(11) Número de Publicação: **PT 2282772 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/28 (2013.01) ***C07K 16/30*** (2013.01)
A61K 39/275 (2013.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2009.04.23**

(30) Prioridade(s): **2008.04.23 EP 08155011**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.02.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.01.08**
046/2014

(73) Titular(es):
STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING
PLESMANLAAN 125 1066 CX AMSTERDAM NL

(72) Inventor(es):
TIMO KARS VAN DEN BERG NL

(74) Mandatário:
ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA
AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA
PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REFORÇAR O SISTEMA IMUNITÁRIO**

(57) Resumo:
A INVENÇÃO REFERE-SE AO CAMPO DA MEDICINA MOLECULAR. EM PARTICULAR, REFERE-SE A COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REFORÇAR A ELIMINAÇÃO DE CÉLULAS ABERRANTES, E.G. CÉLULAS CANCEROSAS OU CÉLULAS INFECTADAS POR VÍRUS, POR PARTE DO SISTEMA IMUNITÁRIO DO HOSPEDEIRO. É FORNECIDA UMA COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE (I) UM COMPOSTO TERAPÊUTICO CAPAZ DE ESTIMULAR CÉLULAS EFECTORAS IMUNITÁRIAS DO HOSPEDEIRO CONTRA UMA CÉLULA ABERRANTE, POR EXEMPLO, UM ANTICORPO TERAPÊUTICO, E (II) PELO MENOS UM AGENTE CAPAZ DE REDUZIR OU PREVENIR A TRANSDUÇÃO DE SINAL INIBITÓRIO INICIADA VIA SIRPALFA.

DESCRIÇÃO

«COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REFORÇAR O SISTEMA IMUNITÁRIO»

[0001] A invenção refere-se ao campo da medicina molecular. Em particular, refere-se a composições e métodos para reforçar a eliminação de células aberrantes, *e.g.* células cancerosas ou células infectadas por vírus, por parte do sistema imunitário do hospedeiro. Entre outros, oferece uma maior eficácia de tratamento de sujeitos humanos com um anticorpo terapêutico, em particular através de um aumento da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC).

[0002] O sistema imunitário defende o corpo contra a infecção, doenças e substâncias estranhas. É composto por muitos órgãos e células. Um antigénio é uma substância que leva o sistema imunitário a produzir uma resposta específica, denominada uma resposta imunitária. Vírus, bactérias, germes e parasitas contêm substâncias que não estão normalmente presentes no corpo e que, por isso, causam uma resposta imunitária. A resposta imunitária pode conduzir à destruição do antigénio e do que quer que este faça parte ou ao qual esteja ligado. Vários tipos diferentes de células estão envolvidos na resposta do sistema imunitário a um antigénio. Entre as células estão macrófagos, granulócitos, células dendríticas, células NK (Natural Killer) e linfócitos. Entre os linfócitos estão células B (linfócitos B), células T (linfócitos T), linfócitos T citotóxicos e linfócitos T adjuvantes.

[0003] As células de cancro têm substâncias nas respectivas superfícies exteriores que podem actuar como antigénios e assim "marcam" as células como diferentes ou anormais. Vírus, bactérias e parasitas têm componentes que são substancialmente diferentes de células humanas normais porque são realmente estranhos ao corpo e são detectados pelo sistema imunitário. Contudo, as diferenças entre células de cancro e células humanas normais podem ser mais difíceis de detectar pelo sistema imunitário. As imunoterapias oncológicas, tipicamente empregando anticorpos monoclonais, são concebidas de modo a auxiliar o sistema imunitário a reconhecer células de cancro e/ou a reforçar a resposta imunitária às células de cancro e, deste modo, destruir o cancro.

[0004] Várias estratégias terapêuticas em seres humanos baseiam-se no uso de anticorpos terapêuticos. Isto inclui, por exemplo, o uso de anticorpos terapêuticos desenvolvidos para depleção de células alvo, particularmente células doentes, como células infectadas por vírus, células tumorais ou outras células patogénicas. Estes anticorpos são tipicamente anticorpos monoclonais, do tipo IgG, tipicamente com a porção Fc da IgGl ou IgG3 humana. Estes anticorpos podem ser nativos ou anticorpos recombinantes, anticorpos humanizados de rato (*i. e.* compreendendo domínios funcionais de várias espécies, tipicamente a porção Fc de origem primata humana ou não humana, e região variável ou região de determinação complementar (CDR) de origem murina). Em alternativa, o anticorpo monoclonal pode ser totalmente humano através da imunização de ratos transgénicos no *locus* de Ig humana ou obtido através de bibliotecas de cDNA derivadas de células humanas. Um exemplo particular

destes anticorpos terapêuticos é rituximab (Mabthera™; Rituxan), que é um anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20 produzido com regiões constantes γ1 e κ humanas (ou seja, com a porção Fc da IgGl humana) ligadas a domínios variáveis de urina que conferem especificidade CD20. Nos últimos anos, o rituximab modificou consideravelmente a estratégia terapêutica contra doenças malignas B-linfoproliferativas, particularmente linfomas não Hodgkin (NHL). Outros exemplos de anticorpos de IgGl humanizados incluem alemtuzumab (Campath™, que é usado no tratamento de doenças malignas de células B ou trastuzumab (Herceptin™), que é usado no tratamento do cancro da mama.

[0005] Os anticorpos terapêuticos obtêm o respectivo efeito terapêutico através de vários mecanismos. Estes podem ter efeitos directos na produção de apoptose ou morte celular programada, por exemplo, em células tumorais. Eles podem bloquear receptores de factor de crescimento, suspendendo efectivamente a proliferação de células tumorais.

[0006] Os efeitos indirectos incluem recrutar células que têm citotoxicidade, como monócitos e macrófagos. Este tipo de eliminação de células mediada por anticorpos é denominado citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC). Os anticorpos monoclonais podem igualmente ligar o complemento, levando a toxicidade celular directa, conhecida como citotoxicidade dependente do complemento (CDC).

[0007] Embora os anticorpos terapêuticos representem uma abordagem inovadora específica e eficiente à terapêutica humana, particularmente no tratamento de tumores, eles

não apresentam sempre uma eficácia forte. Por exemplo, embora o rituximab, isoladamente ou em combinação com quimioterapia, tenha revelado eficácia no tratamento de NHL de grau intermédio e de grau elevado, 30% a 50% dos doentes com NHL de grau baixo não têm qualquer resposta clínica a rituximab. Foi sugerido que o nível de expressão de CD20 em células de linfoma, a presença de elevada carga tumoral no momento do tratamento ou concentrações séricas reduzidas de rituximab podem explicar a falta de eficácia do rituximab nalguns doentes. Não obstante, as causas reais de falha de tratamento permanecem largamente desconhecidas. Há assim necessidade na arte de um aumento na eficácia dos anticorpos terapêuticos.

[0008] Igualmente, tendo em conta o grande número de anticorpos que têm sido testados em indicações de cancro, poder-se-ia pensar que os anticorpos anticancro incluiriam a maioria de agentes presentes na lista de fármacos aprovados pela FDA. Contudo, apenas 4 em 12 terapêuticas de anticorpos nesta lista são direccionados para terapêutica anticancro e isto parece dever-se largamente à ausência de benefícios para o doente. Curiosamente, está a tornar-se claro que uma das razões principais para isto é que as células de cancro (tal como os respectivos homólogos saudáveis) são relativamente resistentes a mecanismos de eliminação imunomediados. O mecanismo desta aparente resistência das células cancerosas contra a imunidade do hospedeiro ainda não foi determinado.

[0009] Um objectivo da presente invenção é assim identificar os meios e métodos de reforço da imunidade e imunoterapia contra células aberrantes, por exemplo, células de cancro. Em particular, é um objectivo reforçar

a eficácia *in vivo* de um composto terapêutico que pode estimular células efectoras imunitárias do hospedeiro contra uma célula aberrante.

[0010] Curiosamente, os presentes inventores descobriram um mecanismo endógeno que limita a eliminação de células aberrantes, *e.g.* células de cancro, pelas células efectoras imunitárias (ver Figura 1). Este mecanismo envolve a interacção molecular entre CD47, que está presente na superfície de praticamente todas as células dentro do corpo do hospedeiro, incluindo células de cancro, e SIRPα, que é especificamente expressa em células imunitárias, em particular em macrófagos e granulócitos (Adams *et al.*, 1998. J.Immunol. 161:1853-18592). Significativamente, bloquear a interacção entre CD47 e SIRPα com anticorpos antagonistas contra qualquer um dos dois componentes revelou aumentar dramaticamente a eliminação *in vitro* de células de cancro na presença de anticorpos de célula anticancro (Figura 2). Este efeito foi confirmado num modelo murino de tumor pulmonar em ratos mutantes para SIRPα (Figura 3). Estes dados mostram que a ligação de CD47 a SIRPα gera um sinal inibitório que suprime a ADCC pelo sistema imunitário. Embora não pretendamos ficar limitados pela teoria, coloca-se a hipótese de que a interferência com o sinal inibitório via SIRPα leva a um aumento da actividade de células efectoras imunitárias contra células aberrantes, presumivelmente através de um aumento do mecanismo de ADCC.

[0011] Um aspecto da invenção refere-se, assim, a uma composição que compreende (i) um composto terapêutico que pode estimular células efectoras imunitárias do

hospedeiro contra uma célula aberrante e (ii) pelo menos um agente capaz de reduzir ou prevenir a transdução do sinal inibitório iniciado via SIRPα. Por exemplo, é usado um agente que é capaz de inibir a interacção entre SIRPα e CD47, de forma a reduzir o sinal inibitório através da interacção CD47–SIRPα. Um hospedeiro é um mamífero, de preferência um primata ou roedor, mais preferencialmente um sujeito humano.

[0012] O composto terapêutico é um anticorpo terapêutico, em particular um anticorpo que induz ou promove citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Como aqui usado, ADCC pretende englobar também a fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP). O referido anticorpo terapêutico é capaz de formar um complexo imunitário. Numa modalidade, o anticorpo terapêutico tem uma porção Fc de IgG de primata humano ou não humano. Preferencialmente, o anticorpo terapêutico é um anticorpo monoclonal ou um fragmento funcional ou um derivado destes, mais preferencialmente um anticorpo humanizado, humano ou quimérico. O referido fragmento ou derivado deste é, de preferência, seleccionado de entre um fragmento Fab, um fragmento F(ab')2, uma CDR e um scFv. Numa modalidade particular, o anticorpo terapêutico é um anticorpo terapêutico aprovado pela FDA, como por exemplo rituximab, herceptina, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab ou panitumumab. Ver por exemplo Strome *et al.*, Oncologist 2007;12; 1084-1095.

[0013] De acordo com a invenção, é usado um agente capaz de reduzir ou prevenir a transdução de sinal inibitório iniciado via SIRPα para bloquear parcial ou plenamente o sinal inibitório através do complexo CD47–SIRPα. Agentes

capazes de reduzir ou prevenir a transdução de sinal inibitório iniciado via SIRPα, *e.g.* inibir a interacção entre SIRPα e CD47, são conhecidos na arte e ainda podem ser identificados outros agentes usando técnicas conhecidas baseadas numa leitura de eventos de sinalização a jusante. Por exemplo, sabe-se que a interacção de CD47 associada às células com a SIRPα expressa na superfície de células mielóides causa a fosforilação em tirosina SIRPα e promove o recrutamento e/ou activação das tirosina fosfatases SHP-1 e SHP-2, assim como um número de outras proteínas de sinalização da parte citoplasmática da proteína SIRPα (Oldenborg PA *et al.* (2000) Science 288: 2051-4, Oshima *et al.* (2002) FEBS letters 519:1-7). Sabe-se que estes componentes, e em particular a SHP-1, e talvez também a SHP-2, medeiam os efeitos negativos da estimulação da SIRPα em relação a vários efeitos a jusante, incluindo a fagocitose de anticorpos ou glóbulos vermelhos revestidos de complemento (Oldenborg PA *et al.* (2001) J Exp Med. 193:855-62) e é expectável que medeiem igualmente a regulação inibitória da ADCC. Agentes terapêuticos que inibam a interacção CD47-SIRPα irão igualmente prevenir o recrutamento e/ou activação de SHP-1, SHP-2 e/ou de algumas das outras moléculas de sinalização indicadas. Uma substância para reduzir ou prevenir a transdução de sinal inibitório iniciado pelas interacções CD47-SIRPα humanas durante a ADCC pode ser seleccionada usando uma série de ensaios com o objectivo de detectar: i) a redução das interacções CD47-SIRPα em geral (Liu *et al.* (2007) J Mol Biol. 365:680-93, Liu *et al.* (2004) J. Immunol. 172:2578-85) (Figura 4); ii) a redução da fosforilação em tirosina dependente de CD47 da SIRPα, e/ou recrutamento de SHP-1 para SIRPα e activação resultante da actividade da tirosina fosfatase SHP-1

(Oldenborg PA *et al.* (2000) Science 288:2051-4); e/ou iii) o reforço da ADCC usando anticorpos terapêuticos (*e.g.* trastuzumab, rituximab) contra células tumorais (Mimura K *et al.* (2007) Oncology. 72:172-80, Shimadoi S *et al.* (2007) Cancer Sci. 98:1368-72, Lefebvre ML *et al.* (2006) J Immunother. 29:388-97) ou outras células (*e.g.* glóbulos vermelhos).

[0014] A publicação WO99/40940 divulga ligandos de CD47 e agentes de ligação aos referidos ligandos, tais como anticorpos de CD47 e SIRPα, para o tratamento de doenças inflamatórias, auto-imunes e alérgicas, rejeição de enxerto e/ou leucemia linfocítica crónica.

[0015] Foi relatado que a ligação da SIRPα a fragmentos Fab de anticorpos específicos pode suprimir a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos (Van den Berg *et al.*, J. Leukocyte Biol. 1999; pg. 16).

[0016] A publicação WO02/092784 refere-se a polinucleótidos e polipéptidos referentes à modulação das interacções SIRPα-CD47.

[0017] Armant *et al.* revelam que os anticorpos monoclonais anti-CD47 suprimem selectivamente a libertação de IL-12 por monócitos (J. Exp. Med. Vol. 190, 1999, pg.1175-1181).

[0018] Van den Berg *et al.* reportam que macrófagos activados são a principal causa de lesões nos tecidos durante a inflamação no SNC. Foram seleccionados três anticorpos que se ligam ao receptor da SIRPα no rato (J. Neuroimmunology, Vol. 90, 1998, pg. 53).

[0019] A publicação US2003/0026803 divulga um método para tratamento de uma doença auto-imune com envolvimento de macrófagos, compreendendo a administração de um agente que inibe a interacção entre CD47 e SIRPα. São aqui igualmente descritos métodos para identificar estes agentes.

[0020] Contudo, a utilização de um agente inibitório de CD47/SIRPα como aqui divulgado, nomeadamente para reforçar as células efectoras imunitárias de um hospedeiro, não foi divulgada ou sugerida na arte.

[0021] Um "agente" ou "antagonista", como aqui designado, pode ser substancialmente qualquer molécula ou processo capaz de obter a função requerida, nomeadamente reduzir ou prevenir a supressão induzida por CD47/SIRPα da resposta citolítica e/ou fagocitária das células efectoras imunitárias (ver Fig. 1). Esta função é adequadamente conseguida inibindo ou interferindo com a interacção CD47-SIRPα. "Inibir" a interacção CD47/SIRPα significa que a relação funcional entre as duas moléculas é alterada de modo a reduzir ou eliminar os efeitos de supressão da eliminação no macrófago pela CD47. Por exemplo, a interacção biológica entre SIRPα e CD47 pode ser reduzida ou alterada, evitando assim a sinalização inibitória induzida pela SIRPα. Em alternativa, a sinalização inibitória através da SIRPα pode ser evitada sem afectar realmente a interacção com a CD47. É fornecido um anticorpo ou um fragmento de anticorpo que antagoniza com CD47/SIRPα, em que o referido anticorpo é um anticorpo anti-CD47 ou anti-SIRPα ou um fragmento destes, e ainda um outro anticorpo terapêutico que compreende uma porção Fc

de IgG de primata humano ou não humano que induz citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), para uso no tratamento de cancro, em que o referido anticorpo antagonizante reforça a destruição mediada por anticorpos de células tumorais estimuladas pelo referido anticorpo terapêutico adicional.

[0022] São conhecidas na arte uma variedade de tipos de moléculas inibitórias que podem ser usadas como base para a concepção de agentes de acordo com a presente invenção. Podem ser usados um ou mais agentes de um tipo igual ou diferente (*e.g.* molécula pequena e anticorpo). Numa modalidade, uma composição compreende uma substância proteica capaz de inibir a interacção entre a SIRPα e CD47. É um péptido, um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

[0023] Anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser prontamente preparados e testados como descrito abaixo, usando técnicas conhecidas na arte. Por exemplo, uma composição compreende como antagonista da sinalização induzida por CD47/SIRPα um anticorpo anti-CD47, um anticorpo anti-SIRPα ou um fragmento destes.

[0024] Agentes inibitórios de CD47/SIRPα adequados para uso na presente invenção podem ser seleccionados usando um ensaio *in vitro* (rendimento elevado) envolvendo co-incubação de células tumorais e macrófagos na presença de um anticorpo terapêutico contra as células tumorais e o teste da eficácia de agentes candidatos, *e.g.* um painel de anticorpos monoclonais contra quer CD47, quer SIRPα, para reforçar a eliminação dependente de anticorpos. Ver igualmente o Exemplo 1. Por exemplo, a fagocitose e

citólise de células cultivadas de cancro da mama humano por macrófagos derivados de monócitos (MDM) humanos ou linhas de células mielomonocíticas mediadas por um anticorpo terapêutico podem ser estabelecidas na presença e ausência de um agente antagonista candidato. Estes sistemas de teste são conhecidos na arte. Por exemplo, monócitos purificados podem ser cultivados com GM-CSF, M-CSF ou nenhuma citocina durante cinco ou seis dias. Podem ser realizados ensaios de fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e citólise (ADCC) com as células alvo positivas para MDM e HER-2/neu (SK-BR-3). A ADCP pode ser determinada por citometria de fluxo fluorescente bicolor usando PKH2 (corante fluorescente verde) e anticorpos monoclonais (MoAb) de ficoeritrina conjugada (vermelho) contra CD14 e CD11b humanas. A ADCC pode ser determinada adequadamente com ensaios de libertação de 51-Cr radioactivo consagrados, ou pelo kit de detecção de LDH não radioactivo comercial. Contudo, podem igualmente ser usados outros métodos.

[0025] Como deve ser compreendido, a presente invenção é vantajosamente usada para aumentar a eficácia *in vivo* de um composto terapêutico que pode estimular células efectoras imunitárias de um hospedeiro contra qualquer tipo de célula aberrante. Como aqui usado, "célula aberrante" refere-se a qualquer célula doente ou de algum modo indesejada num organismo hospedeiro.

[0026] Numa modalidade, é uma célula de cancro. Por exemplo, é uma célula de linfoma não Hodgkin, uma célula de cancro da mama, uma célula de leucemia linfocítica crónica ou uma célula de cancro colorrectal.

[0027] Claramente, o bloqueio das interacções CD47-SIRPα pelos antagonistas adequados constitui uma grande promessa para reforçar a destruição mediada por anticorpos de células de cancro. Principalmente, o valor acrescido de resolver as limitações da terapêutica com anticorpos contra o cancro pode ocorrer, pelo menos, a três níveis de distintos:

1. Ao baixar o limiar de eliminação de células de cancro, é possível reduzir a posologia e/ou frequência de tratamento com anticorpo, resultando numa redução de custos significativa. Isto é relevante, já que a produção de terapêuticas com anticorpos, que são geralmente proteínas recombinantes humanizadas, é dispendiosa.
2. As taxas de cura e sobrevivência podem aumentar significativamente aumentando a eficácia geral da terapêutica com anticorpos.
3. Aumentar a ADCC pode ter um efeito dramático na potencial gama de terapêuticas com anticorpos adequada para aplicação clínica. Muitos anticorpos terapêuticos, que de outro modo não teriam efeitos benéficos, podem revelar-se eficazes em combinação com os antagonistas da CD47-SIRPα. De facto, várias terapêuticas com anticorpos que, até ao momento, não demonstraram actividade suficiente em ensaios poderão ser reconsideradas.

[0028] Um dos pontos fortes do conceito da presente invenção reside na sua ampla aplicabilidade. Em princípio, pode esperar-se que esta potencie os efeitos de qualquer anticorpo terapêutico contra o cancro, em particular aqueles que exercem os seus efeitos, pelo menos

parcialmente, através de ADCC. Além disso, anticorpos terapêuticos que não revelaram qualquer componente de ADCC na ausência de interferência da CD47-SIRPα, podem ser capazes de elevar uma resposta de ADCC benéfica mediante bloqueio das interacções CD47-SIRPα. Como indicado atrás, a maior parte dos anticorpos terapêuticos aprovados pela FDA são da subclasse IgG1 humana, sendo, em princípio, considerados indutores eficientes da ADCC. Assim, a presente invenção pode ser executada em combinação com a maioria dos anticorpos terapêuticos.

[0029] Uma modalidade da invenção refere-se ao uso de um agente capaz de reduzir ou evitar a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPα, que inibe a interacção entre SIRPα e CD47, na preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de uma doença ou perturbação que pode beneficiar do aumento da fagocitose por macrófagos. Doenças exemplares que poderiam beneficiar do aumento da fagocitose por macrófagos incluem cancro, por exemplo linfoma não Hodgkin, cancro da mama, leucemia linfocítica crónica ou cancro colorrectal.

[0030] De facto, o tratamento ou profilaxia de qualquer doença ou perturbação em que estão envolvidas células aberrantes ou de algum modo indesejadas, pode beneficiar do uso de um agente inibitório como o aqui divulgado. Num aspecto, a referida doença é uma infecção viral, em particular uma infecção causada por um elemento da família *Poxviridae*. Como será compreendido, pode ser usado um agente inibitório ou uma combinação de dois ou mais agentes inibitórios diferentes, no fabrico de um medicamento em combinação com um composto terapêutico adicional. Numa modalidade preferida, o referido composto

terapêutico adicional pode estimular células efectoras imunitárias de um hospedeiro contra uma célula aberrante.

[0031] Num aspecto, a invenção refere-se a um método para aumentar a ADCC num sujeito a receber tratamento anti-cancro, o referido método compreendendo administrar ao referido sujeito antes, durante ou após a administração de um medicamento anti-cancro, um agente capaz de reduzir ou impedir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPα numa quantidade suficiente para aumentar a ADCC. Por exemplo, o referido medicamento anti-cancro é um anticorpo terapêutico que inibe a interacção entre SIRPα e CD47. O sujeito a ser tratado é, por exemplo, um doente que sofra de linfoma não Hodgkin, cancro da mama, leucemia linfocítica crónica ou cancro colorrectal.

[0032] Num aspecto relacionado, é fornecido um método para aumentar a ADCC num sujeito a receber tratamento com anticorpo terapêutico, o referido método compreendendo administrar ao referido sujeito antes, durante ou após a administração do referido anticorpo terapêutico, um agente capaz de reduzir ou impedir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPα numa quantidade suficiente para aumentar a ADCC.

[0033] Igualmente, a invenção fornece um método de aumento da eficácia de um tratamento com anticorpo terapêutico num sujeito, o referido método compreendendo administrar ao referido sujeito antes, durante ou após a administração do referido anticorpo terapêutico, um agente capaz de reduzir ou impedir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPα.

[0034] Igualmente divulgado é o uso de um agente capaz de reduzir ou impedir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPα para o tratamento ou profilaxia de uma infecção viral. Em geral, qualquer método que promove uma resposta mais eficaz do sistema imunitário do hospedeiro ao vírus é provável que aumente a sua imunidade natural e adquirida (*e.g.* pela vacinação) contra o vírus. É divulgado o uso de um agente capaz de inibir a interacção entre a SIRPα e CD47 para o fabrico de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de doença causada pelo vírus da varíola. Os poxvírus (membros da família *Poxviridae*) podem infectar como uma família tanto animais vertebrados como invertebrados. O protótipo da família poxvírus é o *vaccinia virus*, que foi usado como uma vacina bem sucedida para erradicar o vírus da varíola. O *vaccinia virus* é igualmente usado como uma ferramenta eficaz para expressão de proteína estranha para obter/desencadear uma resposta imunitária forte do hospedeiro. O nome da família, *Poxviridae*, é uma herança do agrupamento original de vírus associados a doenças que produzem varíola na pele. A classificação viral moderna baseia-se no formato e características moleculares dos vírus, e o vírus da varíola continua a ser o membro mais notável da família. O único outro poxvírus que se sabe infectar especificamente humanos é o vírus *molluscum contagiosum* (MCV). Embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) tenha declarado o vírus oficialmente erradicado em 1977, após o 11 de Setembro de 2001 os governos americano e britânico

[0035] levantaram a preocupação da possibilidade de uso do vírus da varíola ou outro similar no bioterrorismo.

[0036] Foi estabelecido que os poxvírus codificam um homólogo da CD47, designado CD47 viral (vCD47). Os presentes inventores colocam a hipótese de que a vCD47 ao interagir com a SIRPα em células efectoras imunitárias, em adição à CD47 endógena, pode fornecer sinais negativos que evitam a eliminação e/ou fagocitose de células infectadas por poxvírus. É divulgada uma composição que compreende (i) um composto terapêutico que pode estimular células efectoras imunitárias de um hospedeiro contra uma célula infectada por um vírus, como uma célula infectada por poxvírus, e (ii) pelo menos um agente capaz de reduzir ou prevenir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPα. Compostos terapêuticos adequados incluem vacinas virais, de preferência uma vacina contra os poxvírus.

[0037] Igualmente divulgado é o uso de um agente inibitório para reduzir ou prevenir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPalfa, por exemplo induzida pela interacção vCD47-SIRPα, para (i) aumentar a resistência natural do hospedeiro à infecção com agentes patogénicos poxvirais, (ii) para aumentar a eficácia da vacinação contra patogénicos poxvirais e/ou (iii) para aumentar a eficácia da vacinação com vectores poxvirais, como o *vaccinia*.

LEGENDAS DAS FIGURAS

[0038]

Figura 1: Modelo para o papel da CD47 e SIRPα na limitação da eliminação dependente de anticorpos de células tumorais pelo sistema imunitário e potenciação da destruição de células tumorais através do bloqueio

das interacções CD47-SIRPα. Anticorpos dirigidos contra as células tumorais são reconhecidos pelos receptores Fc da célula imunitária e isto induz a eliminação de células tumorais. Em condições normais (painel esquerdo) esta eliminação induzida por anticorpos é limitada pela interacção da CD47 nas células tumorais com SIRPα na célula imunitária, que gera um sinal intracelular que regula negativamente a resposta de eliminação. Ao bloquear a interacção entre CD47 e SIR-Pα (painel direito) a eliminação induzida por anticorpos de células tumorais é reforçada porque é libertada desta limitação.

Figura 2: Bloquear as interacções CD47-SIRPα com anticorpos monoclonais antagonistas aumenta a fagocitose celular dependente do anticorpo CC52 de células de carcinoma do cólon CC531 de rato pelos macrófagos NR8383 de rato. Células tumorais CC531 e macrófagos NR8383 foram incubados em placas de cultura com meio na ausência ou presença de anticorpo CC52 contra células CC531 e/ou anticorpos monoclonais de bloqueio contra quer CD47 quer SIRPα. Após 1,5 horas foi determinada a percentagem de ADCP. Para mais detalhes, ver Exemplo 1.

Figura 3: sinais derivados de SIRPα limitam a eliminação de células tumorais B16 *in vivo*. Foram injectadas células de melanoma B16 que expressam CD47 em ratos de controlo (*i.e.* tipo selvagem) ou em ratos sem cauda citoplasmática da SIRPα que medeia a sinalização intracelular em células imunitárias (*i.e.* SIRPα-/-). Os grupos de ratos foram tratados em dias alternados durante 2 semanas com uma dose subóptima de

anticorpo terapêutico TA99 dirigido contra o antigénio tumoral gp75 presente nas células B16. Uma semana depois os animais foram sacrificados e a carga tumoral pulmonar foi determinada. Imagens representativas (painel A) dos pulmões destes ratos mostram que não há essencialmente qualquer formação tumoral nos ratos mutantes/SIRPα- tratados com anticorpo quando comparados com ratos de tipo selvagem tratados com anticorpo, identificando um papel negativo da sinalização SIRPα na eliminação de células tumorais *in vivo*. Cada ponto no gráfico (painel B) representa a avaliação de um único animal. *, $p<0,005$, teste T de student.

Figura 4: A ADCC de monócitos humanos dirigida a células Jurkat de leucemia aguda de células T é reforçada bloqueando as interacções CD47-SIRPα.

(A) Expressão superficial de CD3 (usando mAb de CLB-T3/4.2a) e CD47 (usando mAb de B6H12) e nas células Jurkat conforme avaliado por citometria de fluxo.

(B) ADCC de monócitos humanos dirigida a células Jurkat após pré-incubação com IgG_{2a} murina anti-CD3 (20 mg/ml) e/ou B6H12 (50 mg/ml) anti-CD47 $F(ab')_2$.

A saturação de células Jurkat com anti-CD47 $F(ab')_2$ foi confirmada por citometria de fluxo com coloração paralela (dados não representados). Note-se que não é induzida virtualmente qualquer eliminação pelo anti-CD3 na ausência de bloqueio do CD47-SIRPα, ao passo que são evocados níveis substanciais de eliminação na presença de $F(ab')_2$ anti-CD47. Os valores representados são as médias ± DP (n=3) de uma experiência representativa de entre três.

Figura 5: A ADCC mediada por rituximab de monócitos humanos dirigida a células de linfoma de células B de Burkitt (Raji) é reforçada pelo bloqueio das interacções CD47-SIRPα. (A) A expressão superficial de CD20 (usando Rituximab anti-CD20) e CD47 (usando mAb de B6H12 anti-CD47) e nas células Raji como avaliado por citometria de fluxo. O histograma vermelho representa o controlo e o histograma azul representa o Rituximab (histograma superior) ou coloração de CD47 (histograma inferior). (B) ADCC de monócitos humanos dirigida a células Raji após pré-incubação com Rituximab (20 mg/ml) e/ou B6H12 (10 mg/ml) anti-CD47. ADCC foi realizada numa razão efector:alvo de 50:1. Note-se que a eliminação mediada por Rituximab das células Raji é significativamente reforçada pelo mAb anti-CD47. Os valores representados são as médias ± DP (n=3) de uma experiência representativa. * diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

[0039] A invenção é exemplificada pelos seguintes exemplos.

Exemplo 1: Evidência *in vitro* do papel das interacções CD47-SIRPα na ADCC.

[0040] De modo a investigar a contribuição da interacção CD47-SIRPα durante a ADCC de células tumorais por macrófagos, foi empregue um ensaio no qual células de carcinoma do cólon de rato CC531 foram incubadas com anticorpo CC52 e macrófagos de células efectoras murinas NR8383.

Materiais e Métodos:

[0041] Células de carcinoma do cólon CC531 de rato e macrófagos alveolares murinos NR8383 foram cultivados rotineiramente em meio RPMI-1640 contendo soro fetal de vitela a 10% (FCS) (Gibco BRL) e antibióticos. As CC531 foram soltas dos frascos de tecido por raspagem, lavadas em PBS e marcadas com 5 mM de DiI (Sondas Moleculares) durante 15' à temperatura ambiente. Após a lavagem, as células CC531 3,75 x 10^5, pré-incubadas ou não durante 15' com 5 mg/ml de anticorpo CD47 anti-murino OX101, foram incubadas numa placa plástica de fundo redondo de cultura tecidular com 96 poços em 200 ml de RPMI-1640 com tampão HEPES contendo BSA a 0,5%, com células NR8383 1,25 x 10^5, pré-incubadas ou não durante 15' com 5 mg/ml de ED9 de anticorpo SIRPα anti-murino ou seus fragmentos Fab', na presença ou ausência de CC52 de mAb reactivas a CC531 (1 mg/ml). Após incubação durante 90' a 37°C as células foram lavadas e coradas usando o anticorpo biotinilado específico do macrófago ED3 (dirigido contra sialoadesina de rato) e estreptavidina marcada com FITC. ADCP (expressa como a % de NR8383 que ingeriu células CC531 marcadas com DiI) foi determinada num citómetro de fluxo FACScan (Becton & Dickinson).

Resultados:

[0042] Na ausência de anticorpos de bloqueio contra CD47 (OX101) ou SIRPα (ED9) é observado muito pouca fagocitose celular dependente de anticorpo, ao passo que na presença desses anticorpos as CC531 são prontamente fagocitadas (Fig. 2). Isto mostra que as interacções entre CD47-

SIRPα em células, respectivamente, tumorais e efectoras de macrófagos pode regular negativamente a ADCC *in vitro*.

Exemplo 2: Evidência *in vivo* do papel da sinalização de SIRPα na eliminação de células tumorais dependentes de anticorpos.

[0043] De modo a demonstrar que a SIRPα fornece sinais que inibem a eliminação de células tumorais *in vivo* comparámos a eliminação de células tumorais dependentes de anticorpo em ratos de tipo selvagem e ratos mutantes para SIRPα (Yamao (2002) J Biol Chem. 277:39833-9) usando um modelo de melanoma de ratos B16F10 *in vivo* (Bevaart L *et al.* (2006) Cancer Res. 66:1261-4). Os ratos mutantes SIRPα carecem de cauda citoplasmática completa, incluindo os motivos ITIM que actuam como locais de acoplamento para SHP-1 e SHP-2.

Materiais e Métodos:

[0044] Ratos jovens adultos (7 semanas de idade) de tipo selvagem e ratos mutantes para SIRPα C57B1/6 (Yamao (2002) J Biol Chem. 277:39833-9) foram injectados i.v. com células de melanoma B16F10 1,5 x 10^5 (em 100 mL de solução salina; obtidas no National Cancer Institute (Frederick, MD), na ausência ou presença do anticorpo terapêutico TA99 (10 mg/rato nos dias 0, 2, 4, 7, 9 e 11 após injecção de células tumorais). Após 21 dias os animais foram sacrificados, e o número de metástases e carga tumoral nos pulmões foram determinados como descrito (Bevaart L *et al.* (2006) Cancer Res. 66:1261-4).

Resultados:

[0045] Como pode ser observado na Figura 3, observou-se um nível significativamente inferior de desenvolvimento tumoral em ratos mutantes para SIRPα quando comparados com ratos de tipo selvagem usando concentrações subóptimas de anticorpo monoclonal terapêutico TA99. Estes resultados demonstram que o SIRPα é um regulador negativo da eliminação de células tumorais *in vivo*.

Exemplo 3:

[0046] Para fornecer provas adicionais do papel negativo das interacções CD47-SIRPα na eliminação de células tumorais por células mielóides, realizámos um ensaio de ADCC empregando células Jurkat de leucemia de células T que expressam CD47 humana, opsonizadas com um anticorpo anti-CD3 de IgG_{2a} murina (Van Lier RA *et al.* Eur J Immunol. 1987;17:1599-1604) como um alvo (Fig. 4A) e monócitos que expressam SIRPα humana como células efectoras, e usámos isto para testar o efeito de anticorpos que bloqueiam as interacções CD47-SIRPα.

Ensaio de ADCC

[0047] Monócitos foram isolados por separação celular magnética usando esferas revestidas com anti-CD14 de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec B.V., Utrecht, Países Baixos) a partir de PBMC isolado por centrifugação com gradiente de densidade usando Percoll isotónico (Pharmacia Uppsala, Suécia) a partir de sangue heparinizado obtido de voluntários saudáveis. As células foram cultivadas durante 16 h em RPMI completo

suplementado com 5 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (Pepro Tech Inc, USA), colhidas através de tratamento suave com tripsina e lavadas. Células Jurkat (5-8x10^6 células) foram colhidas e marcadas com 100mCi ^{51}Cr (Perkin-Elmer, USA) em 1 ml durante 90 min. a 37°C. Onde indicado, as células foram pré-incubadas com anti-CD47 e/ou anti-CD3 e lavadas novamente. Monócitos foram colhidos e inoculados em placas de cultura tecidular de base em U com 96 poços em RPMI com 10% de meio FCS. As células alvo (A) (5 x 10^3/poço) e as células efectoras (E) foram co-cultivadas em placas de cultura tecidular de base em U com 96 poços em meio completo numa razão E:A=50:1 durante 4 horas a 37°C, 5% CO_2. Alíquotas de sobrenadante foram colhidas e analisadas quanto à radioactividade num contador gama. A citotoxicidade relativa percentual foi determinada como [(cpm experimental - cpm espontâneo)/ (cpm Total - cpm espontâneo)] x 100%. Todas as amostras foram testadas em triplicado.

Resultados:

[0048] Como pode ser observado na Fig. 4B, a ADCC mediada por anti-CD3 contra células Jurkat, que expressam níveis elevados de CD47 à superfície (Fig. 4A), é potencial e sinergicamente reforçada por concentrações saturantes de fragmentos F(ab)'$_2$ do anticorpo B6H12 que bloqueia a ligação de CD47 a SIRPα. Notavelmente, na ausência de anticorpo efector anti-CD3, não foi observado qualquer efeito do F(ab)'$_2$ anti-CD47, sugerindo que as interacções CD47-SIRPα actuam selectivamente de modo a restringir os efeitos mediados pelo receptor Fc e anticorpos na eliminação de células tumorais.

[0049] Em conjunto, estes dados demonstram que as interacções CD47–SIRPα e os sinais intracelulares resultantes gerados via SIRPα em células mielóides, formam uma barreira à destruição mediada por anticorpos de células tumorais. Estes resultados fornecem a fundamentação para empregar antagonistas da interacção CD47–SIRPα em doentes oncológicos, com o propósito de reforçar a eficácia clínica dos anticorpos terapêuticos anticancro.

Exemplo 4: Bloquear as interacções CD47–SIRPα reforça o efeito de anticorpos terapêuticos anticancro.

[0050] De modo a demonstrar que o bloqueio das interacções CD47–SIRPα reforça realmente o efeito de anticorpos terapêuticos anticancro estabelecidos, desenvolvemos um ensaio de ADCC usando células humanas de linfoma de células B de Burkitt (Raji) como alvo, monócitos humanos como células efectoras e um anticorpo terapêutico aprovado pela FDA contra a CD20 (Rituximab). Para detalhes experimentais, veja a legenda da Figura 5. Como pode ser observado na Figura 5, o anticorpo de bloqueio contra a CD47, B6H12, foi capaz de reforçar significativamente a citotoxicidade mediada por Rituximab dirigida contra células Raji.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo ou um fragmento de anticorpo que antagoniza a CD47/SIRPα, em que o referido anticorpo é um anticorpo anti-CD47 ou anti-SIRPα ou fragmento destes, e ainda um outro anticorpo terapêutico que compreende uma porção Fc de IgG de primata humano ou não humano que induz citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), para uso no tratamento oncológico, em que o referido anticorpo antagonizante reforça a destruição mediada por anticorpo de células tumorais estimuladas pelo referido anticorpo terapêutico adicional.

2. Um anticorpo antagonizante da CD47/SIRPα ou fragmento de anticorpo e um outro anticorpo terapêutico de acordo com a reivindicação 1 para uso segundo a reivindicação 1, em que o referido anticorpo antagonizante é um antagonista da interacção CD47/SIRPα.

3. Um anticorpo antagonizante da CD47/SIRPα ou fragmento de anticorpo e um outro anticorpo terapêutico de acordo com as reivindicações 1 ou 2 para uso segundo as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo antagonizante é um anticorpo anti-CD47 ou um fragmento deste.

4. Um anticorpo antagonizante da CD47/SIRPα ou fragmento de anticorpo e um outro anticorpo terapêutico de acordo com as reivindicações 1 ou 2 para uso segundo as reivindicações 1 ou 2, em que o referido anticorpo antagonizante é um anticorpo anti-SIRPα ou um fragmento deste.

5. Um anticorpo antagonizante da CD47/SIRPα ou fragmento de anticorpo e um outro anticorpo terapêutico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 para uso segundo qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o referido fragmento de anticorpo é um fragmento Fab, fragmento F(ab')2 ou um scFv.

6. Um anticorpo antagonizante da CD47/SIRPα ou fragmento de anticorpo e um outro anticorpo terapêutico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5 para uso segundo qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o referido outro anticorpo terapêutico é seleccionado do grupo composto por rituximab, herceptina, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab e panitumumab.

7. Um anticorpo antagonizante da CD47/SIRPα ou fragmento de anticorpo e um outro anticorpo terapêutico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 para uso segundo qualquer uma das reivindicações 1-6, em que o referido anticorpo antagonizante é administrado antes, simultaneamente ou após a administração do referido outro anticorpo terapêutico.

8. Uma composição compreendendo (i) um anticorpo ou fragmento de anticorpo que antagoniza a CD47/SIRPα, em que o referido anticorpo é um anticorpo anti-CD47 ou anti-SIRPα ou fragmento destes, e (ii) ainda um outro anticorpo terapêutico, em que o referido outro anticorpo terapêutico é seleccionado do grupo composto por rituximab, herceptina, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab e panitumumab.

9. Uma composição de acordo com a reivindicação 8, em que o referido anticorpo antagonizante é um antagonista da interacção CD47/SIRPα.

10. Uma composição de acordo com a reivindicação 8 ou 9, em que o referido anticorpo antagonizante é um anticorpo anti-CD47 ou um fragmento deste.

11. Uma composição de acordo com a reivindicação 8 ou 9, em que o referido anticorpo antagonizante é um anticorpo anti-SIRPα ou um fragmento deste.

12. Uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, em que o referido fragmento de anticorpo é um fragmento Fab, fragmento F(ab')2 ou um scFv.

Lisboa,

RESUMO

«COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REFORÇAR O SISTEMA IMUNITÁRIO»

A invenção refere-se ao campo da medicina molecular. Em particular, refere-se a composições e métodos para reforçar a eliminação de células aberrantes, *e.g.* células cancerosas ou células infectadas por vírus, por parte do sistema imunitário do hospedeiro. É fornecida uma composição que compreende (i) um composto terapêutico capaz de estimular células efectoras imunitárias do hospedeiro contra uma célula aberrante, por exemplo, um anticorpo terapêutico, e (ii) pelo menos um agente capaz de reduzir ou prevenir a transdução de sinal inibitório iniciada via SIRPalfa.

Figura 1

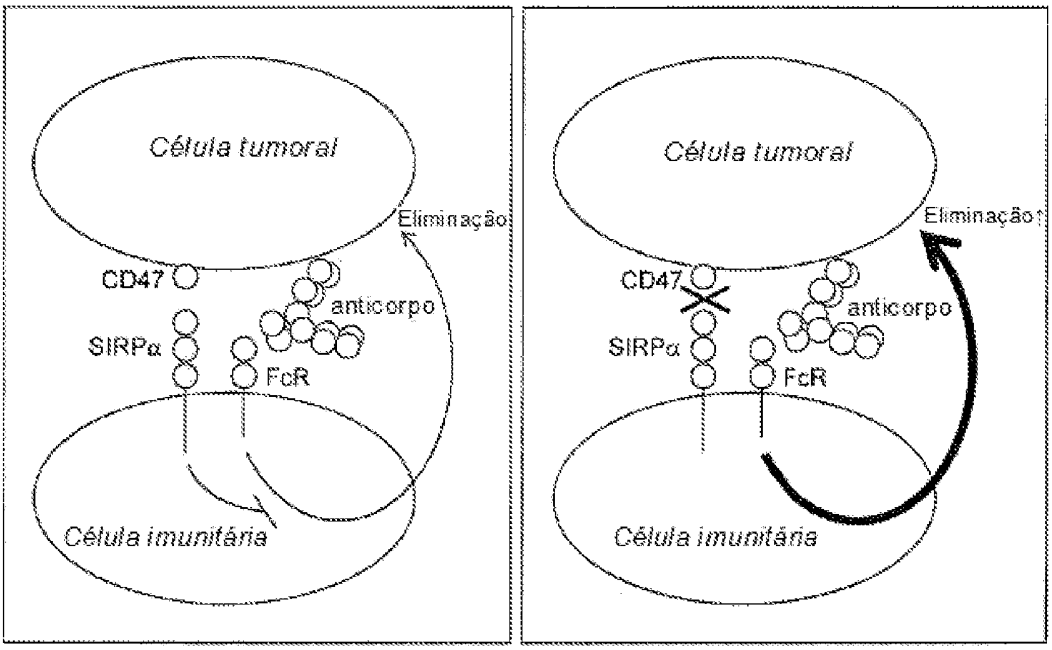

Célula tumoral
Eliminação
CD47
anticorpo
SIRPα
FcR
Célula imunitária
Célula tumoral
Eliminação↑
CD47
anticorpo
SIRPα
FcR
Célula imunitária

Figura 2

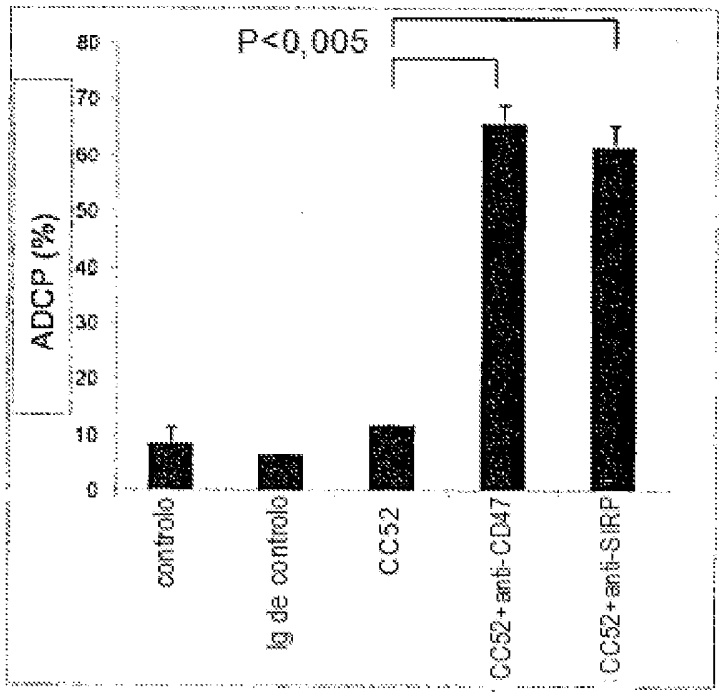

P<0,005
ADCP (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
controlo
Ig de controlo
CC52
CC52+anti-CD47
CC52+anti-SIRP

Figura 3

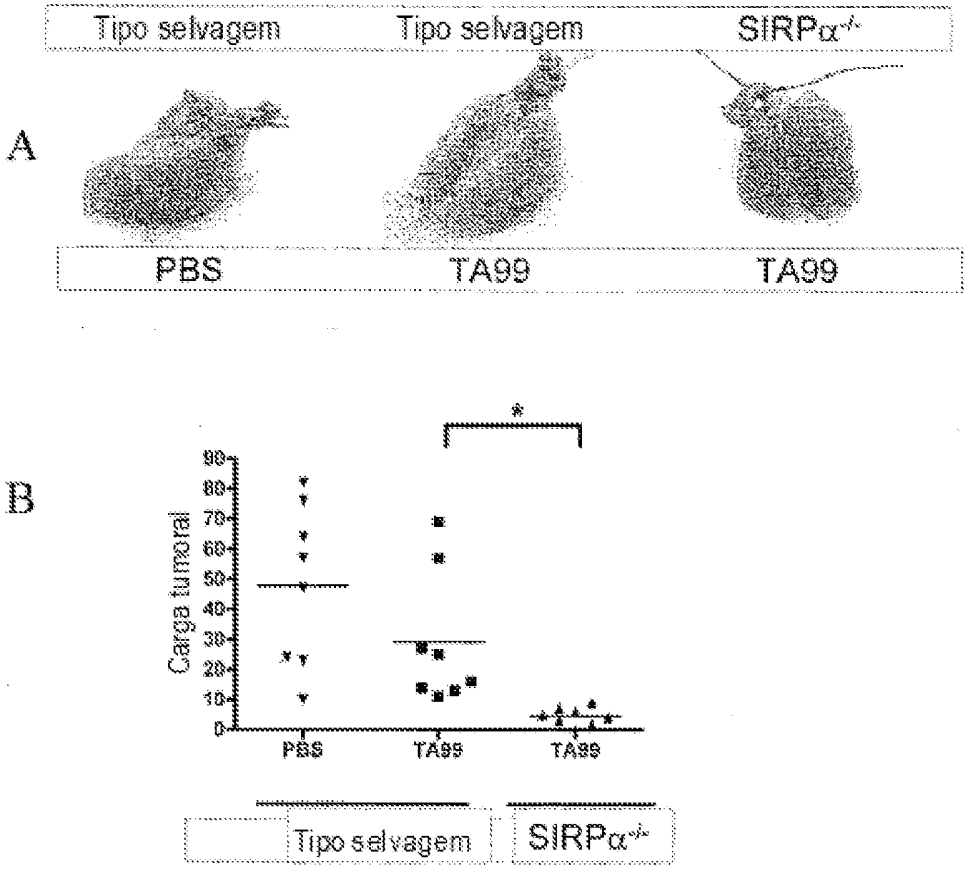

A
Tipo selvagem
Tipo selvagem
SIRPα-/-
PBS
TA99
TA99
B
*
Carga tumoral
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
PBS
TA99
TA99
Tipo selvagem
SIRPα-/-

Figura 4

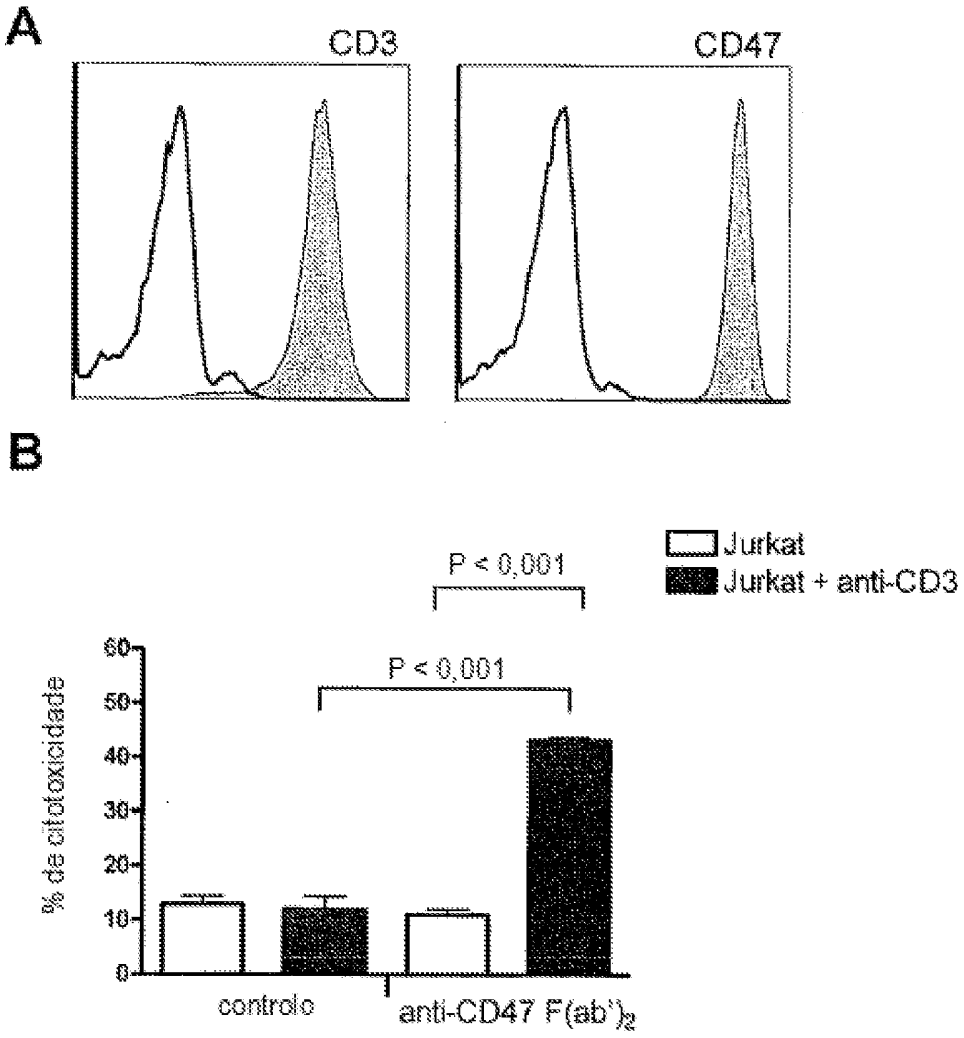
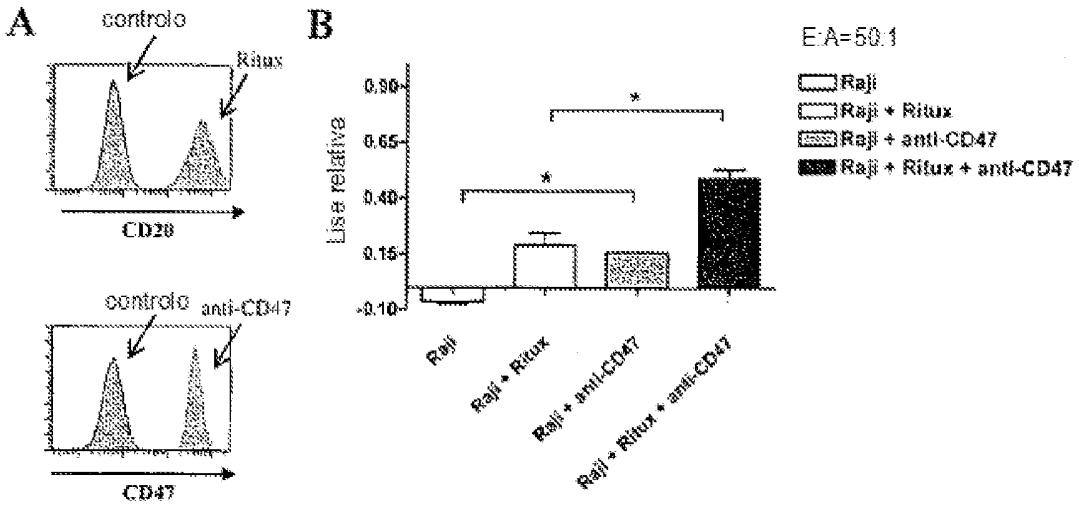

A
CD3
CD47
B
Jurkat
Jurkat + anti-CD3
P < 0,001
P < 0,001
% de citotoxicidade
60
50
40
30
20
10
0
controlo
anti-CD47 F(ab')2

Figura 5


A
controlo
Ritux
CD20
controlo
anti-CD47
CD47
B
Lisis relativa
0.90
0.65
0.40
0.15
-0.10
*
*
Raji
Raji + Ritux
Raji + anti-CD47
Raji + Ritux + anti-CD47
E:A=50:1
Raji
Raji + Ritux
Raji + anti-CD47
Raji + Ritux + anti-CD47