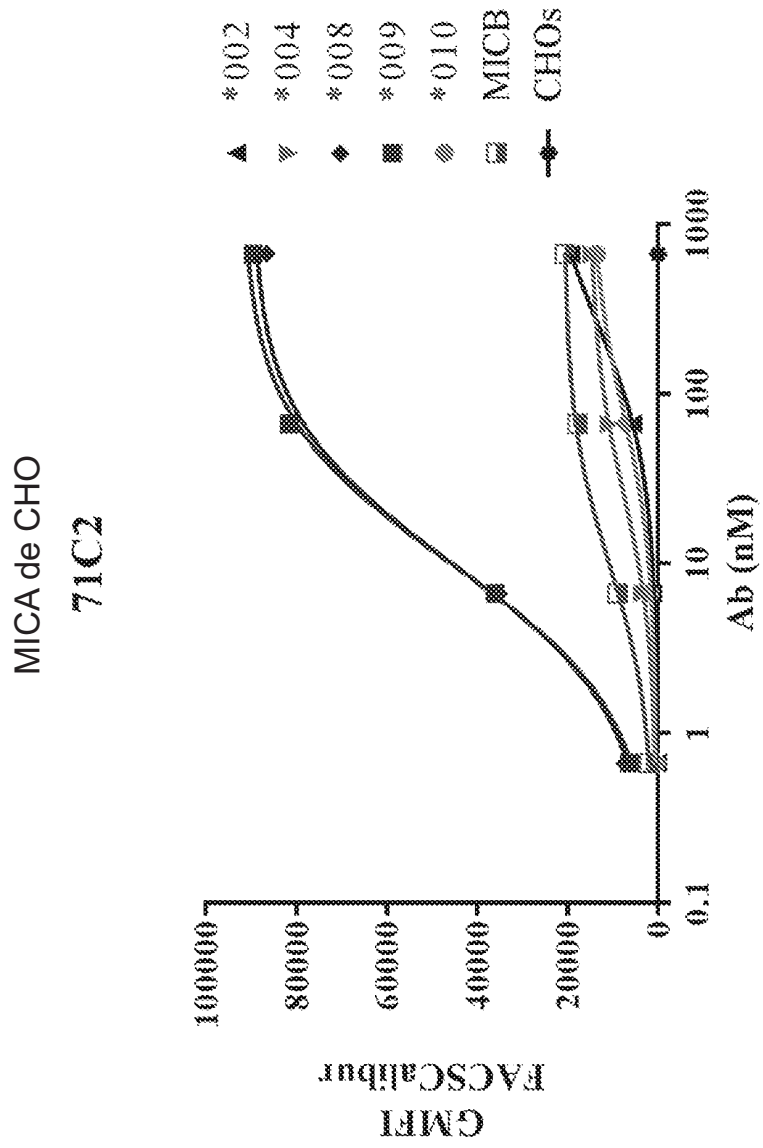

MICA de CHO
71C2
GMFI
FACSCalibur
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)
*002
*004
*008
*009
*010
MICB
CHOs

FIG. 8F

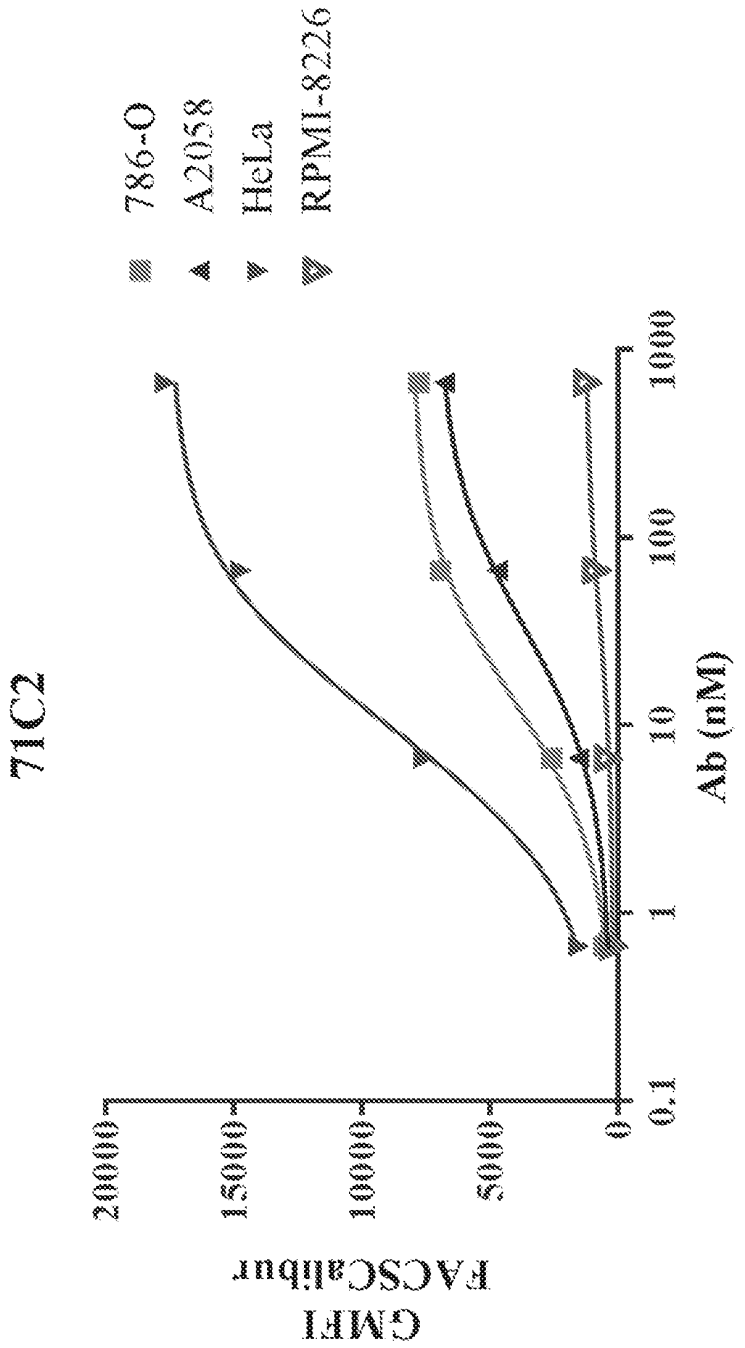

71C2
786-O
A2058
HeLa
RPMI-8226
GMFI
FACSCalibur
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8G

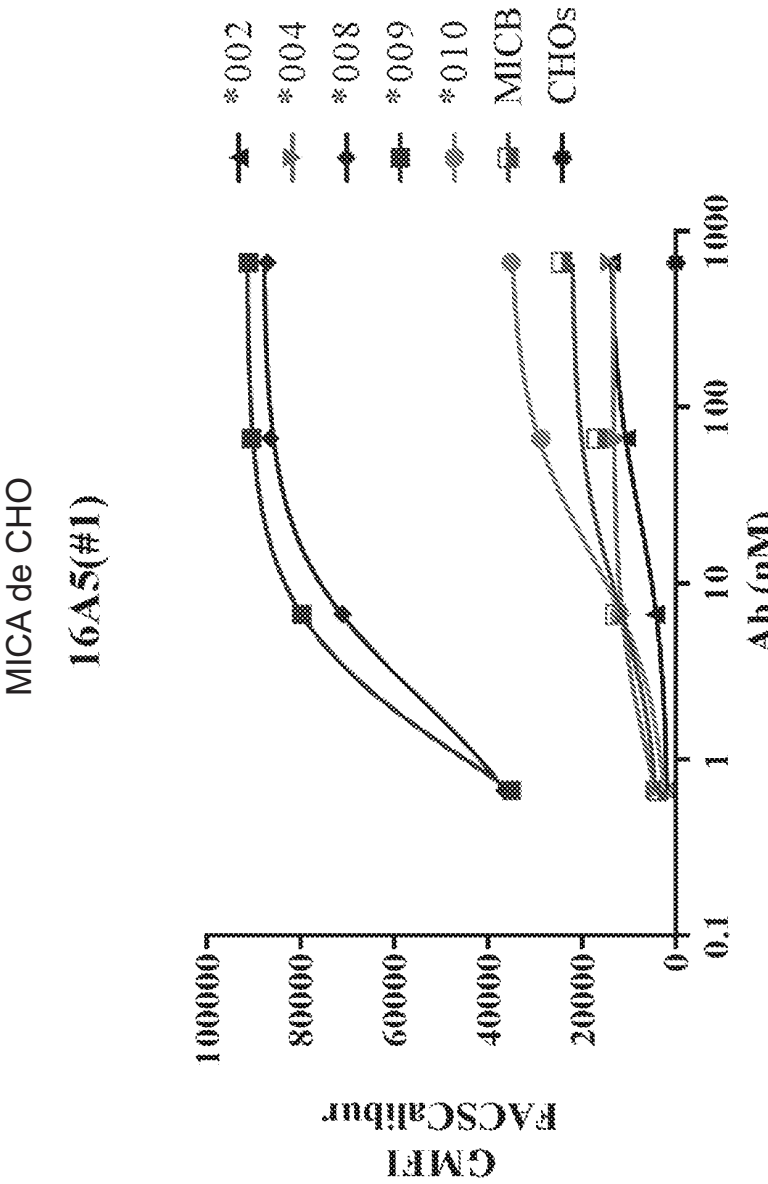

MICA de CHO
16A5(#1)
GMFI
FACSCalibur
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)
*002
*004
*008
*009
*010
MICB
CHOs

FIG. 8H

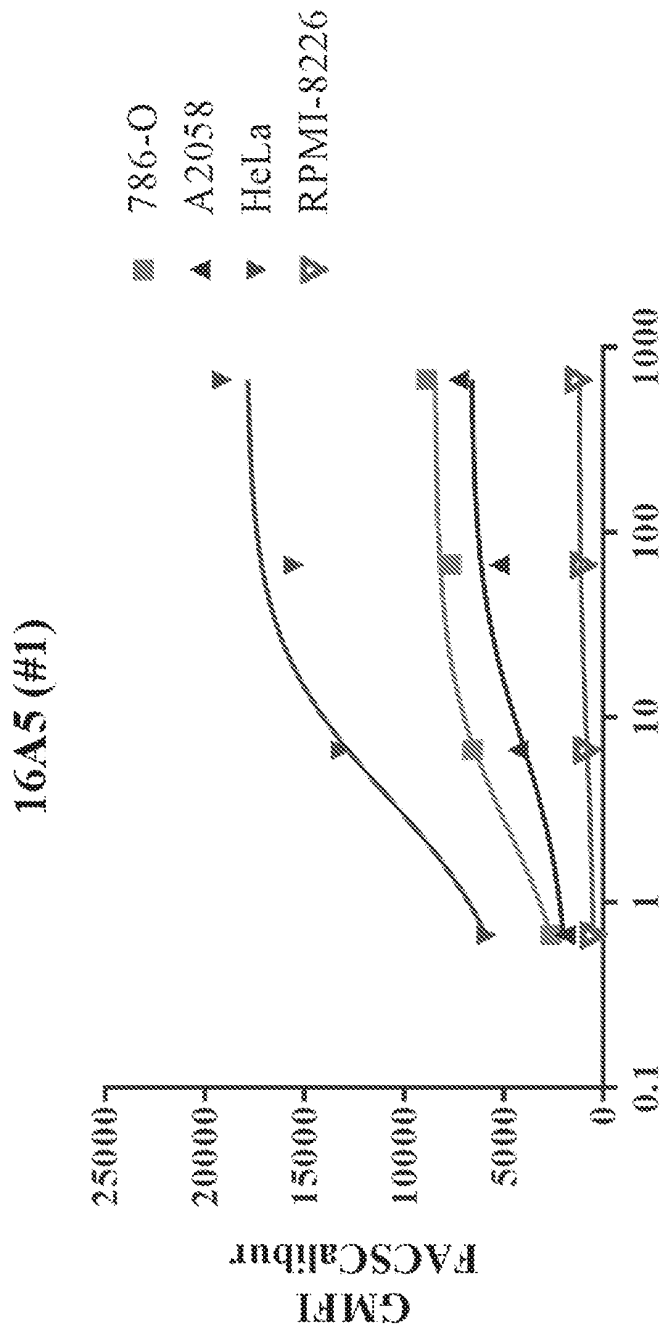

16A5 (#1)
786-O
A2058
HeLa
RPMI-8226
GMFI
FACSCalibur
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8I

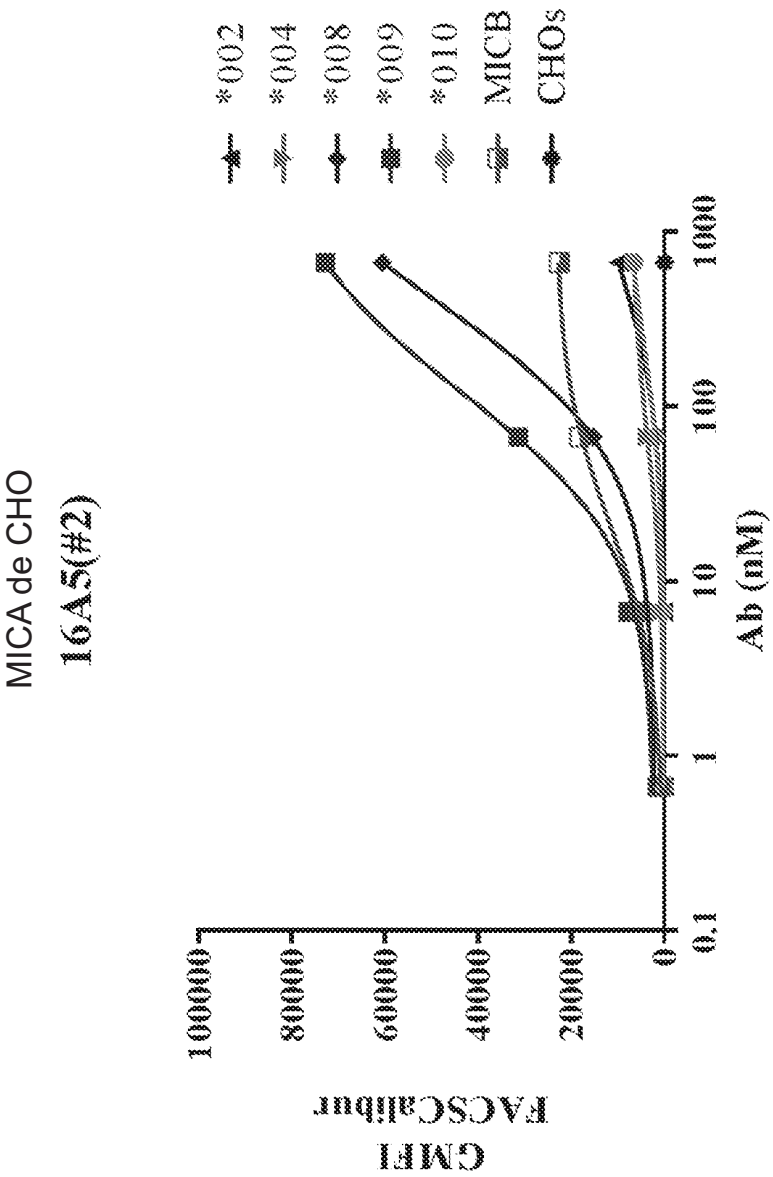

MICA de CHO
16A5(#2)
*002
*004
*008
*009
*010
MICB
CHOs
GMFI
FACSCalibur
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8J

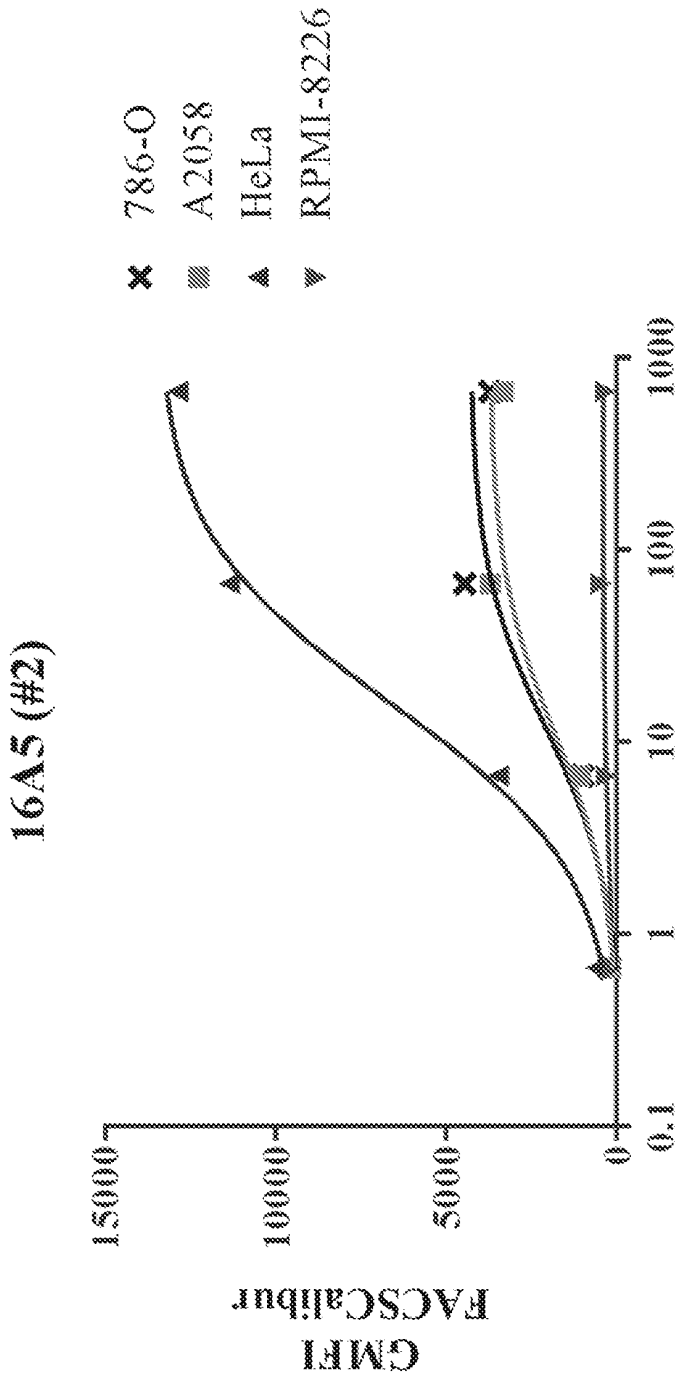

16A5 (#2)
786-O
A2058
HeLa
RPMI-8226
GMFI
FACSCalibur
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8K

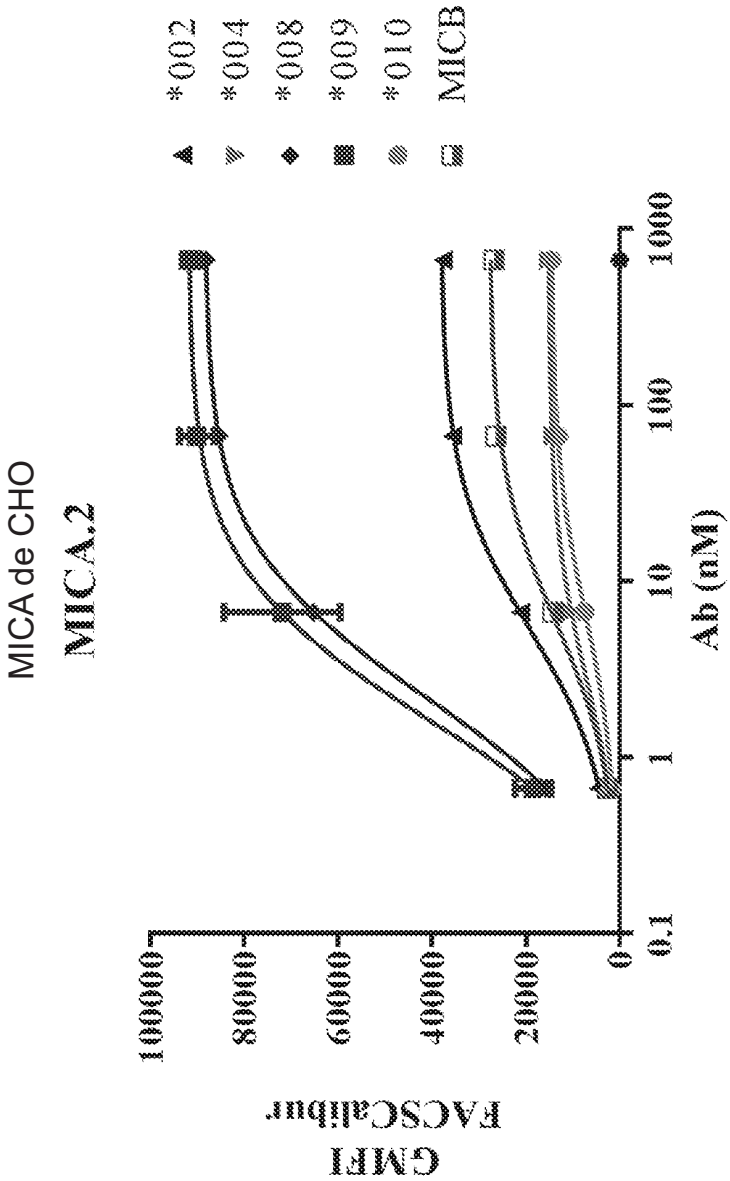

MICA de CHO
MICA.2
*002
*004
*008
*009
*010
MICB
GMFI
FACSCalibur
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)

FIG. 8L

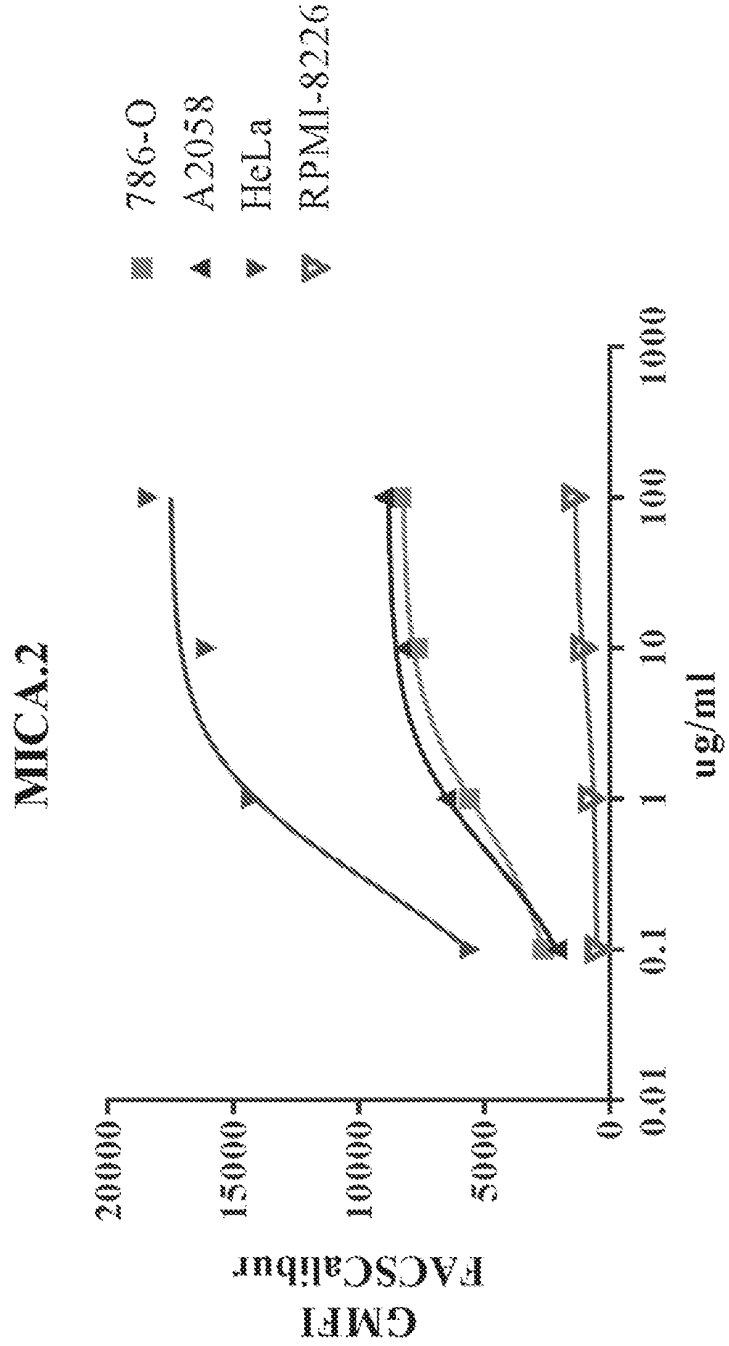

MICA.2
786-O
A2058
HeLa
RPMI-8226
GMFI
FACSCalibur
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
ug/ml

FIG. 8M

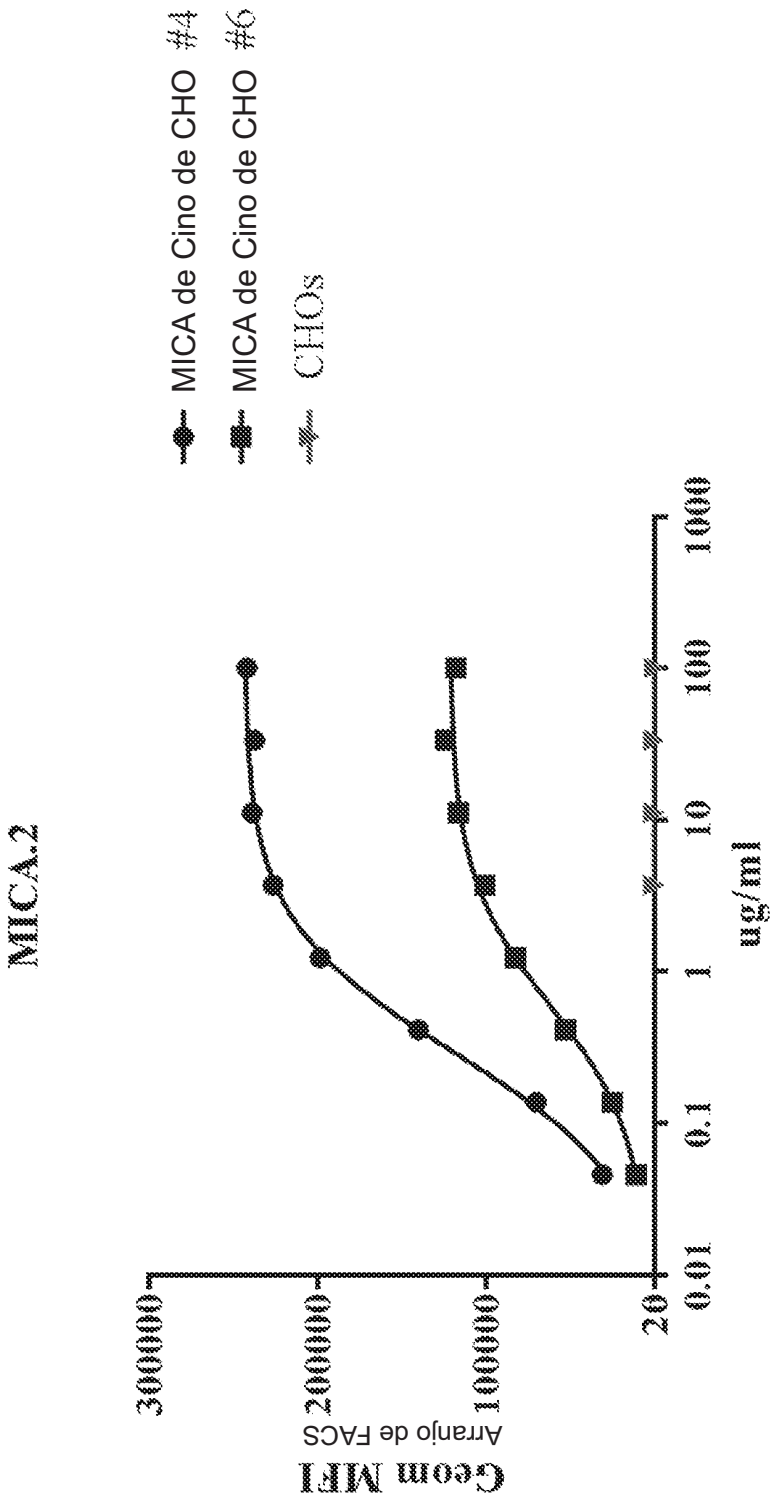

MICA.2
MICA de Cino de CHO #4
MICA de Cino de CHO #6
CHOs
Geom MFI
Arranjo de FACS
300000
200000
100000
20
0.01
0.1
1
10
100
1000
ug/ml

FIG. 8N

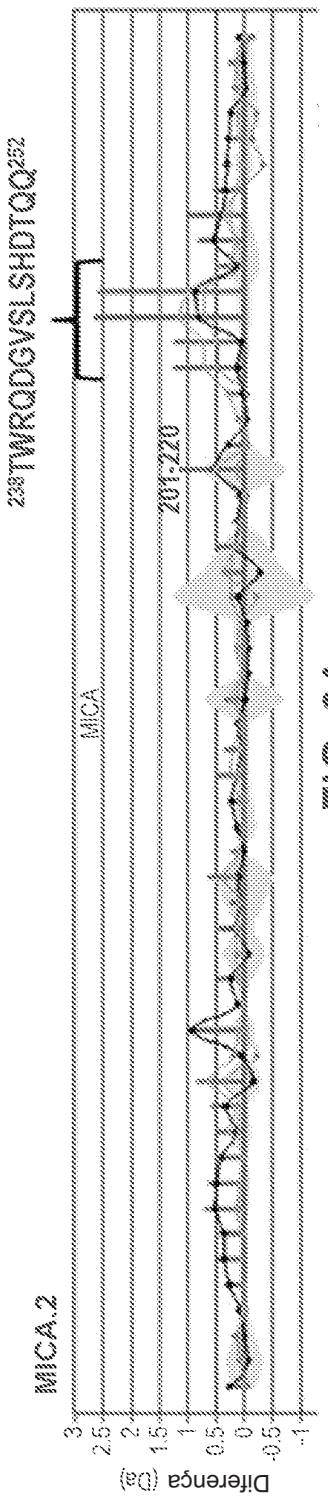


FIG. 9A

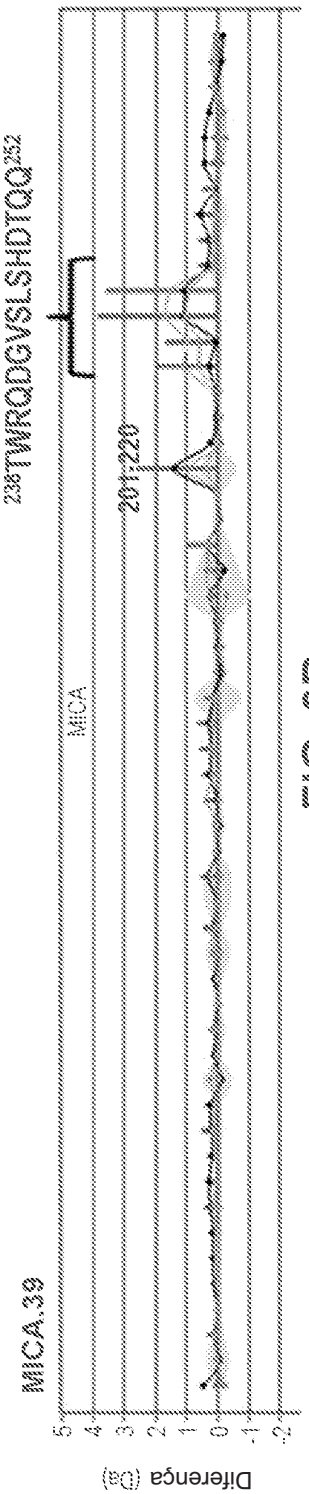


FIG. 9B

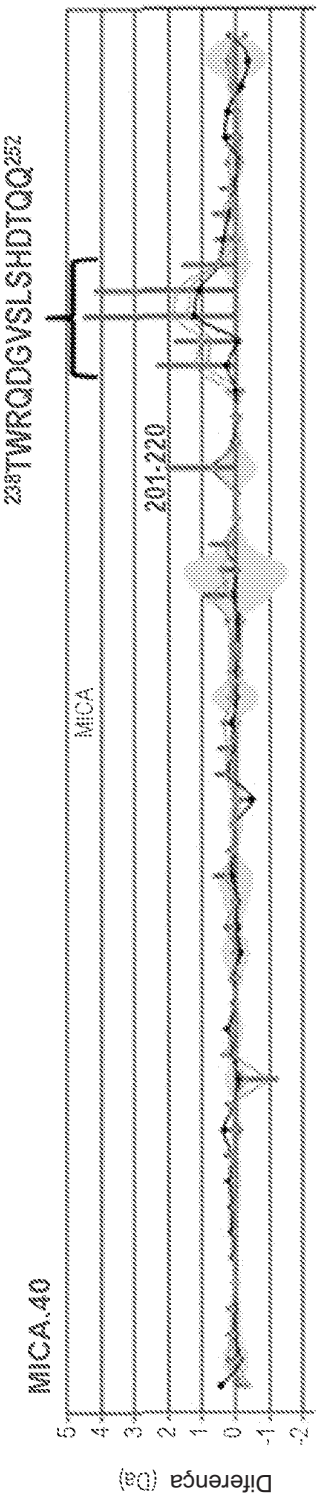


FIG. 9C

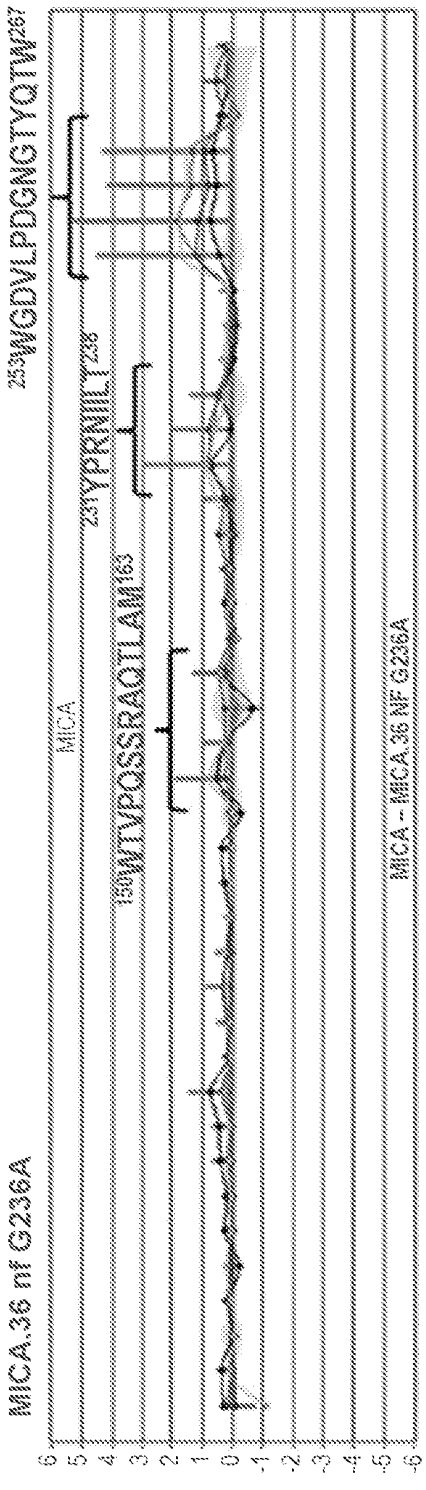

MICA.36 nf G236A
253WGDVLPDGNGTYQTW267
MICA
231YPRNILT238
150WTVPOSSRAQTLAM163
MICA – MICA.36 NF G236A
Diferença (Δa)
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6

FIG. 9D

MICA.36
253WGDVLPDGNGTYQTW267
MICA
231YPRNILT238
150WTVPOSSRAQTLAM163
MICA + MaB19G6
Diferença (Δa)
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6

FIG. 9E

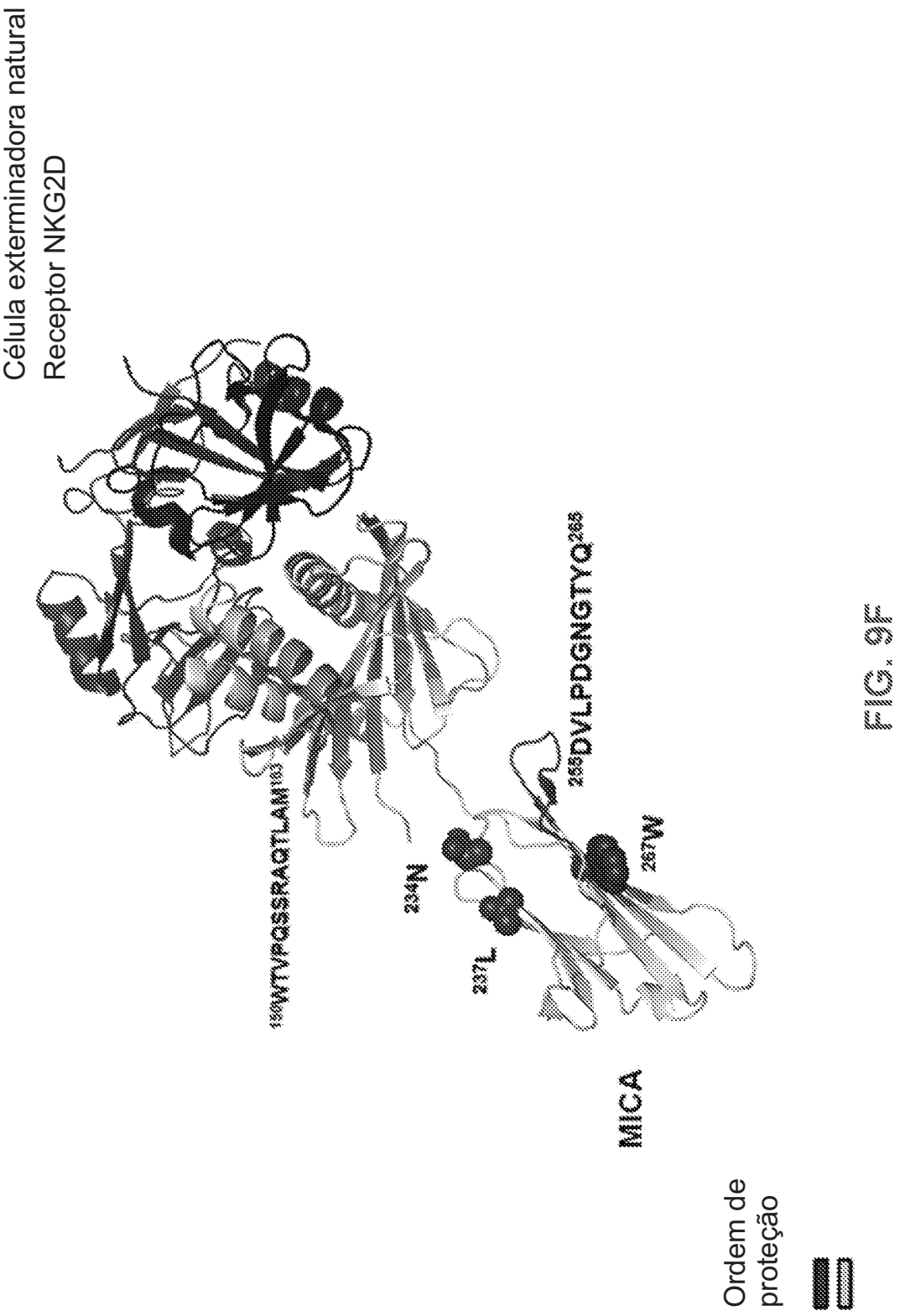

Célula exterminadora natural
Receptor NKG2D
150WTVPQSSRAQTLAM163
234N
237L
255DVLPDGNGTYQ265
267W
MICA
Ordem de proteção

FIG. 9F

Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 62/514


```
  1 MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLAEVH LDGQPFLRYD
 61 RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE
121 IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETEEW TVPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY
181 HAMHADCLQE LRRYLESGVV LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASSF YPRNIILTWR
241 QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICRGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
301 LVLQSHWQTF HVSAVAAGCC YFCYYYFLCP LL
```

FIG. 10A

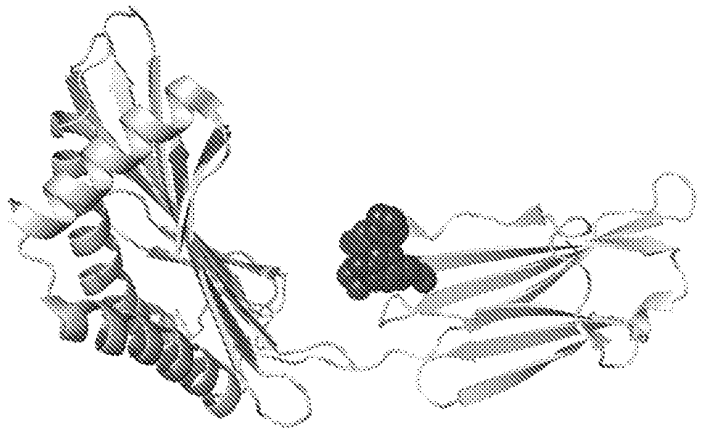
Petição 870200115116, de 11/09/2020, pág. 63/514


```
  1 MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLAEVH LDGQPFLRYD
 61 RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE
121 IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETEEW TVPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY
181 HAMHADCLQE LRRYLESGVV LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASSF YPRNIILTWR
241 QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICRGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
301 LVLQSHWQTF HVSAVAAGCC YFCYYYFLCP LL
```

FIG. 10B

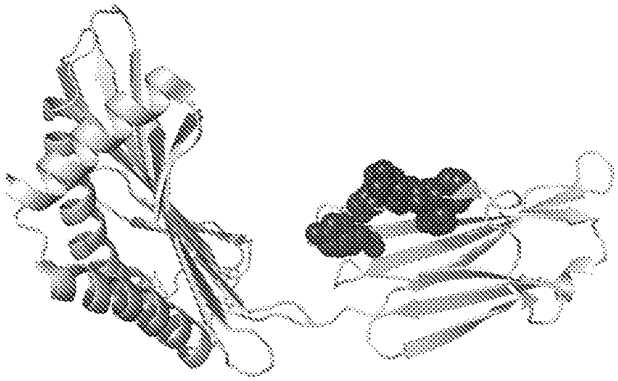
```
   1 MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLAEVH LDGQPFLRYD
  61 RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TMDRETRDLT QNGKDLRMTL AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE
 121 IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETEEW TVPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY
 181 HAMHADCLQE LRRYLESGVV LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASSF YPRNILTWR
 241 QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICRGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
 301 LVLQSHWQTF HVSAVAGCC YFCYYYFLCP LL
```

FIG. 10C



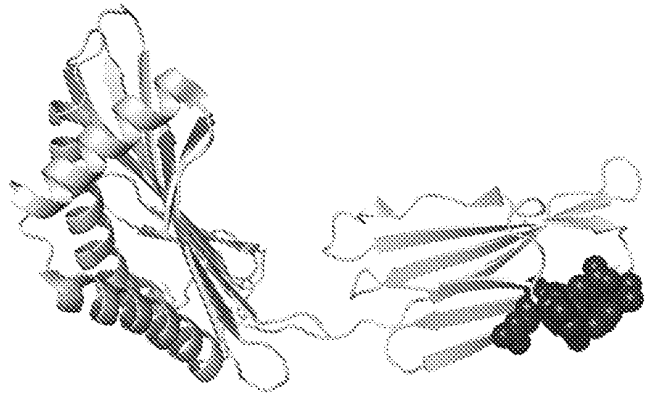
24G11

FIG. 10F



MICA.36

FIG. 10E



MICA.2

FIG. 10D

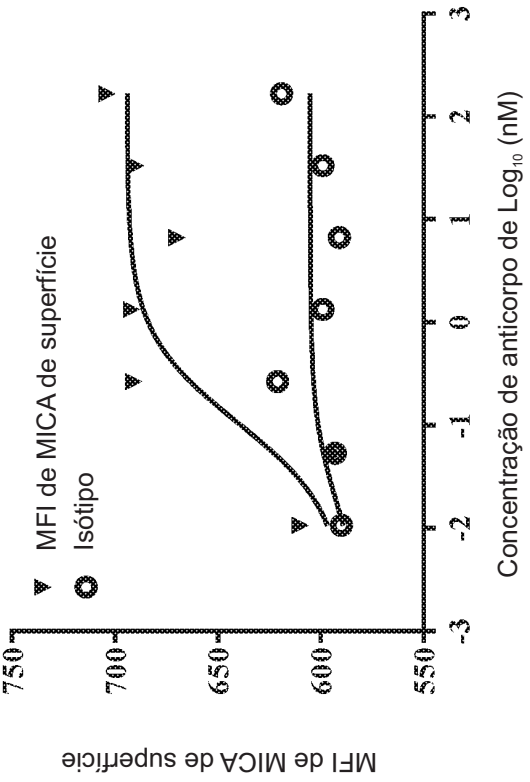


FIG. 11B

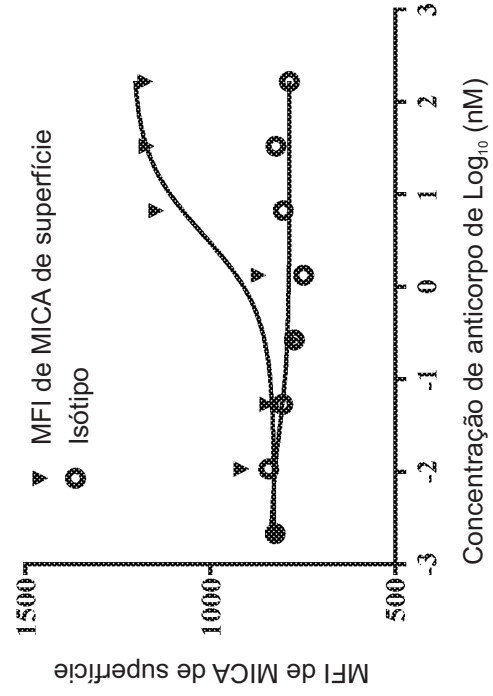


FIG. 11A

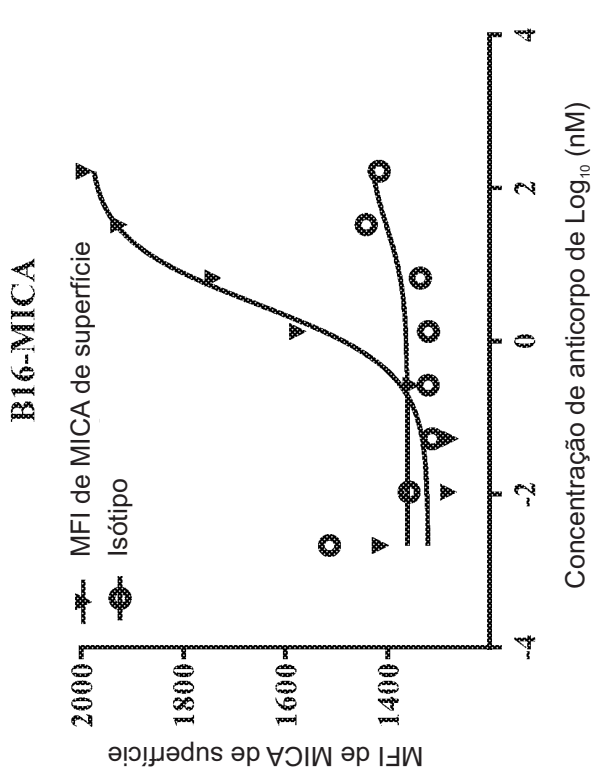


FIG. 11C

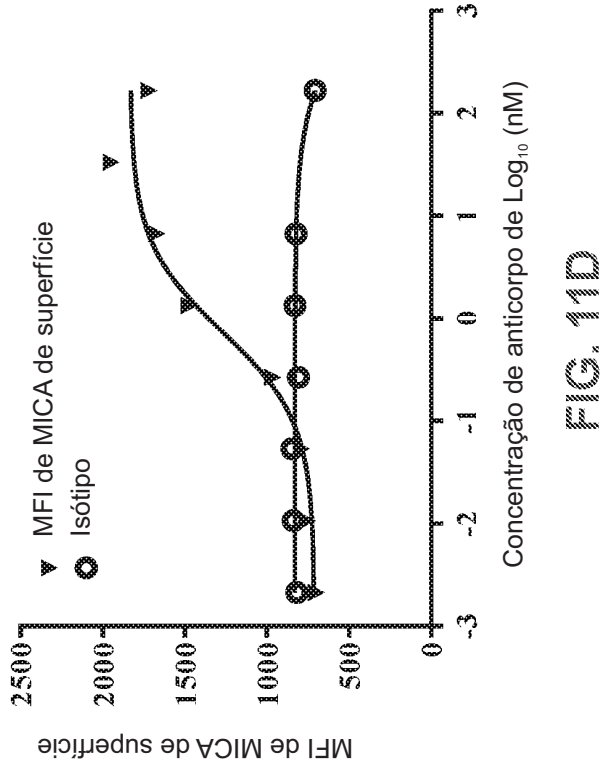


FIG. 11D

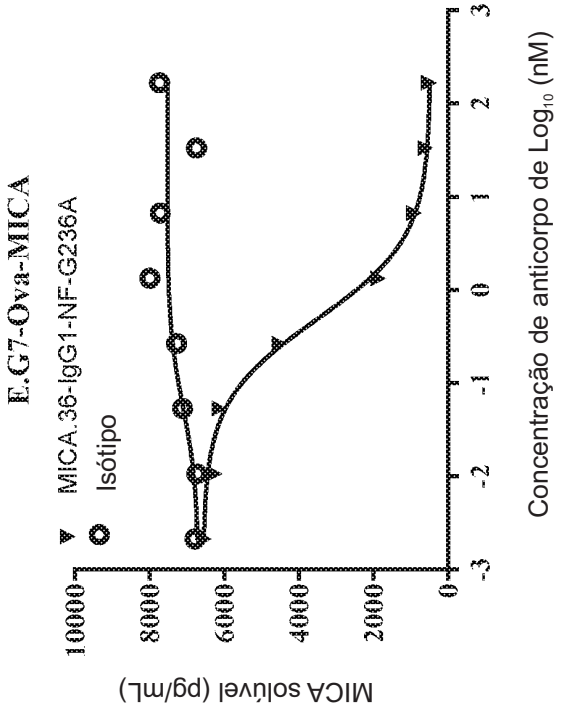


FIG. 12B

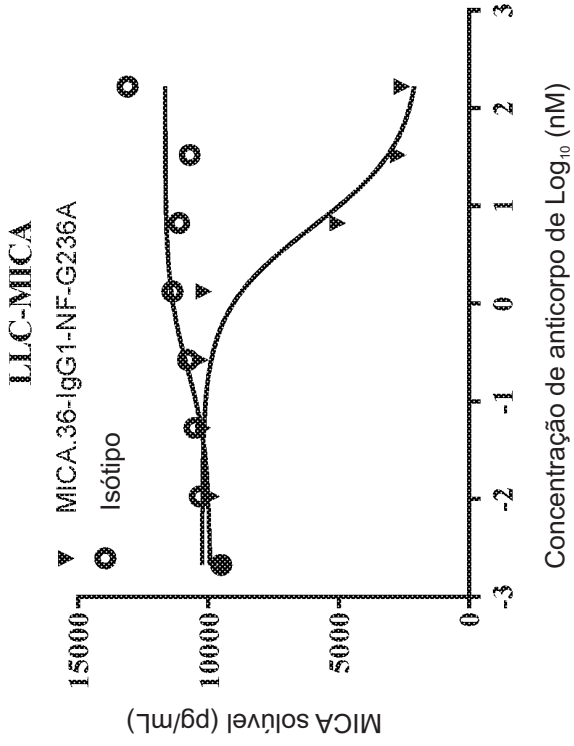


FIG. 12A

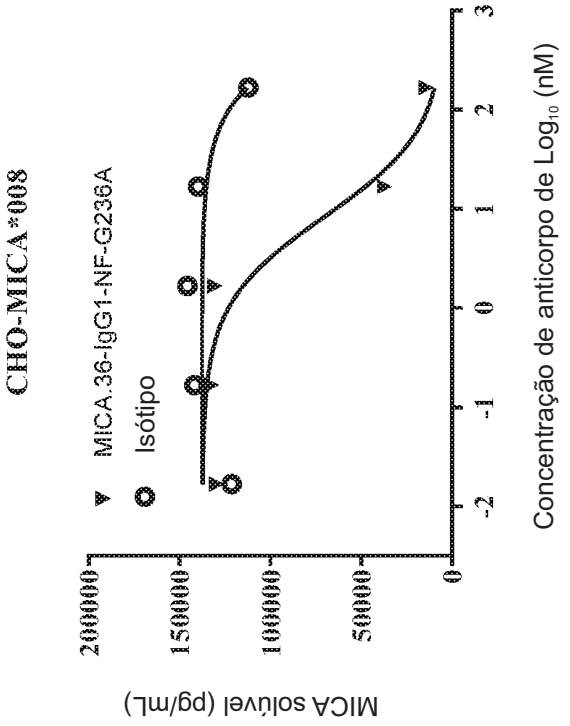


FIG. 12D

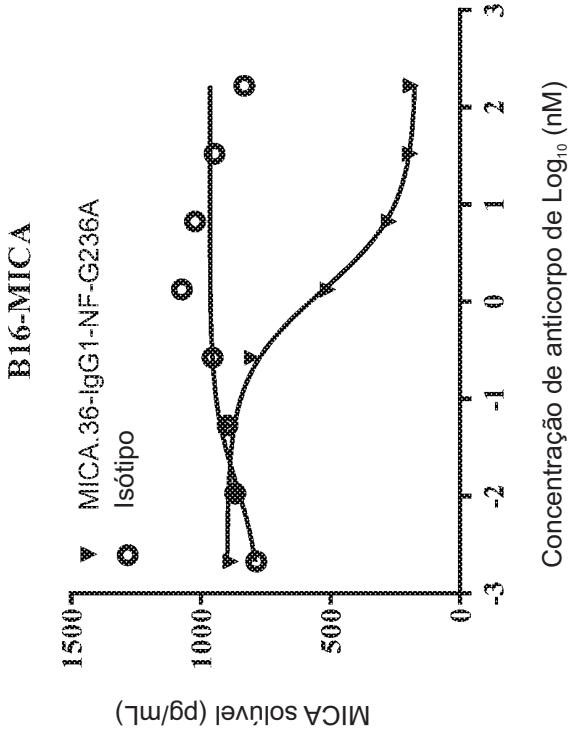


FIG. 12C

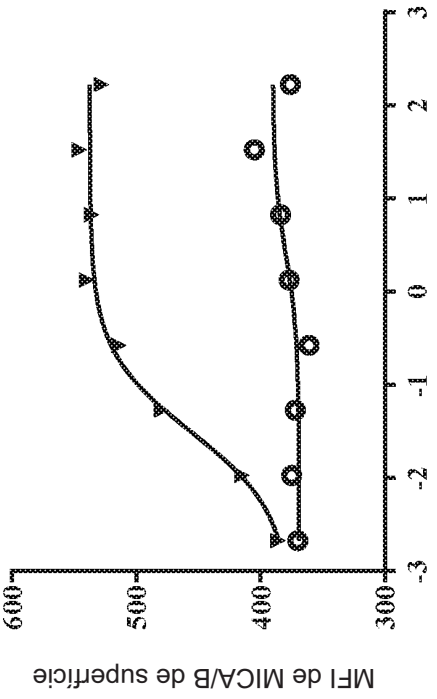


FIG. 13B

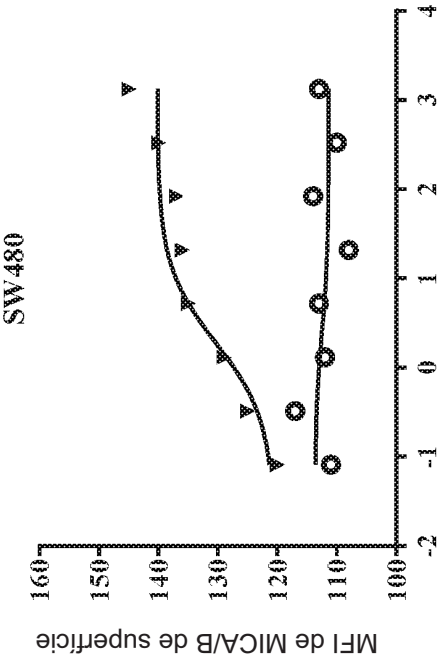


FIG. 13A

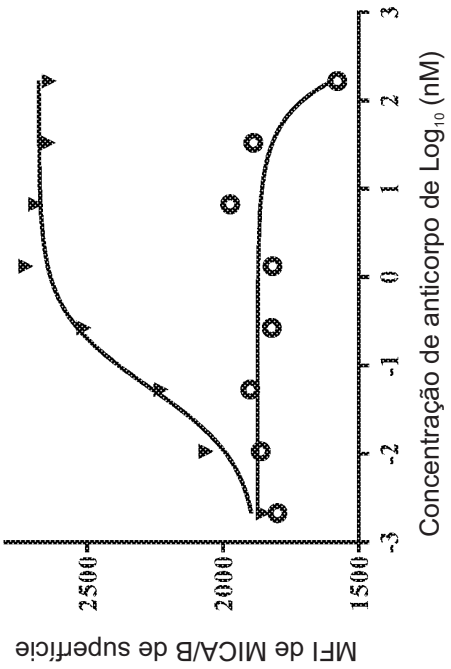


FIG. 13D

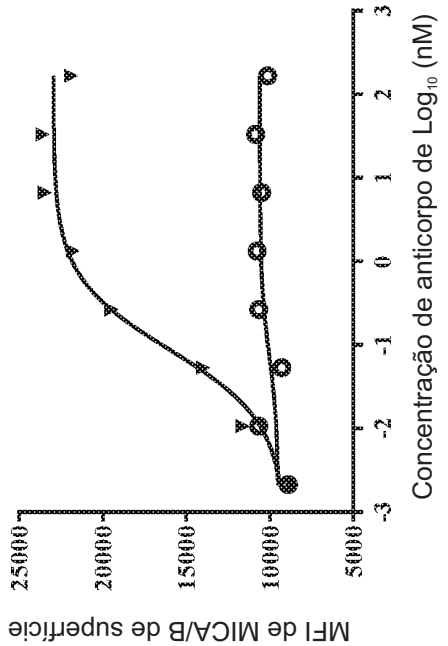


FIG. 13C

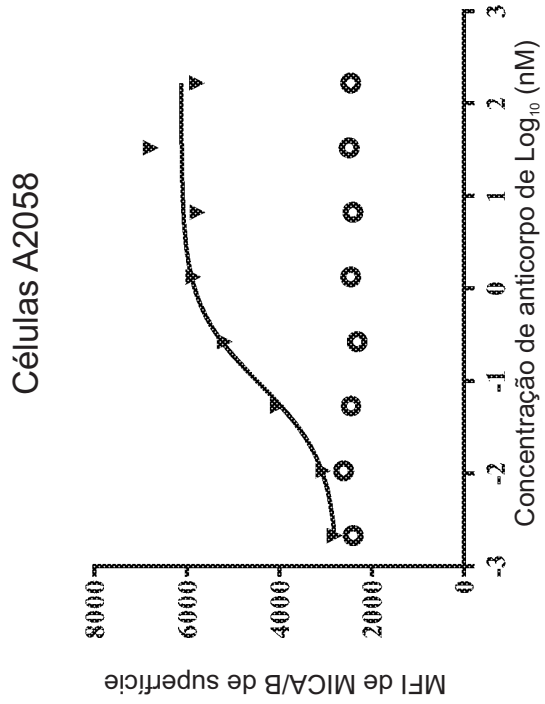

Células A2058
MFI de MICA/B de superfície
8000
6000
4000
2000
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Concentração de anticorpo de Log10 (nM)
Controle de isótipo
MICA.36-IgG1-NF-G236A

FIG. 13E

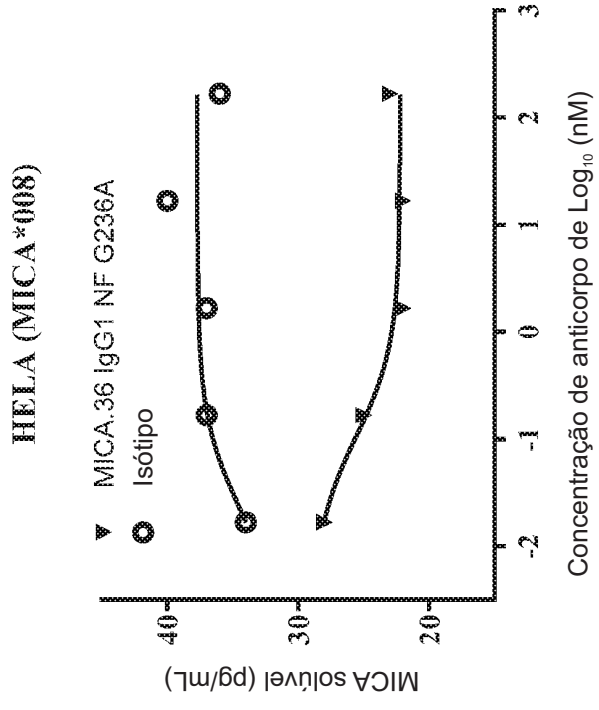


FIG. 14A

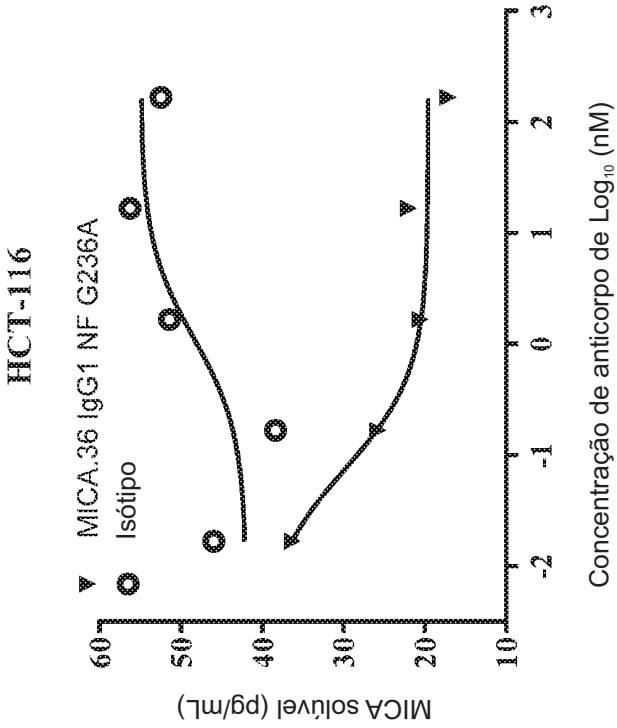


FIG. 14B

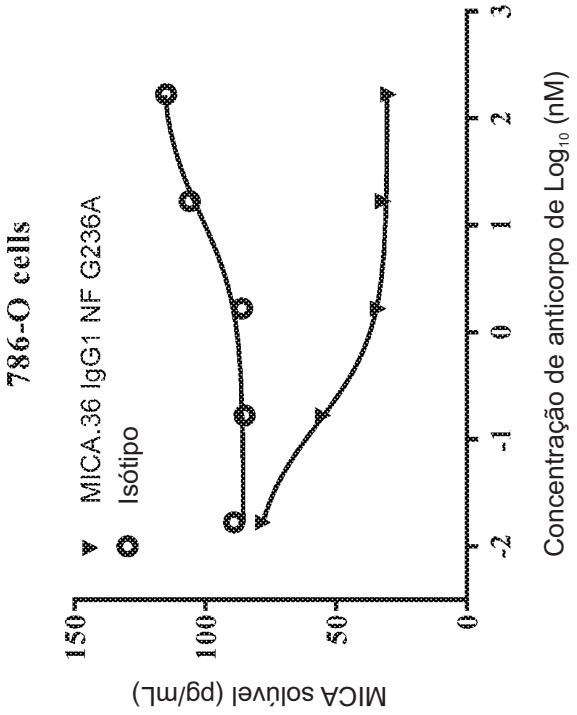

786-O cells
MICA.36 IgG1 NF G236A
Isótipo
MICA solúvel (pg/mL)
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
Concentração de anticorpo de Log10 (nM)

FIG. 14C

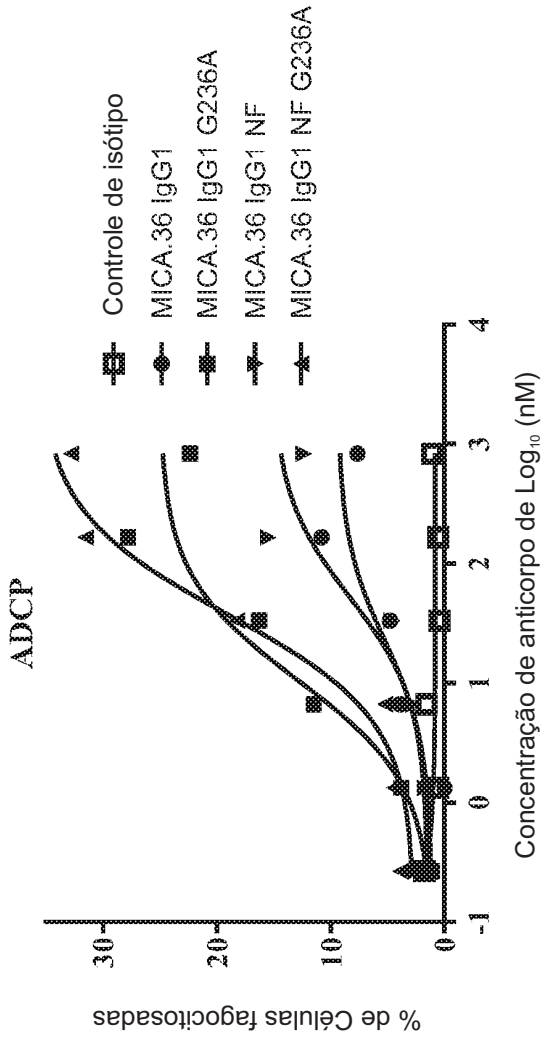


FIG. 15A

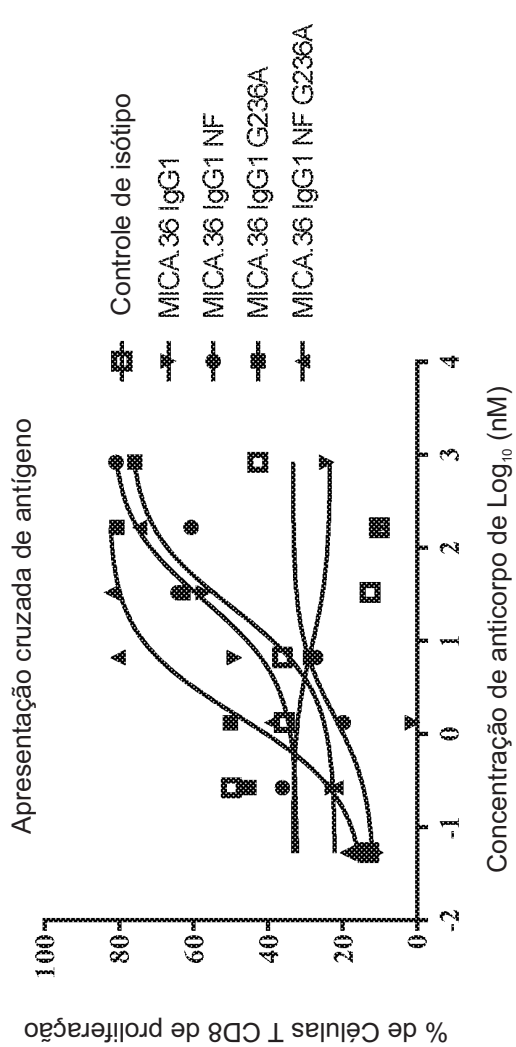


FIG. 15B

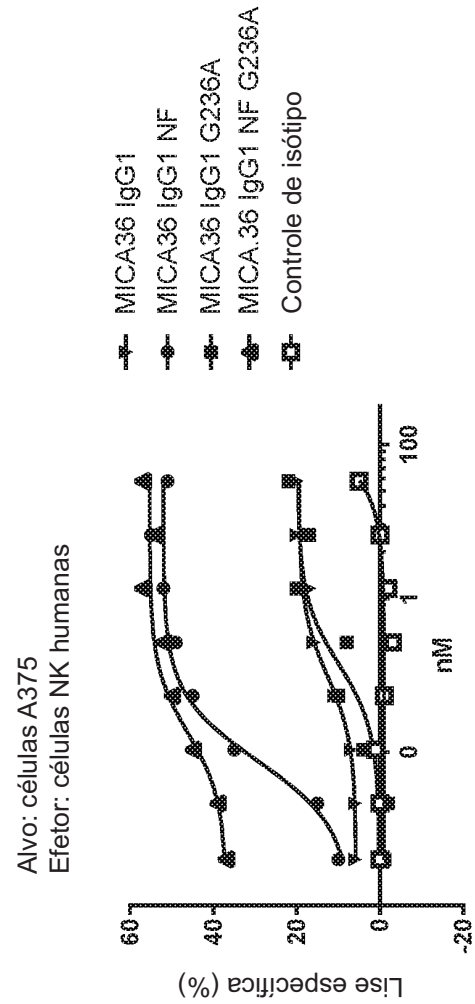


FIG. 16B

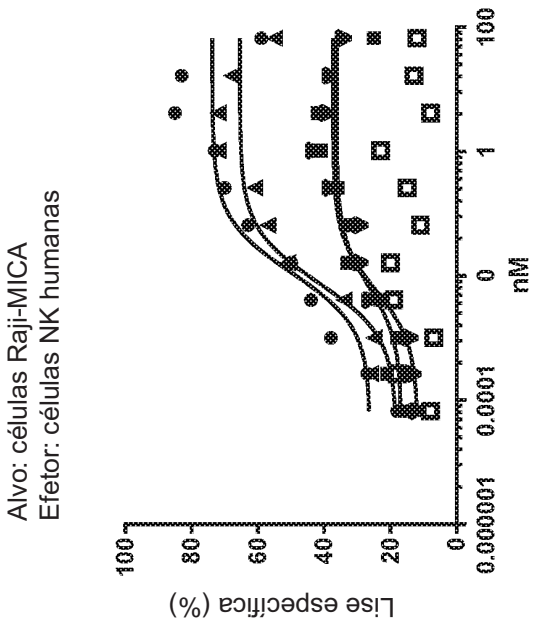


FIG. 16A

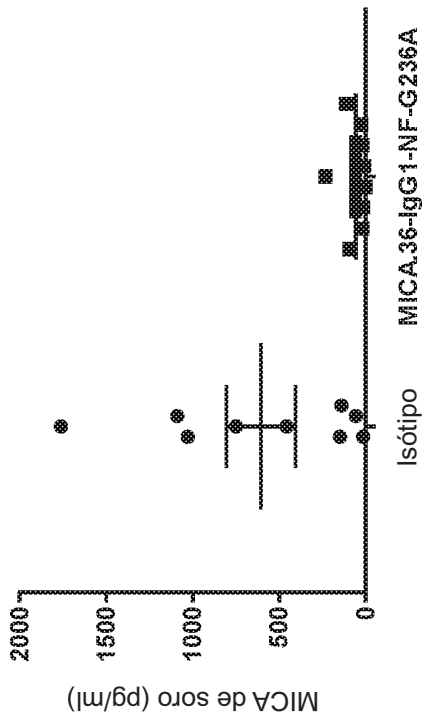


FIG. 17B

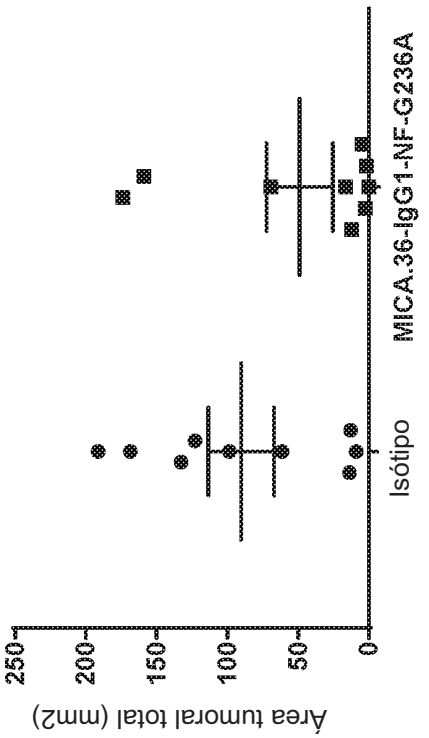


FIG. 17A

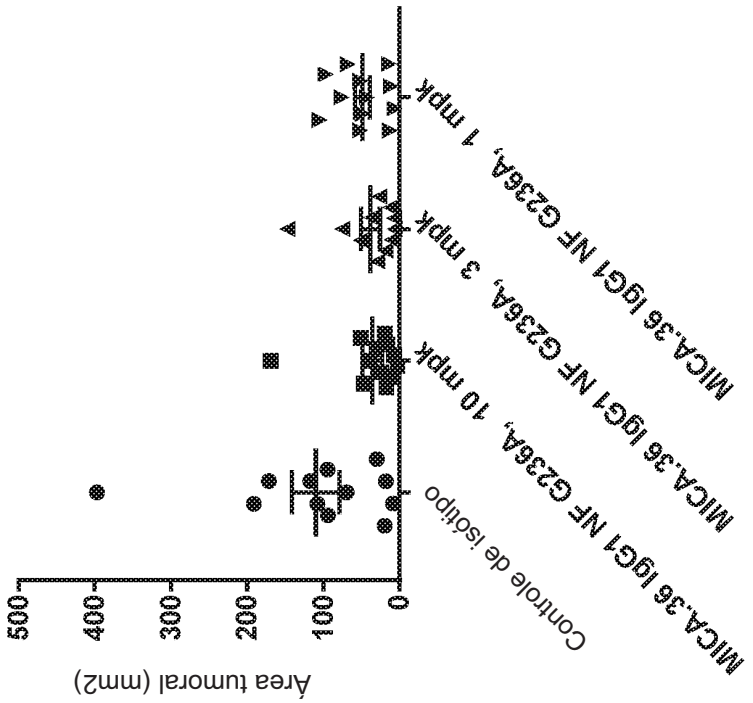


FIG. 18B

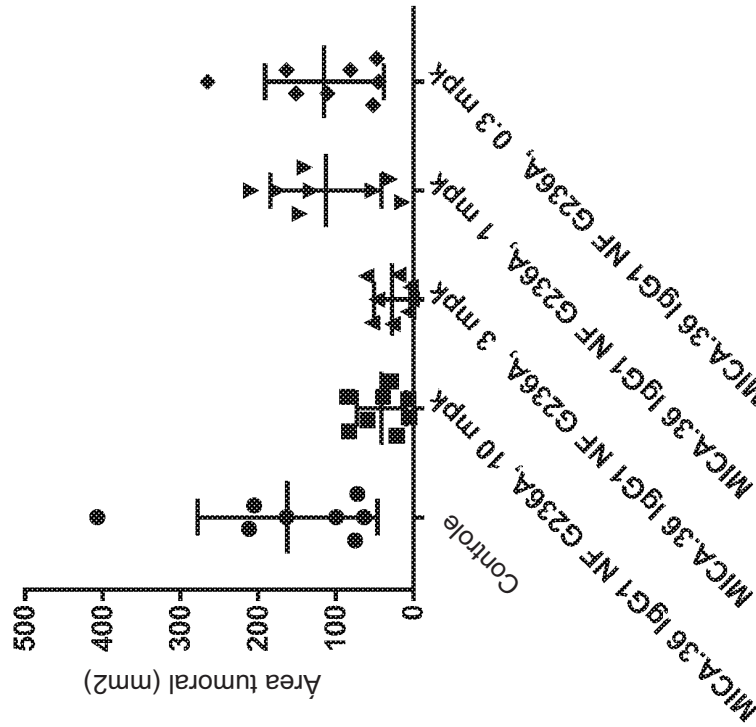


FIG. 18A

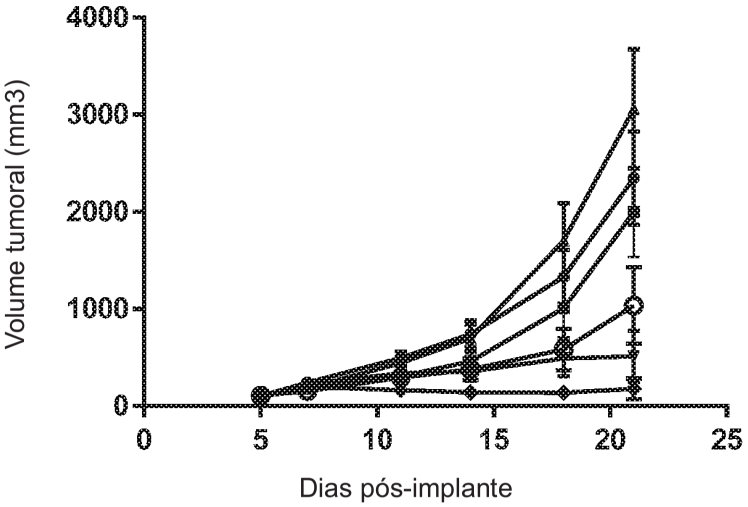


FIG. 19A

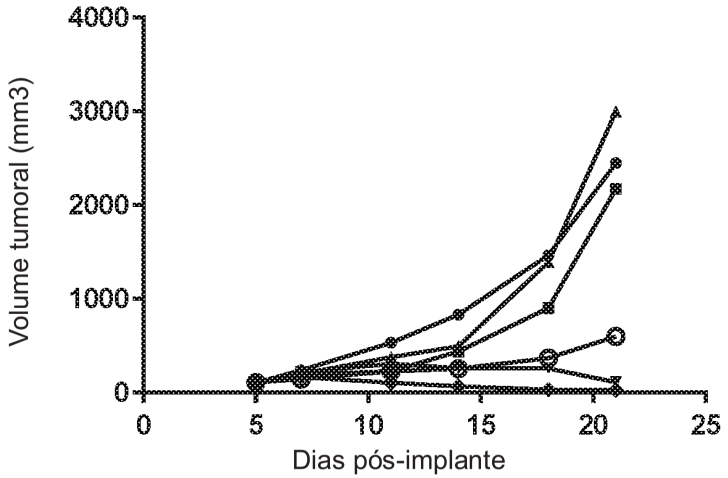


FIG. 19B

Isótipo mIgG1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG1
D265A de mIgG1 de MICA.36 + Isótipo mIgG2a
anti-PD-1 mIgG1 D265A + Isótipo mIgG2a
D265A de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + D265A de mIgG1 anti-PD-1

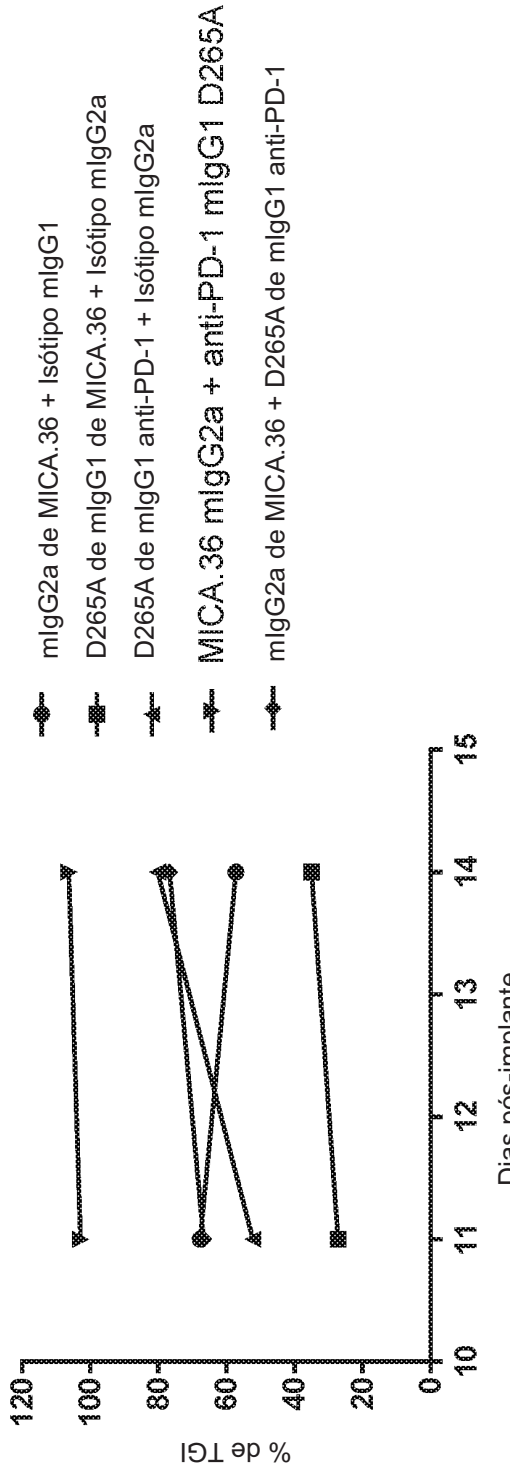

mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG1
D265A de mIgG1 de MICA.36 + Isótipo mIgG2a
D265A de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
MICA.36 mIgG2a + anti-PD-1 mIgG1 D265A
mIgG2a de MICA.36 + D265A de mIgG1 anti-PD-1
% de TGI
120
100
80
60
40
20
0
10
11
12
13
14
15
Dias pós-implante

FIG. 19C

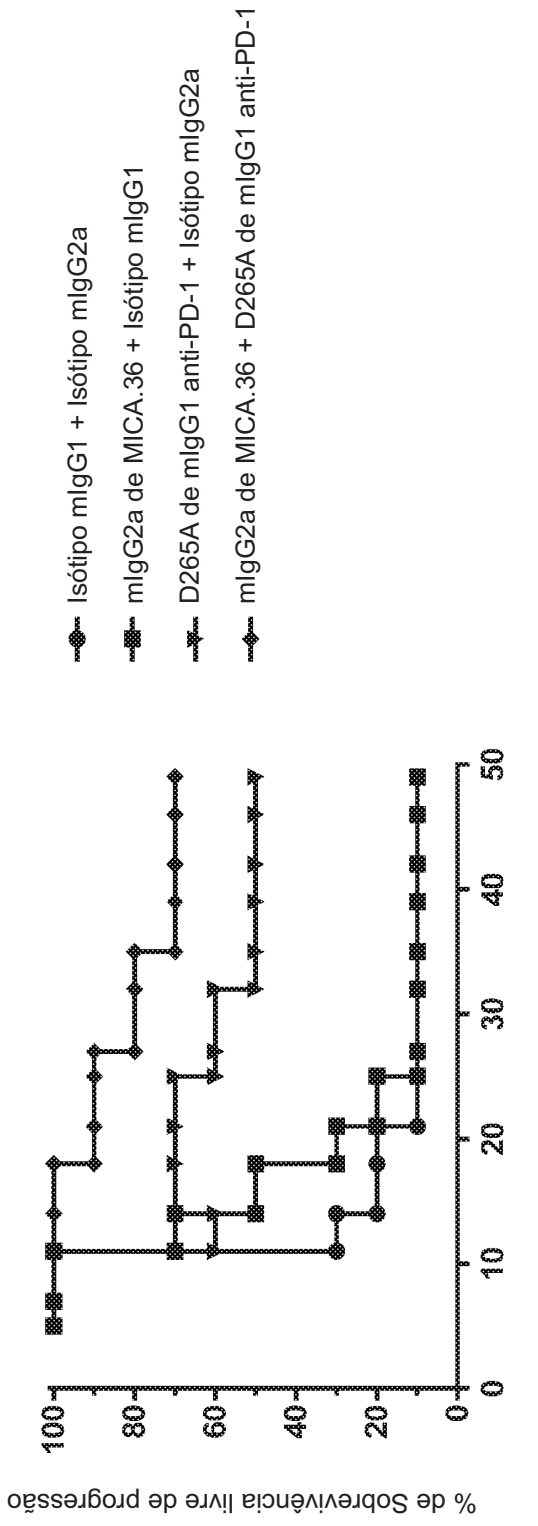

Isótipo mIgG1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG1
D265A de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + D265A de mIgG1 anti-PD-1
% de Sobrevivência livre de progressão
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
Dias pós-implante

FIG. 19D

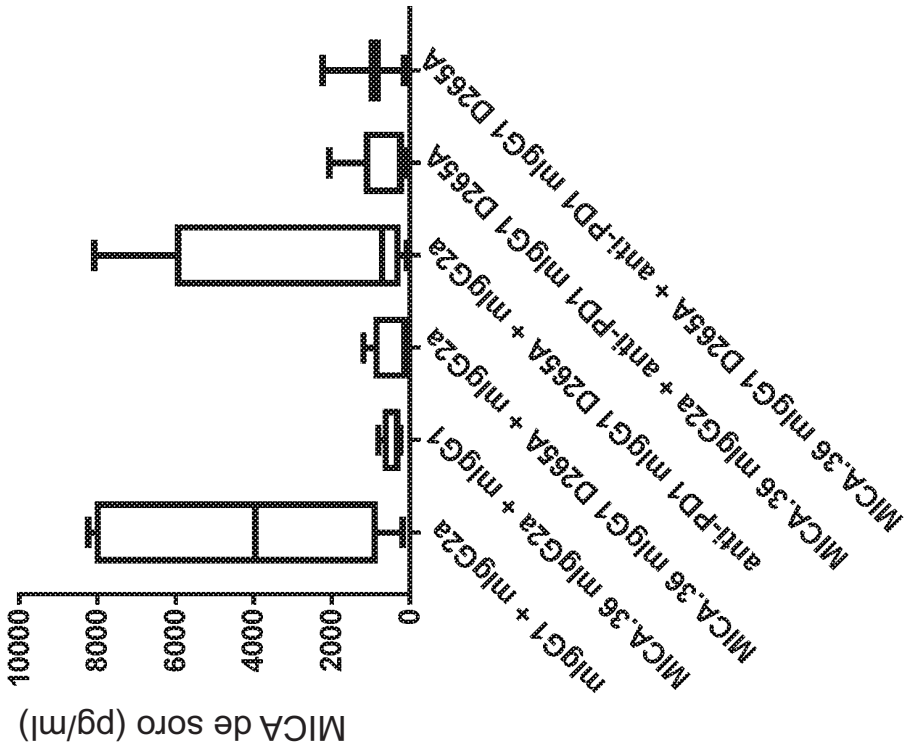

MICA de soro (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
mIgG1 + mIgG2a
MICA.36 mIgG2a + mIgG1
MICA.36 mIgG1 D265A + mIgG2a
anti-PD1 mIgG1 D265A + mIgG2a
MICA.36 mIgG2a + anti-PD1 mIgG1 D265A
MICA.36 mIgG1 D265A + anti-PD1 mIgG1 D265A

FIG. 19E

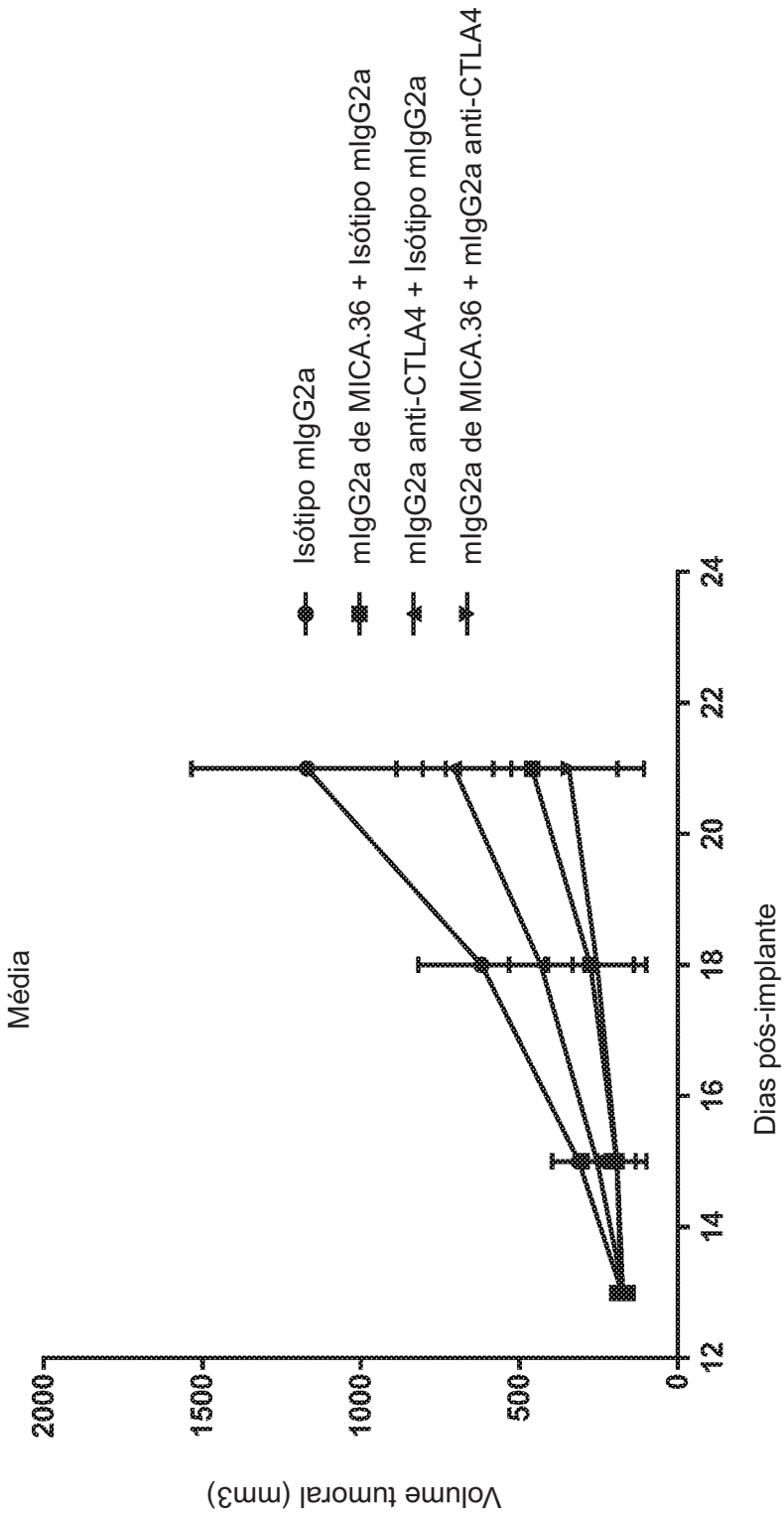

Média
Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a anti-CTLA4 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + mIgG2a anti-CTLA4
Volume tumoral (mm3)
2000
1500
1000
500
0
12
14
16
18
20
22
24
Dias pós-implante

FIG. 20A

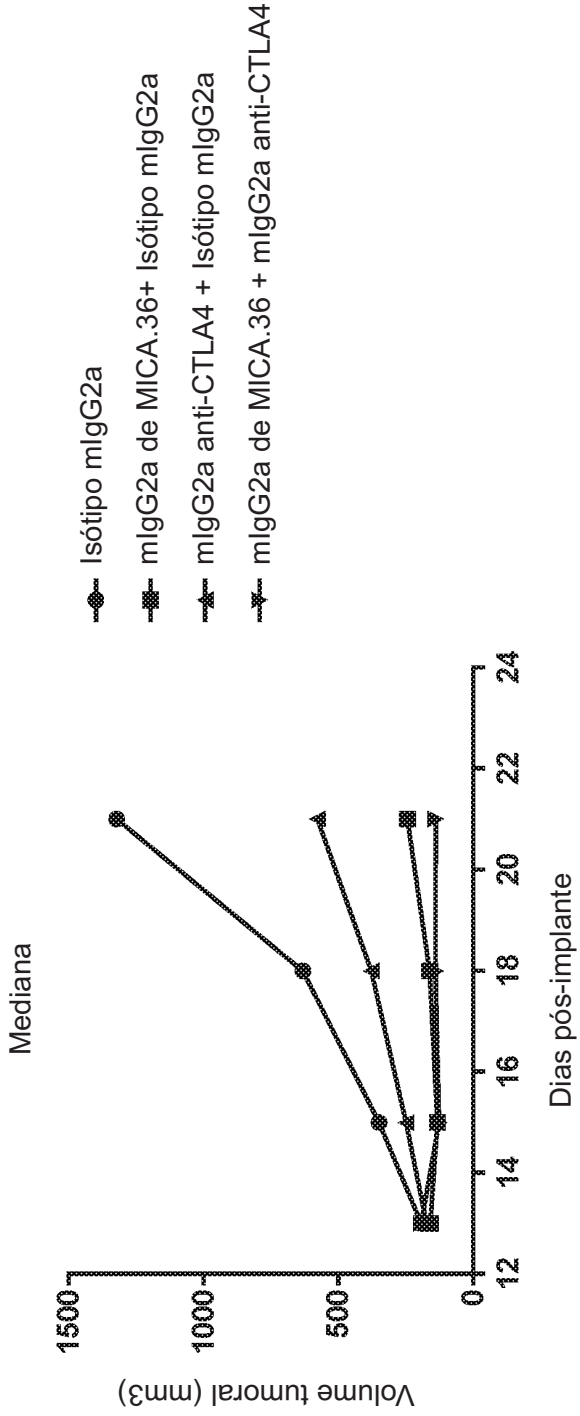

Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36+ Isótipo mIgG2a
mIgG2a anti-CTLA4 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + mIgG2a anti-CTLA4
Mediana
Volume tumoral (mm3)
1500
1000
500
0
12
14
16
18
20
22
24
Dias pós-implante

FIG. 20B

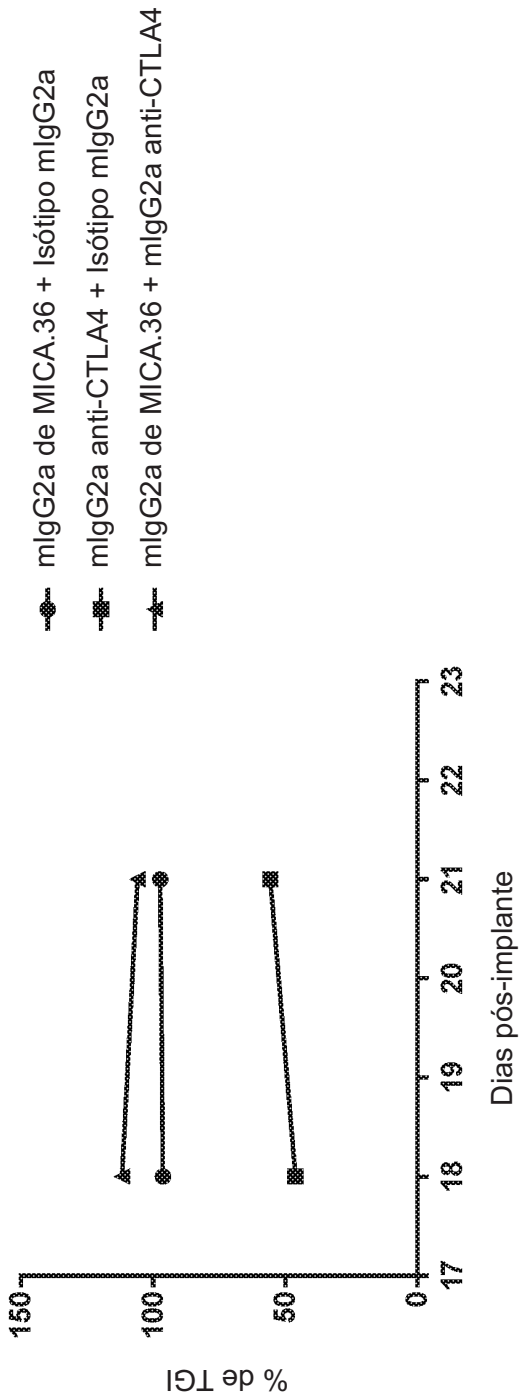

mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a anti-CTLA4 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + mIgG2a anti-CTLA4
% de TGI
150
100
50
0
17
18
19
20
21
22
23
Dias pós-implante

FIG. 20C

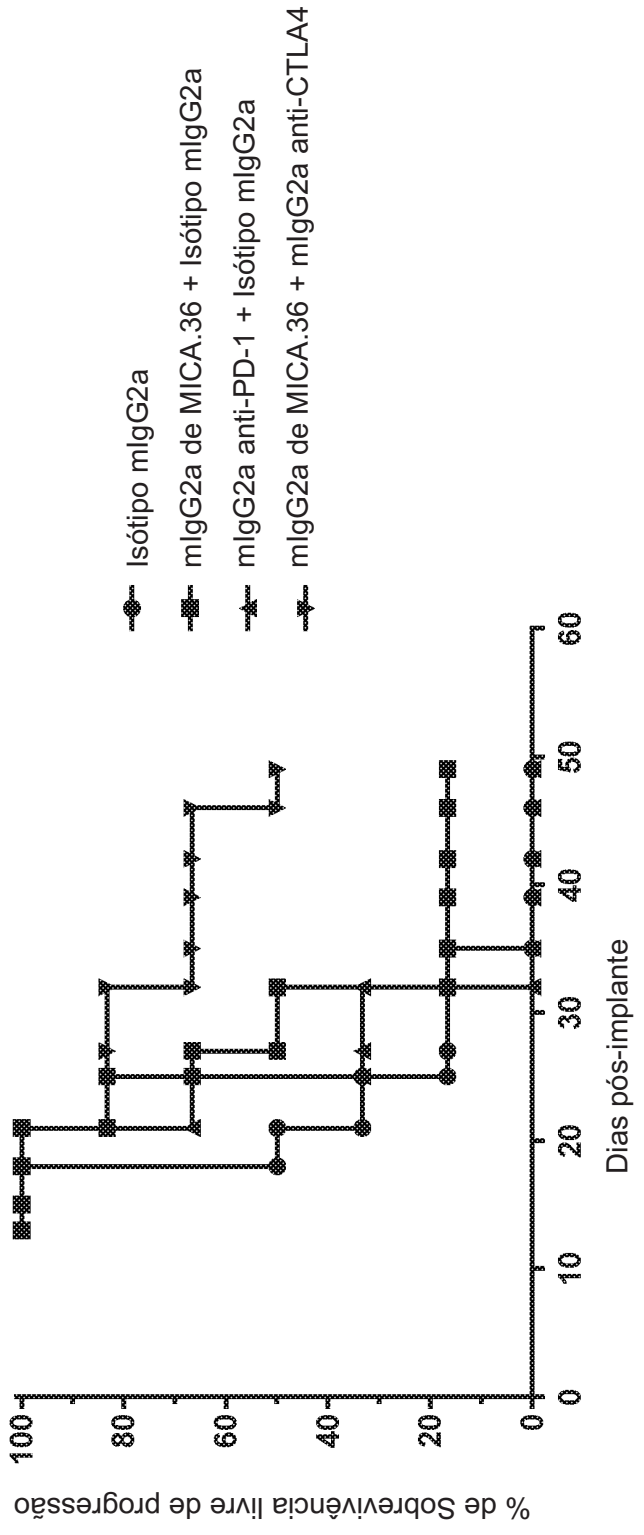

Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + mIgG2a anti-CTLA4
% de Sobrevivência livre de progressão
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
Dias pós-implante

FIG. 20D

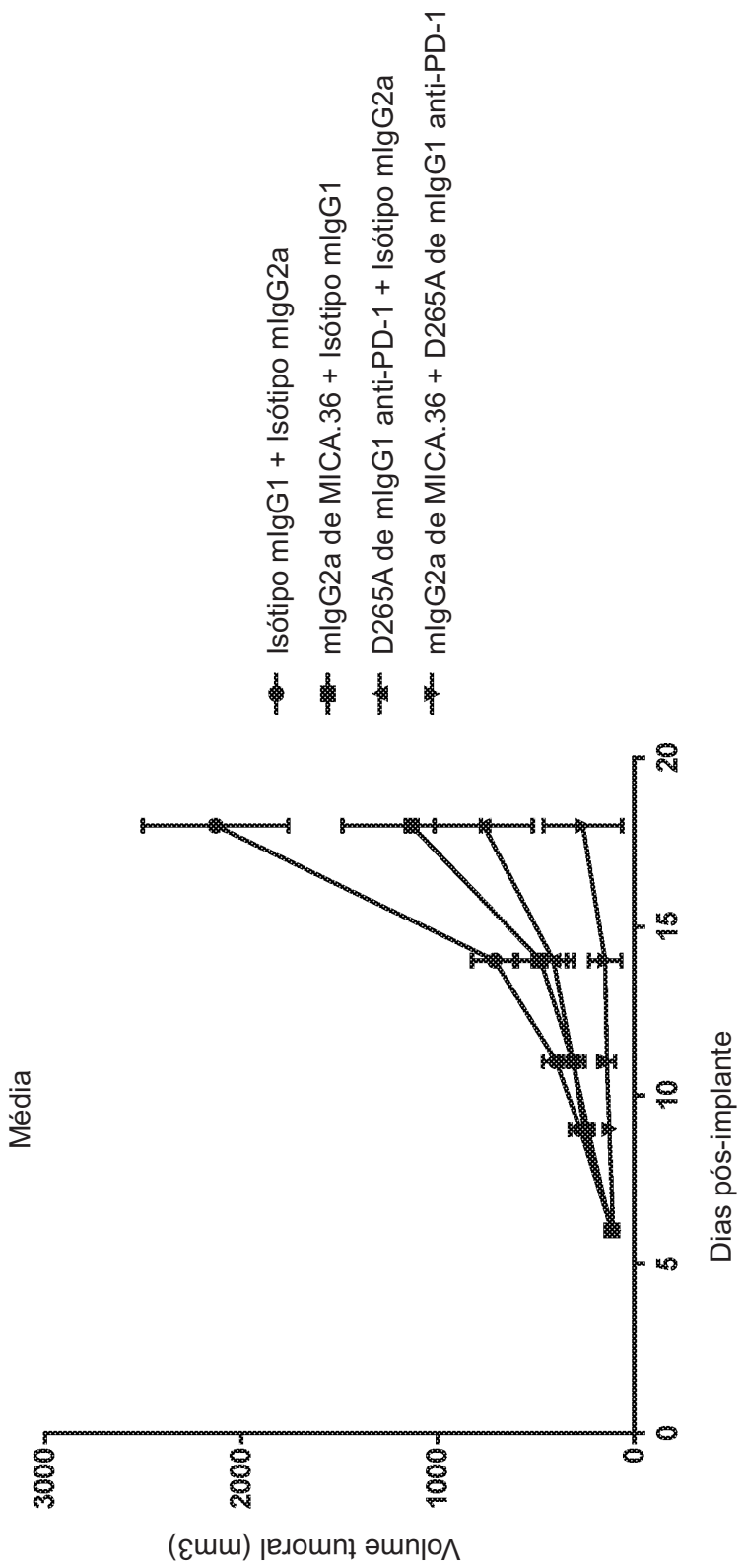

Média
Volume tumoral (mm3)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
Dias pós-implante
Isótipo mIgG1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG1
D265A de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + D265A de mIgG1 anti-PD-1

FIG. 21A

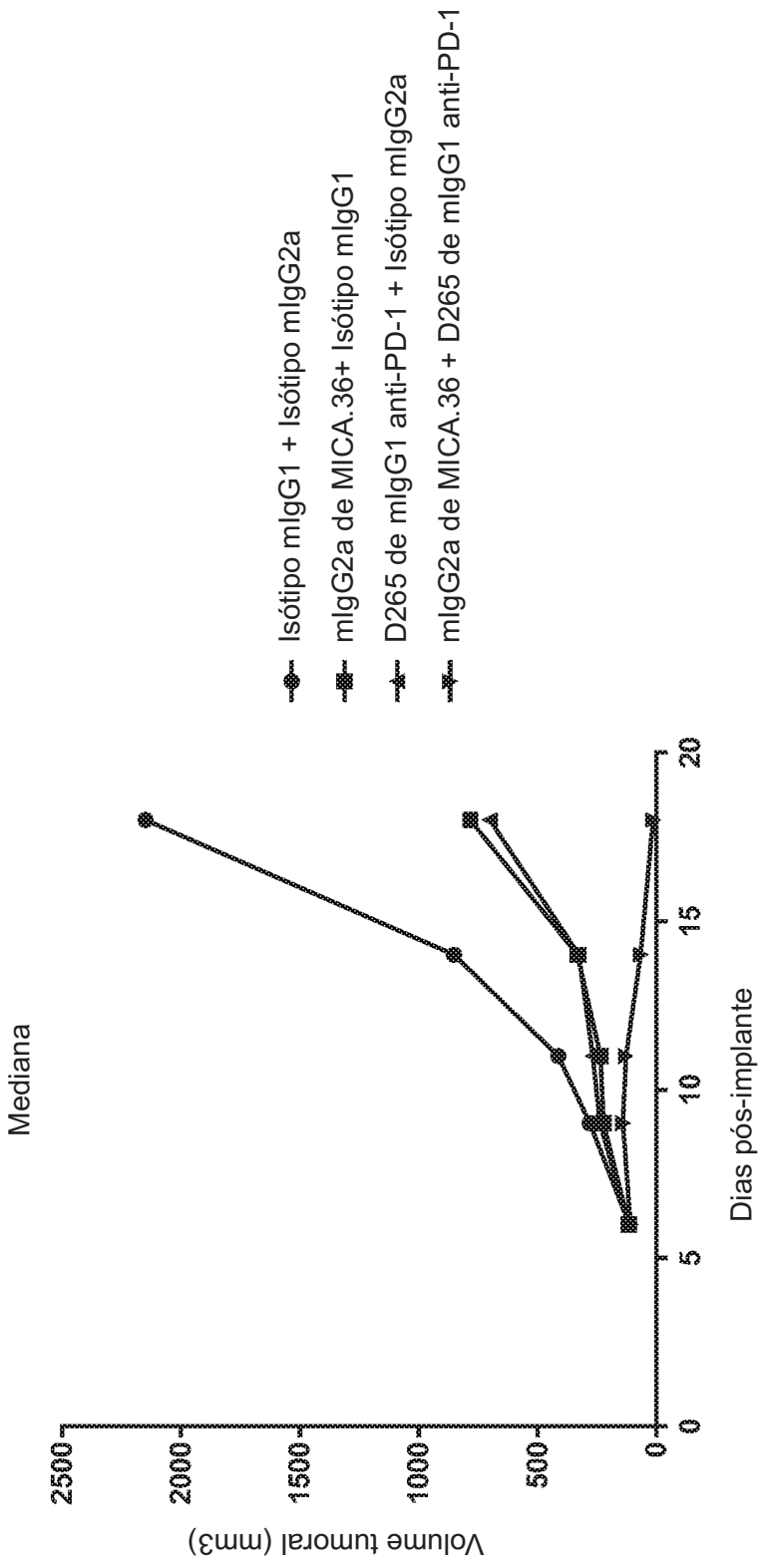

Mediana
Isótipo mIgG1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36+ Isótipo mIgG1
D265 de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + D265 de mIgG1 anti-PD-1
Volume tumoral (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
Dias pós-implante

FIG. 21B

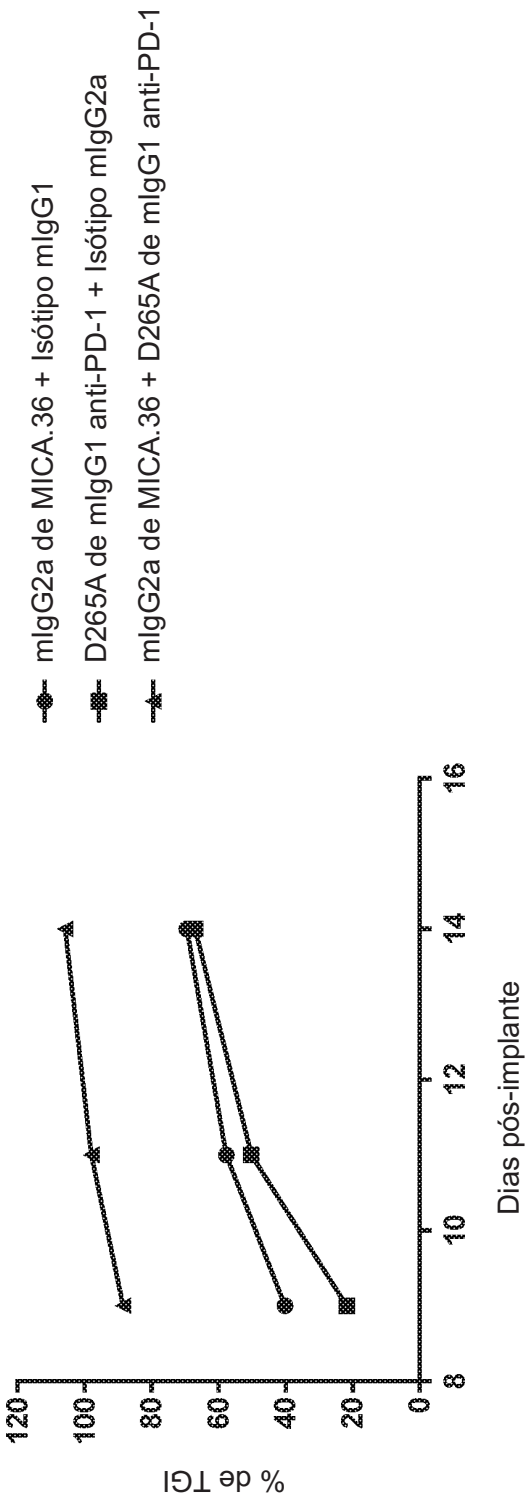

mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG1
D265A de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + D265A de mIgG1 anti-PD-1
% de TGI
120
100
80
60
40
20
0
8
10
12
14
16
Dias pós-implante

FIG. 21C

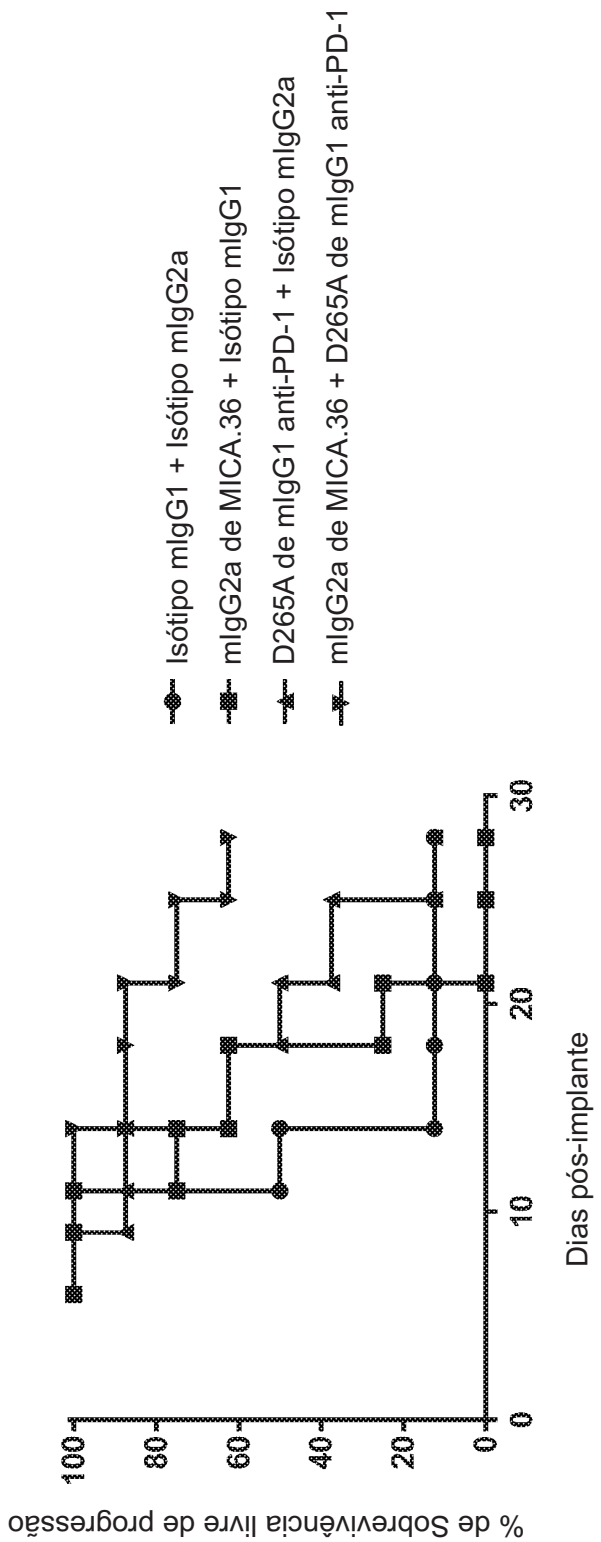

Isótipo mIgG1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + Isótipo mIgG1
D265A de mIgG1 anti-PD-1 + Isótipo mIgG2a
mIgG2a de MICA.36 + D265A de mIgG1 anti-PD-1
% de Sobrevivência livre de progressão
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Dias pós-implante

FIG. 21D

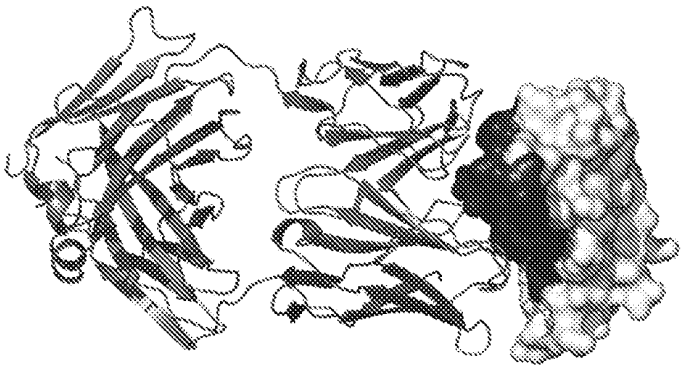


FIG. 22C

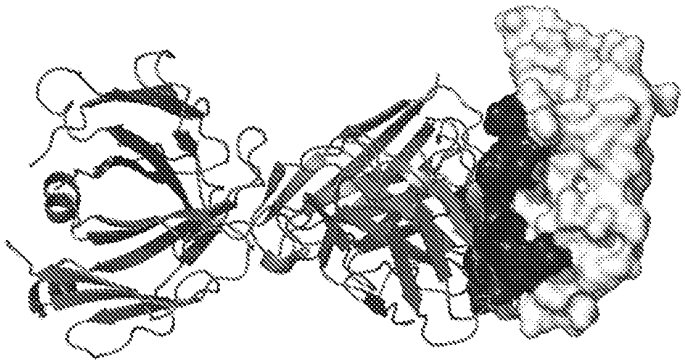


FIG. 22B

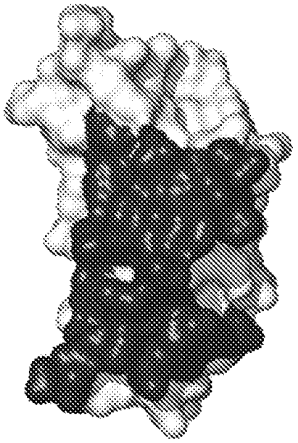


FIG. 22A

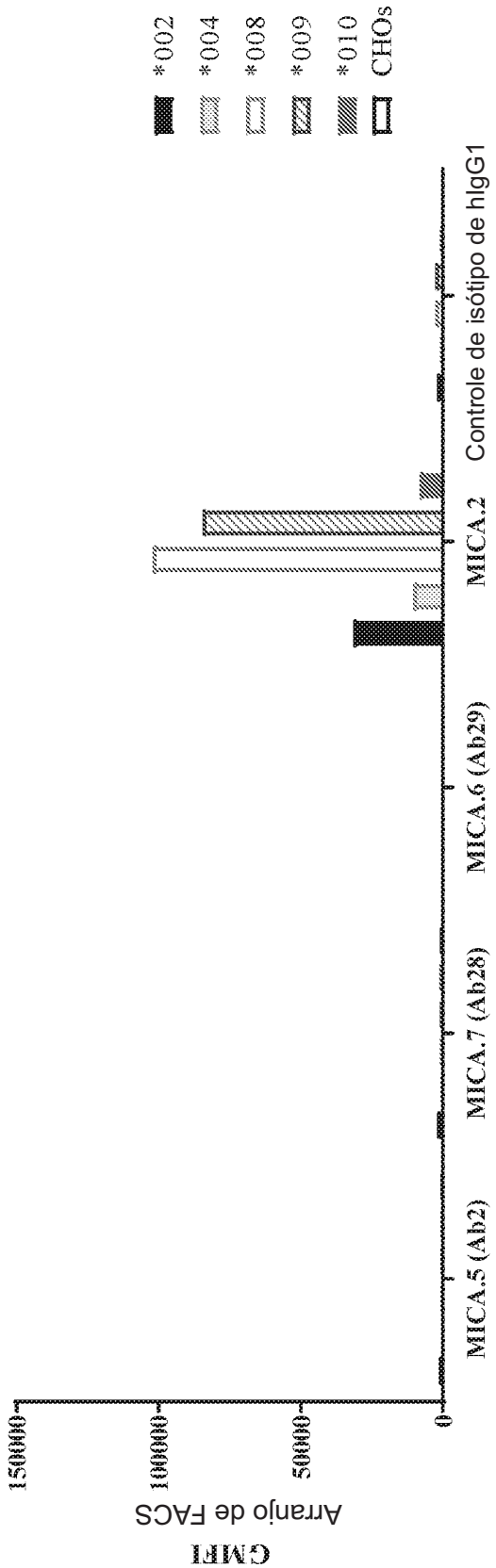

*002
*004
*008
*009
*010
CHOs
GMFI
Arranjo de FACS
150000
100000
50000
0
MICA.5 (Ab2)
MICA.7 (Ab28)
MICA.6 (Ab29)
MICA.2
Controle de isótipo de hIgG1

FIG. 23A

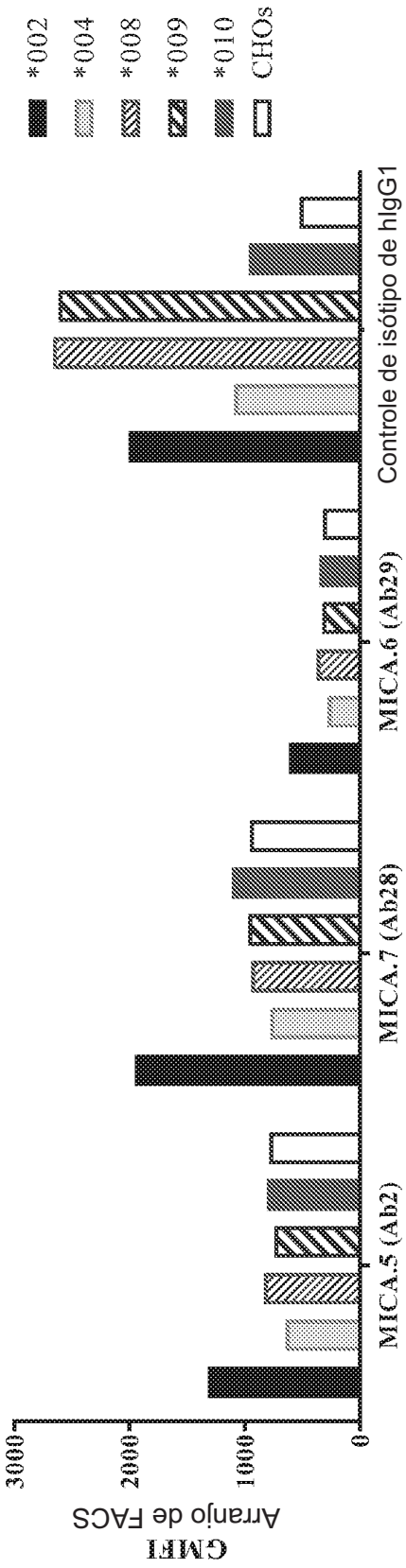

*002
*004
*008
*009
*010
CHOs
GMFI
Arranjo de FACS
3000
2000
1000
0
MICA.5 (Ab2)
MICA.7 (Ab28)
MICA.6 (Ab29)
Controle de isótipo de hIgG1

FIG. 23B

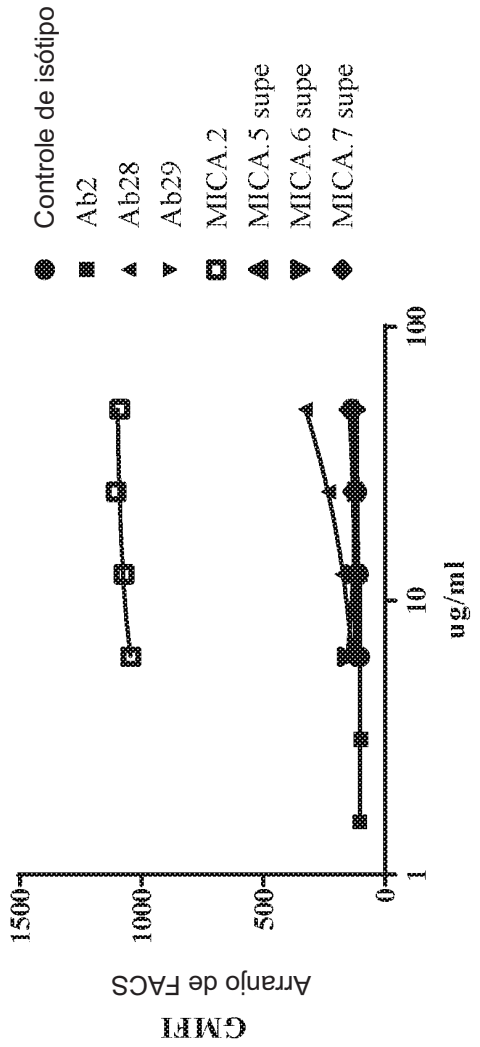


FIG. 24A

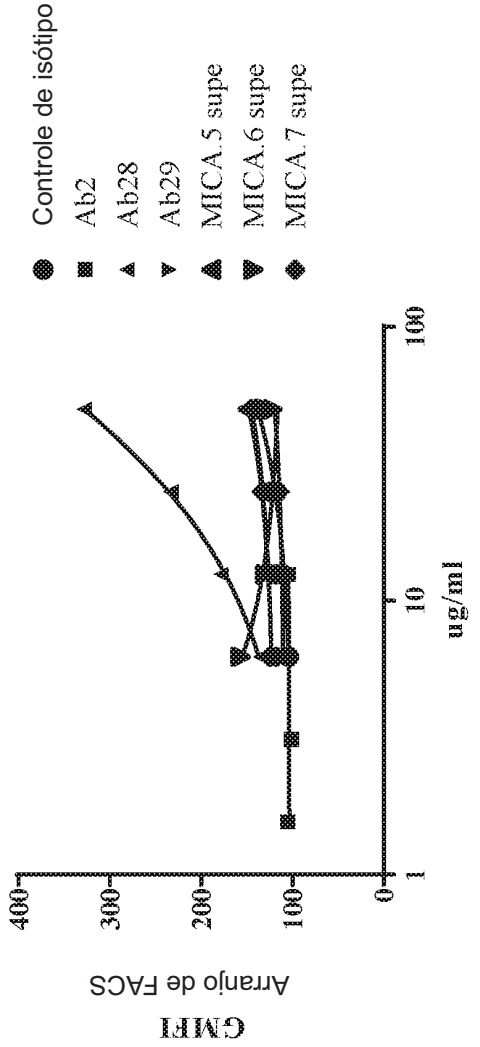


FIG. 24B

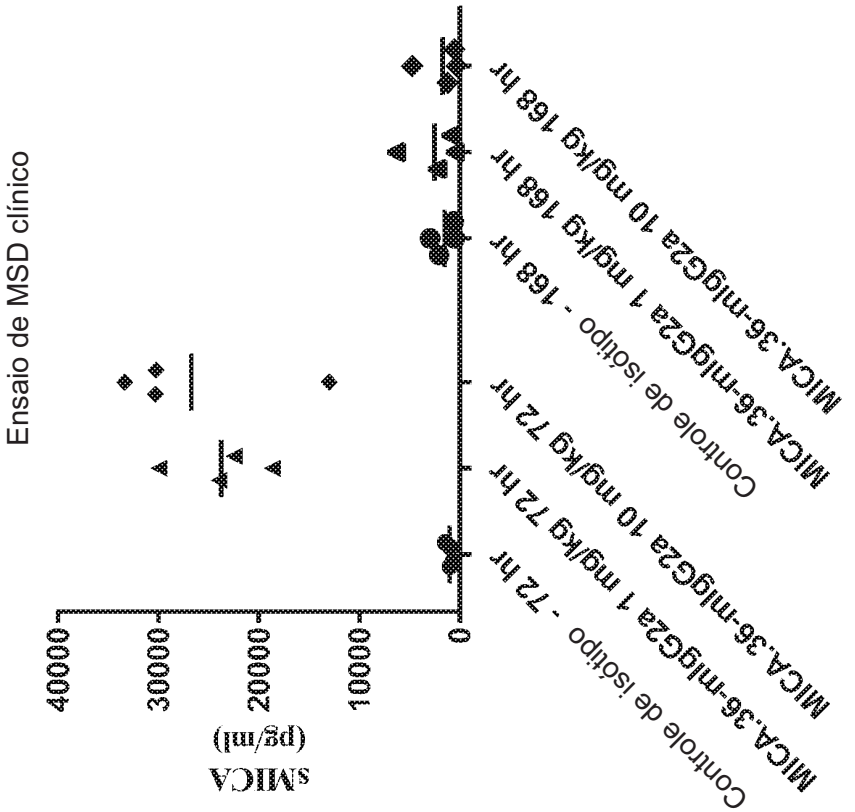

Ensaio de MSD clínico
sMICA (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
Controle de isótipo - 72 hr
MICA.36-mIgG2a 1 mg/kg 72 hr
MICA.36-mIgG2a 10 mg/kg 72 hr
Controle de isótipo - 168 hr
MICA.36-mIgG2a 1 mg/kg 168 hr
MICA.36-mIgG2a 10 mg/kg 168 hr

FIG. 25

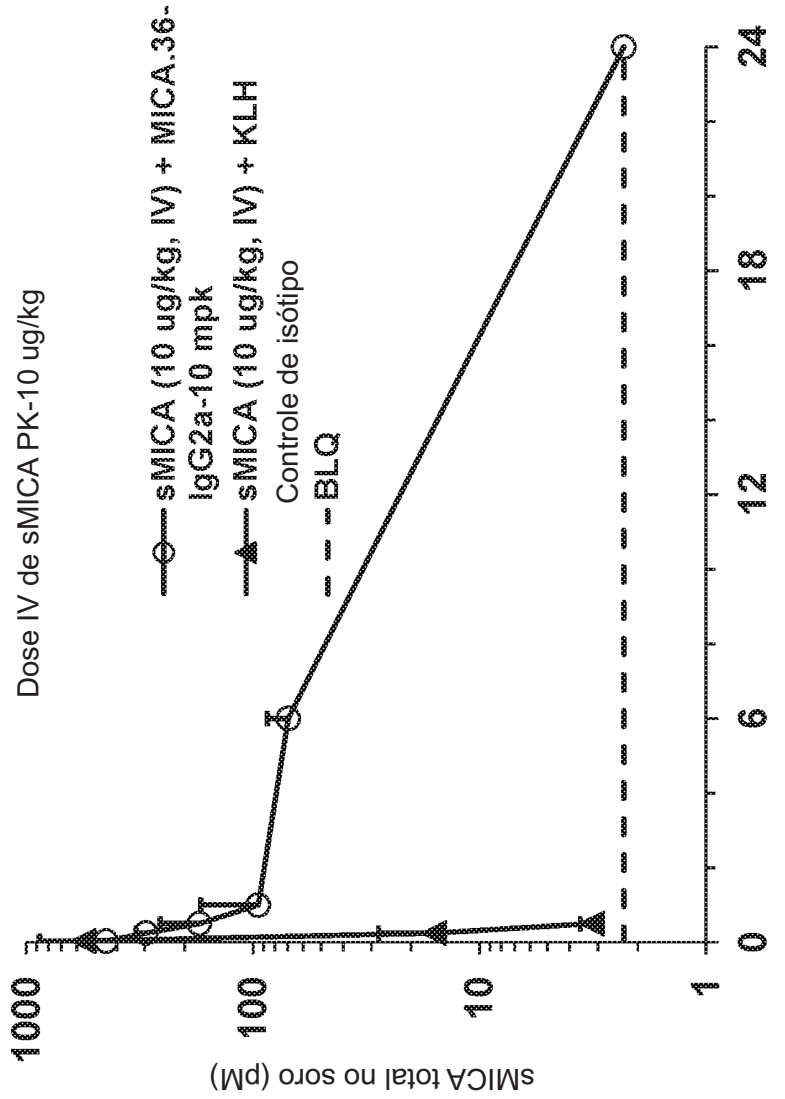

Dose IV de sMICA PK-10 ug/kg
sMICA (10 ug/kg, IV) + MICA.36-IgG2a-10 mpk
sMICA (10 ug/kg, IV) + KLH
Controle de isótipo
BLQ
sMICA total no soro (pM)
1000
100
10
1
0
6
12
18
24
Tempo (h)

FIG. 26

RESUMO

Patente de Invenção: **“ANTICORPOS CONTRA MICA E/OU MICB E USOS DOS MESMOS”.**

A presente invenção refere-se a anticorpos que se ligam especificamente a MICA/B humano e métodos de uso dos mesmos. Em alguns aspectos, a descrição é direcionada a métodos de tratamento de um câncer em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo anti-MICA/B.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p248961.TXT
- Data de Geração do Código: 11/09/2020
- Hora de Geração do Código: 10:36:57
- Código de Controle:
  - Campo 1: 6E7D51BE694DEAD9
  - Campo 2: DCE596C762E074ED