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

(21) BR 112020011949-0 A2

(22) Data do Depósito: 14/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/11/2020

(54) Título: TRATAMENTO DE DOENÇAS MONOGÊNICAS COM UM ANTICORPO ANTI-CD45RC

(51) Int. Cl.: A61K 39/395; C07K 16/28; A61P 21/00; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: 15/12/2017 EP 17306783.6.

(71) Depositante(es): INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE); CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES; UNIVERSITÉ DE NANTES.

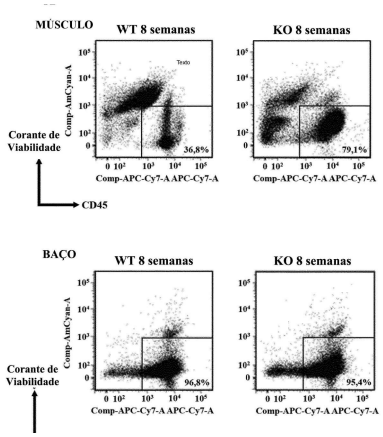
(72) Inventor(es): CAROLE GUILLONNEAU; IGNACIO ANEGON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018085016 de 14/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/115791 de 20/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 15/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção se refere a anticorpos anti-CD45RC, para uso no tratamento de doenças monogênicas causadas por genes não associados à função imune, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes (tais como genes deficientes na distrofia muscular de Duchenne (DMD) fibrose cística, doenças lisossômicas e deficiência de a1-anti-tripsina); ou causada por genes envolvidos no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes (tais como genes deficientes em imunodeficiências primárias de células T, tal como IPEX (síndrome ligada ao X de enteropatia poliendocrinopatia por imunodesregulação), APECED (distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica), imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto inflamatória e autoimune mista, síndrome de febre periódica hereditária associada ao NLRP12, e síndrome periódica associada ao receptor do fator de necrose tumoral 1).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"TRATAMENTO DE DOENÇAS MONOGÊNICAS COM UM ANTICORPO ANTI-CD45RC"**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção se refere ao uso de anticorpos anti-CD45RC para prevenção e/ou tratamento de doenças monogênicas tais como distrofia muscular de Duchenne (DMD) ou distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica (APECED), e sintoma associado.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] As doenças monogênicas são causadas por defeitos de um único gene. Mais de 4000 doenças humanas são causadas por esses defeitos ligados a um gene em particular. Até agora, a maioria das opções de tratamento gira em torno do tratamento dos sintomas dos distúrbios, na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A terapia gênica, isto é, uma forma de tratamento em que um gene saudável é introduzido no corpo de um paciente, é a principal esperança para tratamentos duráveis desses tipos de doenças. No entanto, grandes obstáculos foram encontrados durante o desenvolvimento de técnicas para a entrega de genes às células apropriadas afetadas pelo distúrbio.

[0003] Entre as doenças monogênicas, algumas estão ligadas a genes envolvidos no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes. Um

exemplo de tal doença é a distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica (APECED). Outras doenças monogênicas estão ligadas a genes não associados a funções imunes, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes. Um exemplo de tal doença é a distrofia muscular de Duchenne (DMD).

[0004] A DMD é uma doença monogênica em que mutações do gene DMD que codifica a proteína distrofina levam à distrofia muscular grave ligada ao X, que afeta todos os músculos voluntários, bem como o coração e os músculos respiratórios em estágios posteriores.

[0005] As respostas imunes estão envolvidas na patofisiologia da doença em pacientes com DMD e em camundongos mdx que têm a mesma mutação de distrofina que pacientes humanos (para uma revisão, ver Rosenberg *et al.*, 2015. *Sci Transl Med.* 7(299): 299rv4). O tratamento padrão dos pacientes com DMD utiliza corticoides, tal como a prednisolona. Em camundongos mdx, também foram utilizados tratamentos que diminuem respostas imunes efetoras ou inflamação, tais como imunoglobulinas intravenosas, tranilast, indutores de heme oxigenase-1, antagonista do receptor de IL-1 e IL-2 para amplificar as células T reguladoras (T_{regs}) (Rosenberg *et al.*, 2015. *Sci Transl Med.* 7(299): 299rv4; Villalta *et al.*, 2014. *Sci Transl Med.* 6(258): 258ra142).

[0006] No entanto, apesar dos novos tratamentos promissores recentes, a expectativa de vida média dos pacientes com DMD ainda é severamente reduzida. Portanto, permanece a necessidade de um tratamento capaz de reduzir ou inibir as respostas imunes em DMD e em doenças relacionadas.

[0007] As doenças autoimunes são causadas pelo colapso da autotolerância que leva a uma disfunção do sistema imune e é a causa de sérias consequências incapacitantes e até fatais. Um melhor conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na tolerância representa um grande desafio para melhorar a compreensão e o tratamento de doenças autoimunes.

[0008] Um participante chave nesse equilíbrio é o AIRE, um regulador de transcrição que permite a expressão de antígenos restritos a tecidos (TRA) em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) e a deleção de células T auto-reativas.

[0009] A distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica (APECED), também conhecida como síndrome poliglandular autoimune tipo I (APS 1), é uma doença autoimune autossômica recessiva de múltiplos órgãos rara, causada por mutações no gene AIRE.

[0010] Em humanos, esse gene está localizado no locus 21q22.3 e mais de 100 mutações foram descritas como causadoras de APECED com uma prevalência de 1-9:1000000

(Orphanet, http://www.orpha.net), essa prevalência sendo aumentada em certas populações, como finlandeses, noruegueses, sardos e judeus iranianos. Entre os sardos, por exemplo, a super-representação da mutação R139X está presente em 90% dos pacientes com APECED.

[0011] O fenótipo clínico da APECED é geralmente definido pela presença de 2 dos 3 principais sintomas: hipoparatireoidismo, insuficiência adrenal (doença de Addison) e candidíase muco-cutânea crônica (CMC). Essa doença também está associada a múltiplas características autoimunes e ectodérmicas, tais como diabetes tipo 1, hipoplasia do esmalte, vitiligo, insuficiência ovariana prematura, ceratite, anemia perniciosa, alopecia, pancreatite exócrina, doença pulmonar intersticial, nefrite e outros distúrbios.

SUMÁRIO

[0012] Aqui, os inventores demonstraram que o tratamento de ratos *Dmd*$_{mdx}$ com anticorpos anti-CD45RC pode ser usado para tratar DMD agindo especificamente em células que expressam CD45RC (aqui designadas como células CD45RC^{+}) e, em particular, agindo em células que expressam altos níveis de CD45RC (aqui designadas como células CD45RC$_{alto}$ ou células CD45RC$^{+}{}_{alto}$).

[0013] Além disso, os inventores mostraram que a administração a ratos *Aire*$^{-/-}$ (KO) de um anticorpo monoclonal

anti-CD45RC resulta em uma forte depleção dos linfócitos T CD45RC$_{alto}$, e na inibição dos sintomas característicos de APECED.

[0014] A presente invenção se refere a um anticorpo anti-CD45RC, para uso na prevenção e/ou tratamento de doenças monogênicas selecionadas do grupo que compreende:

- doenças monogênicas causadas por um gene que não está associado à função imune, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes, e selecionadas a partir de distrofia muscular de Duchenne (DMD), fibrose cística, doenças lisossômicas e deficiência de α1-anti-tripsina; e/ou

- doenças monogênicas causadas por um gene envolvido no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes e selecionadas a partir de síndrome ligada ao X por enteropatia poliendocrinopatia por imunodesregulação, (IPEX), distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica (APECED), célula B imunodeficiências primárias, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto inflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada ao NLRP12 e síndrome periódica associada ao receptor do fator de necrose tumoral 1.

[0015] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo monoclonal.

[0016] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo monoclonal anti-CD45RC humano.

[0017] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo quimérico, um anticorpo biespecífico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano.

[0018] Em algumas modalidades, a prevenção e/ou o tratamento de doenças monogênicas compreende redução, alívio, diminuição e/ou inibição de sintomas ou sinais associados às referidas doenças monogênicas, preferencialmente de sintomas ou sinais autoimunes e/ou inflamatórios.

[0019] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC esgota as células T $CD45RC_{alto}$.

[0020] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo multiespecífico compreendendo um primeiro sítio de ligação ao antígeno direcionado contra CDR45RC e pelo menos um segundo sítio de ligação ao antígeno direcionado contra uma célula efetora capaz de mediar o esgotamento de células T $CD45RC_{alto}$ através de ligação direta, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou fagocitose dependente de anticorpo.

[0021] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC é conjugado a uma fração citotóxica.

[0022] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC está na forma de uma composição farmacêutica

compreendendo o referido anticorpo anti-CD45RC e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[0023] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC deve ser administrado em combinação com um medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório.

[0024] Em algumas modalidades, o referido anticorpo anti-CD45RC deve ser administrado em combinação com terapia gênica ou terapia celular.

[0025] Em algumas modalidades, a referida terapia gênica ou terapia celular deve ser administrada antes ou após a administração do referido anticorpo anti-CD45RC, preferencialmente antes da administração do referido anticorpo anti-CD45RC.

[0026] Em algumas modalidades, a referida doença monogênica é selecionada a partir de DMD, fibrose cística, doenças de armazenamento lisossômico e deficiência de α1-anti-tripsina, de preferência a referida doença monogênica é DMD.

[0027] Em algumas modalidades, a referida doença monogênica é selecionada a partir de IPEX, APECED, imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto inflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada ao NLRP12 e síndrome periódica associada ao receptor do fator de

necrose tumoral 1, preferencialmente a referida doença monogênica é APECED.

DEFINIÇÕES

"**Anticorpo**" ou "**Imunoglobulina**"

[0028] Como aqui utilizado, os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" se referem a uma proteína que possui uma combinação de duas cadeias pesadas e duas leves, independentemente de possuir ou não alguma imunorreatividade específica relevante. "Anticorpos" se refere a tais conjuntos que possuem atividade imunorreativa específica significativa conhecida a um antígeno de interesse (por exemplo, SEQ ID NO: 1). O termo "anticorpos anti-CD45RC" é usado aqui para se referir a anticorpos que exibem especificidade imunológica para a proteína CD45RC humana. Conforme explicado em outra parte deste documento, a "especificidade" para CD45RC não exclui reação cruzada com espécies homólogas de CD45RC.

[0029] Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina", como aqui utilizados, também se destinam a abranger fragmentos de ligação a anticorpos.

[0030] Também será apreciado que os termos "anticorpo" e "imunoglobulina", como aqui utilizados, abrangem anticorpos modificados ou fragmentos de ligação a anticorpos, usando métodos conhecidos. Por exemplo, para retardar a depuração *in vivo* e obter um perfil

farmacocinético mais desejável, um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo pode ser modificado com polietilenoglicol (PEG). Os métodos para acoplar e conjugar o PEG especificamente a um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo são descritos em, por exemplo, Leong *et al*., 2001. Cytokine. 16(3): 106-19; Delgado *et al*., 1996. Ir. J. Cancer. 73(2): 175-82.

[0031] Anticorpos e imunoglobulinas compreendem cadeias leves e pesadas, com ou sem uma ligação covalente entre cadeias. As estruturas básicas de imunoglobulina nos sistemas vertebrados são relativamente bem compreendidas. O termo genérico "imunoglobulina" compreende cinco classes distintas de anticorpos que podem ser distinguidos bioquimicamente. Embora a discussão a seguir seja geralmente direcionada para a classe IgG de moléculas de imunoglobulina, todas as cinco classes de anticorpos estão dentro do escopo da presente invenção. No que diz respeito à IgG, as imunoglobulinas compreendem duas cadeias polipeptídicas leves idênticas de peso molecular de cerca de 23 kDa e duas cadeias pesadas idênticas de peso molecular de cerca de 53-70 kDa. As quatro cadeias são unidas por ligações dissulfeto em uma configuração "Y" em que as cadeias leves suportam as cadeias pesadas começando na boca do "Y" e continuando através da região variável. As cadeias leves de um anticorpo são classificadas como kappa (κ) ou lambda (λ). Cada classe

de cadeia pesada pode ser ligada com uma cadeia leve κ ou λ. Em geral, as cadeias leve e pesada são ligadas covalentemente entre si, e as regiões de "cauda" das duas cadeias pesadas são ligadas entre si por ligações dissulfeto covalentes ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente modificadas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos correm de um terminal N nas extremidades bifurcadas da configuração Y até o terminal C no fundo de cada cadeia. Os especialistas na técnica compreenderão que as cadeias pesadas são classificadas como gama (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) ou epsilon (ε) com algumas subclasses entre elas (por exemplo, γ1-γ4). É a natureza dessa cadeia que determina a “classe” do anticorpo como IgG, IgM, IgA IgD ou IgE, respectivamente. As subclasses ou "isotipos" de imunoglobulina (por exemplo, IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc.) são bem caracterizados e são conhecidos por conferir especialização funcional. Versões modificadas de cada uma dessas classes e isotipos são facilmente discerníveis para os especialistas na técnica em vista da presente divulgação e, portanto, estão dentro do escopo da presente invenção. Como indicado acima, a região variável de um anticorpo permite que o anticorpo reconheça seletivamente e se ligue especificamente a epítopos em antígenos. Ou seja, o domínio variável de cadeia leve (domínio V_L) e o domínio variável de

cadeia pesada (domínio V_H) de um anticorpo combinam-se para formar a região variável que define um local de ligação ao antígeno tridimensional. Essa estrutura de anticorpo quaternário forma o local de ligação ao antígeno presente no final de cada braço do "Y". Mais especificamente, o local de ligação ao antígeno é definido por três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) em cada uma das cadeias V_H e V_L.

"Fragmentos de ligação a anticorpos"

[0032] O termo "fragmento de ligação a anticorpo", como aqui utilizado, se refere a uma parte ou região de um anticorpo, que compreende menos resíduos de aminoácidos que o anticorpo inteiro. Um "fragmento de ligação" liga um antígeno (por exemplo, SEQ ID NO: 1) e/ou compete com todo o anticorpo do qual foi derivado para ligação ao antígeno. Os fragmentos de ligação a anticorpos englobam, sem limitação, anticorpos de cadeia única, anticorpos diméricos de cadeia única, anticorpos de domínio único, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab)'2, Fd, anticorpos defucosilados, anticorpos bi-específicos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos, só para citar alguns.

[0033] Um "anticorpo de cadeia única" se refere a qualquer anticorpo ou fragmento do mesmo que é uma proteína que possui uma estrutura primária que compreende ou consiste em uma sequência ininterrupta de resíduos de aminoácidos contíguos, incluindo, sem limitação (1) moléculas de Fv de

cadeia única (scFv); (2) proteínas de cadeia única contendo apenas um domínio variável de cadeia leve, ou um fragmento do mesmo que contém as três CDRs do domínio variável de cadeia leve, sem uma fração de cadeia pesada associada; e (3) proteínas de cadeia única contendo apenas uma região variável de cadeia pesada, ou um fragmento da mesma contendo as três CDRs da região variável de cadeia pesada, sem uma fração de cadeia leve associada.

[0034] Um "Fv de cadeia única", também abreviado como "sFv" ou "scFv", se refere a fragmentos de anticorpo que compreendem os domínios de anticorpo V_H e V_L conectados a uma única cadeia de aminoácidos. De preferência, a sequência de aminoácidos scFv compreende ainda um ligante peptídico entre os domínios VH e VL que permite ao scFv formar a estrutura desejada para a ligação ao antígeno (Plückthun, 1994. *Antibodies from Escherichia coli*. In Rosenberg & Moore (Eds.), *The pharmacology of monoclonal antibodies.* Handbook of Experimental Pharmacology, 113: 269-315, Springer: Berlin, Heidelberg).

[0035] Um "Fv" se refere ao fragmento mínimo de anticorpo que contém um local completo de reconhecimento e ligação ao antígeno. Este fragmento consiste em um dímero de uma HCVR e uma LCVR em associação estreita e não covalente. Do dobramento desses dois domínios emanam seis laços hipervariáveis (três laços de cada cadeia, pesada e leve)

que contribuem para a ligação ao antígeno e conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar o antígeno, embora com uma afinidade mais baixa que o local de ligação inteiro.

[0036] Um "diacorpo" se refere a um pequeno fragmento de anticorpo preparado pela construção de fragmentos de scFv com ligantes curtos (cerca de 5 a 10 resíduos) entre a HCVR e LCVR, de modo que o emparelhamento inter-cadeia, mas não intra-cadeia, dos domínios variáveis seja alcançado, resultando em um fragmento bivalente, isto é, fragmento com dois locais de ligação ao antígeno. Os diacorpos biespecíficos são heterodímeros de dois fragmentos de scFv cruzados nos quais a HCVR e LCVR dos dois anticorpos estão presentes em diferentes cadeias polipeptídicas. Os diacorpos estão descritos mais detalhadamente na patente EP0404097, pedido de patente WO1993011161; e Holliger *et al.*, 1993. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(14): 6444-8.

[0037] Os fragmentos de ligação a anticorpos podem ser obtidos usando métodos padrão. Por exemplo, os fragmentos Fab ou F(ab')2 podem ser produzidos por digestão com protease dos anticorpos isolados, de acordo com técnicas convencionais.

"Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo" ou **"ADCC"**

[0038] Conforme usado aqui, os termos "citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo" ou "ADCC" se referem a uma forma de citotoxicidade na qual anticorpos secretados ligados a receptores Fc (FcRs) presentes em certas células citotóxicas (por exemplo, células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos) permitem que essas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo portadora de antígeno e subsequentemente matem a célula alvo. Para avaliar a atividade ADCC de uma molécula de interesse, um ensaio ADCC *in vitro*, como o descrito nas Patentes US 5,500,362 ou US 5,821,337, pode ser realizado.

"Fagocitose dependente de anticorpo" ou **"opsonização"**

[0039] Como usado aqui, os termos "fagocitose dependente de anticorpo" ou "opsonização" se referem à reação mediada por células em que células citotóxicas não específicas que expressam FcγRs reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e subsequentemente causam fagocitose na célula alvo.

"CD45"

[0040] Como usado aqui, o termo "CD45" (também conhecido como CD45R ou PTPRC) se refere a uma glicoproteína transmembranar existente em diferentes isoformas. Essas

isoformas distintas de CD45 diferem em suas estruturas de domínio extracelular que surgem do processamento alternativo de 3 éxons variáveis (éxons 4, 5 e 6) que codificam para os determinantes A, B e C, respectivamente, da região extracelular de CD45. As várias isoformas de CD45 têm diferentes domínios extracelulares, mas têm uma sequência extracelular idêntica proximal à membrana, bem como para o domínio transmembranar e um grande segmento citoplasmático da cauda contendo dois domínios fosfatase altamente conservados e homólogos em tandem, com aproximadamente 300 resíduos. O CD45 e suas isoformas se associam de maneira não covalente à fosfoproteína associada à fosfatase de linfócitos (LPAP) nos linfócitos T e B. Foi relatado que o CD45 está associado a vários outros antígenos da superfície celular, incluindo CD1, CD2, CD3 e CD4. O CD45 está envolvido na sinalização da ativação de linfócitos.

"CD45RC"

[0041] Como usado aqui, o termo "CD45RC" se refere a uma glicoproteína de membrana tipo I de cadeia simples de 200-220 kDa bem conhecida dos especialistas na técnica. CD45RC é uma isoforma de emenda alternativa de CD45 compreendendo o exon 6 que codifica o determinante C (daí a terminologia CD45RC, isto é, CD45 **R**estrito ao determinante **C**), mas faltando os exons 4 e 5, que codificam respectivamente os determinantes A e B. Essa isoforma CD45RC

é expressa em células B, e um subconjunto de células T $CD8_+$ e células T $CD4_+$, mas não nos monócitos $CD8_+$ ou $CD4_+$ T_{reg}, $CD14_+$ ou PMN (Picarda *et al.*, 2017. *JCI Insight*. 2(3): e90088). Embora alguns anticorpos monoclonais possam reconhecer um epítopo na porção do CD45 comum a todas as diferentes isoformas (denominadas anticorpos anti-CD45), outros anticorpos monoclonais têm especificidade restrita a uma dada isoforma, dependendo de qual determinante eles reconhecem (A, B ou C).

"Antígeno celular $CD45RC_+$" ou **"marcador de superfície celular $CD45RC_+$"**

[0042] Conforme usado neste documento, os termos "Antígeno celular $CD45RC_+$" ou "marcador de superfície celular $CD45RC_+$" referem-se a um antígeno (ou epítopo) da sequência SEQ ID NO: 1, que é expresso ou exibido na superfície de uma célula $CD45RC_+$ (incluindo células T, células B e células exterminadoras naturais (NK)) que podem ser direcionadas com um agente anti-CD45RC que a ela se liga (como um anticorpo ou um aptâmero). Marcadores de superfície de células T $CD45RC_+$ exemplares incluem, mas não estão limitados a, CD45RC como descrito anteriormente ou outros antígenos que caracterizam a referida população de células T. O marcador de superfície das células T $CD45RC_+$ de interesse particular é expresso preferencialmente nas células T $CD45RC_+$ em comparação com outras células T não $CD45RC_+$ de um mamífero.

[0043] Então, após o aumento de anticorpos direcionados contra o marcador de superfície celular CD45RC como descrito acima, o especialista na técnica pode facilmente selecionar aqueles que atuam nas células $CD45RC^{+}$ e que podem ser utilizados para esgotar as células $CD45RC_{alto}$ por citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou indução de $CD45RC_{alto}$, mas não morte celular de $CD45RC_{baixo/-}$ (por exemplo, via apoptose) após ligação direta do anticorpo (Picarda *et al.*, 2017. *JCI Insight*. 2(3): e90088).

"CDR" ou **"região determinante de complementaridade"**

[0044] Como aqui utilizado, o termo "CDR" ou "região determinante de complementaridade" significa os locais de combinação de antígenos não contíguos encontrados na região variável dos polipeptídeos das cadeias pesada e leve. As CDRs foram identificadas de acordo com as regras da Tabela 1, deduzidas de Kabat *et al.*, 1991. *Sequences of proteins of immunological interest* (5ª ed.). Bethesda, MD: Dep. de Saúde e Serviços Humanos; e Chothia e Lesk, 1987. *J. Mol Biol*. 196(4): 901-17:

	Região variável de cadeia pesada (HCVR ou V_H)		
	V_H-CDR1	**V_H-CDR2**	**V_H-CDR3**
Início	Aproximadamente no resíduo 26 (sempre 4 após um Cys) de acordo com a definição de Chothia/AbM A definição de Kabat inicia 5 resíduos depois	Sempre 15 resíduos após o final de V_H-CDR1, de acordo com a definição de Kabat/AbM	Sempre 33 resíduos após o final de V_H-CDR2 Sempre 2 resíduos após um Cys
Resíduo antes	Sempre Cys-Xaa-Xaa-Xaa, com Xaa sendo qualquer aminoácido de acordo com a definição de Chothia/AbM	Normalmente, Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, mas várias variações	Sempre Cys-Xaa-Xaa, com Xaa sendo qualquer aminoácido Normalmente, Cys-Ala-Arg

Resíduo depois	Sempre Trp Normalmente, Trp-Val, mas também Trp-Ile ou Trp-Ala	Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala	Sempre Trp-Gly-Xaa-Gly, com Xaa sendo qualquer aminoácido
Comprimento	10 a 12 resíduos conforme definição de AbM A definição de Chothia exclui os últimos 4 resíduos 5 a 7 resíduos de acordo com a definição de Kabat	16 a 19 resíduos de acordo com a definição de Kabat A definição de AbM termina 7 resíduos antes	3 a 25 resíduos

	Região variável de cadeia leve (LCVR ou V_L)		
	V_L-CDR1	**V_L-CDR1**	**V_L-CDR1**
Início	Aproximadamente no resíduo 24	Sempre 16 resíduos após o final de V_L-CDR1	Sempre 33 resíduos após o final de V_L-CDR2 (exceto NEW (PDB ID: 7FAB) que possui a deleção no final de CDR-L2*)
Resíduo antes	Sempre Cys	Geralmente, Ile-Tyr, mas também Val-Tyr, Ile-Lys ou Ile-Phe	Sempre Cys
Resíduo depois	Sempre Trp Normalmente, Trp-Tyr-Gln, mas também Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln ou Trp-Tyr-Leu		Sempre Phe-Gly-Xaa-Gly, com Xaa sendo qualquer aminoácido

Comprimento	10 a 17 resíduos	Sempre 7 resíduos (exceto NEW (PDB: 7FAB) que possui uma deleção nesta região*)	7 a 11 resíduos

* Saul & Poljak, 1992. *Proteins*. 14(3):363-71

TABELA 1

"Anticorpo quimérico"

[0045] Por anticorpo "quimérico", entende-se um anticorpo que contém uma região variável natural (cadeia leve e cadeia pesada) derivada de um anticorpo de uma dada espécie associada a regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada de um anticorpo de uma espécie heteróloga a referida dada espécie. Vantajosamente, se o anticorpo monoclonal de acordo com a invenção for um anticorpo monoclonal quimérico, este último compreende regiões constantes humanas. A partir de um anticorpo não humano, um anticorpo quimérico pode ser preparado usando técnicas recombinantes genéticas bem conhecidas dos especialistas na técnica. Por exemplo, o anticorpo quimérico pode ser produzido por clonagem para a cadeia pesada e a cadeia leve de um DNA recombinante incluindo um promotor e uma sequência que codifica a região variável do anticorpo não humano e uma sequência que codifica a região constante de um anticorpo humano. Quanto aos métodos para a preparação de anticorpos

quiméricos, pode ser feita referência, por exemplo, a Verhoeyn *et al*. (1988. *Science*. 239(4847): 1534-6).

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou **"CDC"**

[0046] Os termos "citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" se referem à lise de uma célula alvo na presença de complemento. A ativação da via clássica do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento a anticorpos que estão ligados ao seu antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio CDC tal como, por exemplo, o descrito em Gazzano-Santoro *et al*., 1997. *J Immunol Methods*. 202(2): 163-71, pode ser realizado.

"Gene deficiente"

[0047] Como usado aqui, o termo "gene deficiente" se refere a um gene que é mutado, ausente ou não funcional. Como consequência, a proteína codificada pelo referido gene deficiente está ausente, ou está presente em uma quantidade minúscula e não eficaz, ou está sob uma forma inativa e mutada.

"Epítopo"

[0048] Como usado aqui, o termo "epítopo" se refere a um arranjo específico de aminoácidos localizado em uma proteína ou proteínas às quais um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo se liga. Os epítopos geralmente consistem em um agrupamento de superfície quimicamente ativo de

moléculas, como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar, e têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Os epítopos podem ser lineares (ou sequenciais) ou conformacionais, isto é, envolvendo duas ou mais sequências de aminoácidos em várias regiões do antígeno que podem não ser necessariamente contíguas.

"Região cristalizável por fragmento" ou **"Fc"**

[0049] Como usado aqui, o termo "região cristalizável por fragmento" ou "Fc" ou "região Fc" abrange os polipeptídeos que compreendem a região constante de um anticorpo, excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina da região constante. Assim, Fc se refere aos dois últimos domínios de imunoglobulina da região constante de IgA, IgD e IgG e aos três últimos domínios de imunoglobulina da região constante de IgE e IgM e ao terminal N da dobradiça flexível para esses domínios.

[0050] Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende os domínios de imunoglobulina Cγ2 e Cγ3 e a dobradiça entre Cγ1 e Cγ2.

[0051] Embora os limites da região Fc possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é geralmente definida para compreender os resíduos C226 ou P230 ao seu terminal carboxil, em que a numeração é de acordo com o índice da UE, conforme Kabat *et al.*, 1991 (*Sequences of*

proteins of immunological interest (5ª ed.). Bethesda, MD: Dep. De Saúde e Serviços Humanos dos EUA). O índice EU, tal como estabelecido em Kabat, se refere à numeração de resíduos do anticorpo EU IgG1 humano, como descrito em Kabat *et al.*, 1991 (supra). Fc pode se referir a essa região isoladamente ou a essa região no contexto de um anticorpo, fragmento de anticorpo ou proteína de fusão Fc.

[0052] O fragmento Fc consiste naturalmente na região constante de cadeia pesada, excluindo o domínio C_H1, isto é, na região limite inferior e nos domínios constantes C_H2 e C_H3 ou C_H2 a C_H4 (dependendo do isotipo).

[0053] No sentido da invenção, o fragmento Fc de um anticorpo pode ser natural ou pode ter sido modificado de várias maneiras, desde que compreenda um domínio funcional para a ligação a receptores FcR (receptores FcγR para IgGs) e, de preferência, um domínio funcional para ligação ao receptor FcRn. As modificações podem incluir a deleção de certas porções do fragmento Fc, desde que este contenha um domínio funcional para ligação aos receptores FcR (receptores FcγR para IgGs) e, de preferência, um domínio funcional para ligação ao receptor FcRn. As modificações do anticorpo ou do fragmento Fc de um anticorpo também podem incluir várias substituições de aminoácidos capazes de afetar as propriedades biológicas do anticorpo, desde que este contenha um domínio funcional para ligação aos

receptores FcR e, de preferência, um domínio funcional para ligação ao receptor FcRn.

[0054] Em particular, quando o anticorpo é uma IgG, ele pode compreender mutações destinadas a aumentar a ligação ao receptor FcγRIII (CD16), como descrito em WO2000042072, WO2004029207, WO2004063351 ou WO2004074455. Mutações que permitem aumentar a ligação ao receptor FcRn e, portanto, a meia-vida *in vivo* do anticorpo, também podem estar presentes, como descrito, por exemplo, em WO2000042072, WO2002060919, WO2010045193 ou WO2010106180. Outras mutações, como aquelas que permitem reduzir ou aumentar a ligação às proteínas do complemento e, portanto, a resposta à Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC), podem estar presentes ou não, como descrito, por exemplo, em WO1999051642 ou WO2004074455.

"Região *Framework*" ou **"FR"**

[0055] Como usado aqui, o termo "região *Framework*" ou "FR" inclui os resíduos de aminoácidos que fazem parte da região variável, mas não fazem parte das CDRs (por exemplo, usando a definição de CDRs de Kabat/Chothia). Portanto, uma região *Framework* variável tem entre cerca de 100-120 aminoácidos de comprimento, mas inclui apenas os aminoácidos fora das CDRs.

[0056] Para o exemplo específico de uma HCVR e para as CDRs, conforme definido por Kabat/Chothia:

- FR1 pode corresponder ao domínio da região variável que abrange os aminoácidos 1-25, de acordo com a definição de Chothia/AbM, ou 5 resíduos posteriormente, de acordo com a definição de Kabat;

- FR2 pode corresponder ao domínio da região variável que abrange os aminoácidos 36-49;

- FR3 pode corresponder ao domínio da região variável que abrange os aminoácidos 67-98; e

- FR4 pode corresponder ao domínio da região variável dos aminoácidos 104-110 até o final da região variável.

[0057] As regiões *Framework* para a cadeia leve são igualmente separadas por cada uma das CDRs da LCVR. Em anticorpos de ocorrência natural, as seis CDRs presentes em cada anticorpo monomérico são sequências curtas e não contíguas de aminoácidos que são posicionadas especificamente para formar o local de ligação ao antígeno, pois o anticorpo assume sua configuração tridimensional em um ambiente aquoso. Os restantes dos domínios variáveis pesados e leves mostram menor variabilidade intermolecular na sequência de aminoácidos e são denominados regiões *Framework*. As regiões *Framework* adotam amplamente uma conformação folha-β e as CDRs formam laços que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura da folha-β. Assim, essas regiões *Framework* atuam para formar um arcabouço que fornece o posicionamento das seis CDRs na orientação correta

por interações não-covalentes entre cadeias. O local de ligação ao antígeno formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epítopo no antígeno imunorreativo. Esta superfície complementar promove a ligação não covalente do anticorpo ao epítopo do antígeno imunorreativo. A posição das CDRs pode ser facilmente identificada por um especialista na técnica.

"Região de cadeia pesada"

[0058] Como usado aqui, o termo "região de cadeia pesada" inclui sequências de aminoácidos derivadas dos domínios constantes de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Uma proteína que compreende uma região de cadeia pesada compreende pelo menos um de um domínio C_H1, um domínio de dobradiça (por exemplo, região de dobradiça superior, média e/ou inferior), um domínio C_H2, um domínio C_H3 ou uma variante ou fragmento dos mesmos. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção pode compreender a região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina (por exemplo, uma porção de dobradiça, um domínio C_H2 e um domínio C_H3). Em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção carece de pelo menos uma região de um domínio constante (por exemplo, todo ou parte de um domínio C_H2). Em certas modalidades, pelo menos um, e de preferência todos os domínios constantes, são derivados de uma cadeia

pesada de imunoglobulina humana. Por exemplo, em uma modalidade preferida, a região de cadeia pesada compreende um domínio de dobradiça totalmente humano. Em outras modalidades preferidas, a região de cadeia pesada compreendendo uma região Fc totalmente humana (por exemplo, sequências de dobradiça, domínios do domínio C_H2 e C_H3 de uma imunoglobulina humana). Em certas modalidades, os domínios constantes constituintes da região de cadeia pesada são de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, uma região de cadeia pesada de uma proteína pode compreender um domínio C_H2 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula de IgG3 ou IgG4. Em outras modalidades, os domínios constantes são domínios quiméricos compreendendo regiões de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, uma dobradiça pode compreender uma primeira região de uma molécula de IgG1 e uma segunda região de uma molécula de IgG3 ou IgG4. Como estabelecido acima, será entendido por um especialista na técnica que os domínios constantes da região de cadeia pesada podem ser modificados de modo que variem na sequência de aminoácidos da molécula de imunoglobulina de ocorrência natural (tipo selvagem). Ou seja, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção pode compreender alterações ou modificações em um ou mais dos domínios constantes de cadeia pesada (C_H1, dobradiça, C_H2 ou C_H3) e/ou

no domínio constante de cadeia leve (CL). Modificações exemplificativas incluem adições, deleções ou substituições de um ou mais aminoácidos em um ou mais domínios.

"Região de dobradiça"

[0059] Como usado aqui, o termo "região de dobradiça" inclui a região de uma molécula de cadeia pesada que une o domínio C_H1 ao domínio C_H2. Esta região de dobradiça compreende aproximadamente 25 resíduos e é flexível, permitindo assim que as duas regiões de ligação ao antígeno N-terminal se movam independentemente. As regiões de dobradiça podem ser subdivididas em três domínios distintos: domínios de dobradiça superior, médio e inferior (Roux *et al.*, 1998. *J Immunol*. 161(8): 4083-90).

"Anticorpo humanizado ou fragmento de ligação do mesmo"

[0060] Um "anticorpo humanizado ou fragmento de ligação do mesmo", como aqui utilizado, se refere a um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação do mesmo que contém uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Inclui anticorpos fabricados por uma célula não humana com regiões variáveis e constantes que foram alteradas para se assemelharem mais a anticorpos que seriam produzidos por uma célula humana, por exemplo, alterando a sequência de aminoácidos de anticorpos não humanos para incorporar os aminoácidos encontrados nas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanizados ou

fragmento de ligação dos mesmos, de acordo com a presente invenção, podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulinas da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs. O termo "anticorpo humanizado ou fragmento de ligação do mesmo" também inclui anticorpos e fragmento de ligação do mesmo nos quais sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências de framework humanas. Em outras palavras, o termo "anticorpo humanizado ou fragmento de ligação do mesmo" se refere a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo no qual as CDRs de um anticorpo humano receptor são substituídas por CDRs de um anticorpo não humano doador, por exemplo, um anticorpo de camundongo. Anticorpos humanizados ou fragmentos de ligação dos mesmos também podem compreender resíduos de origem doadora nas sequências de framework. O anticorpo humanizado ou fragmento de ligação do mesmo também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina humana. Os anticorpos humanizados e fragmentos de ligação dos mesmos também podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências CDR ou FR importadas. A humanização pode ser realizada usando métodos conhecidos na

técnica (por exemplo, Jones *et al.*, 1986. *Nature*. 321 (6069): 522-5; Riechmann *et al.*, 1988. *Nature*. 332(6162): 323-7; Verhoeyen *et al.*, 1988. *Science*. 239(4847): 1534-6; Presta, 1992. *Curr Opin Biotechnol*. 3(4): 394-8; Patente US 4,816,567), incluindo técnicas como anticorpos "super-humanizadores" (por exemplo, Tan *et al.*, 2002. *J. Immunol*. 169(2): 1119-25) e "resurfacing" (por exemplo, Staelens *et al.*, 2006. *Mol Immunol*. 43(8): 1243-57; Roguska *et al.*, 1994. *Proc Natl Acad Sei USA* 91(3): 969-73).

[0061] Os métodos para humanizar o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, de acordo com a presente invenção, são bem conhecidos na técnica e serão detalhados na seção Exemplo abaixo. A escolha de domínios variáveis humanos, leves e pesados, a serem utilizados na produção do anticorpo humanizado ou fragmento de ligação do mesmo é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção é rastreada contra toda a biblioteca de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana que está mais próxima da sequência do camundongo é então aceita como framework humano (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al., 1993. *J. Immunol.* 151(4): 2296-308; Chothia & Lesk, 1987. *J. Mol. Biol.* 196(4): 901-17).

[0062] Outro método para humanizar o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, de acordo com a presente invenção, utiliza uma FR específica da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leves ou pesadas. O mesmo framework pode ser usado para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al*., 1992. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(10): 4285-9; Presta *et al*., 1993. *J Immunol*. 151(5): 2623 -32). É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade por hCD45RC e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados e fragmentos de ligação dos mesmos são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parental e humanizada. Modelos tridimensionais de imunoglobulina estão geralmente disponíveis e são familiares para os especialistas na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção dessas telas permite a análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar ao seu epítopo. Deste modo, os resíduos

de CDR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências de consenso e importação, para que a característica desejada do anticorpo, como uma afinidade aumentada por hCD45RC, seja alcançada. Em geral, os resíduos de CDR estão direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

[0063] Outro método para humanizar o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, de acordo com a presente invenção, é utilizar um animal transgênico ou transcromossômico que transporta partes do sistema imune humano para imunização. Como hospedeiro, esses animais tiveram seus genes de imunoglobulina substituídos por genes funcionais de imunoglobulina humana. Assim, os anticorpos produzidos por esses animais ou em hibridomas produzidos a partir das células B desses animais já são humanizados. Exemplos desses animais transgênicos ou transcromossômicos incluem, sem limitação:

- o XenoMouse (Abgenix, Fremont, CA), descrito nas patentes US 5,939,598, US 6,075,181, US 6,114,598, US 6,150,584 e US 6,162,963;

- o HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.), descrito em Lonberg *et al*., 1994. *Nature*. 368(6474): 856-859; Lonberg e Huszar, 1995. *Int Rev Immunol*. 13(1): 65-93; Harding & Lonberg, 1995. *Ann N Y Acad Sci*. 764: 536-46; Taylor *et al*., 1992. *Nucleic Acids Res*. 20(23): 6287-95; Chen *et al*., 1993. *Int Immunol*.

5(6): 647-56; Tuaillon *et al.*, 1993. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(8): 3720-4; Choi *et al.*, 1993. *Nat Genet*. 4(2): 117-23; Chen *et al.*, 1993. *EMBO J*. 12(3): 821-30; Tuaillon *et al.*, 1994. *J. Immunol*. 152(6): 2912-20; Taylor et al., 1994. *Int Immunol*. 6(4): 579-91; Fishwild *et al.*, 1996. *Nat Biotechnol*. 14(7): 845-51;

- o KM Mouse®, descrito no pedido de patente WO2002043478;

- os TC mice, descritos em Tomizuka *et al.*, 2000. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(2): 722-7; e

- o OmniRat ™ (OMT, Inc.), descrito no pedido de patente WO2008151081; Geurts *et al.*, 2009. *Science*. 325(5939): 433; Menoret *et al.*, 2010. *Eur J. Immunol*. 40(10): 2932-41; Osborn *et al.*, 2013. *J Immunol*. 190(4): 1481-90.

[0064] Os anticorpos humanizados e fragmentos de ligação dos mesmos também podem ser produzidos de acordo com várias outras técnicas, como o uso, para imunização, de outros animais transgênicos que foram modificados para expressar um repertório de anticorpos humanos (Jakobovitz *et al.*, 1993. *Nature*. 362(6417): 255-8) ou por seleção de repertórios de anticorpos usando métodos de exibição de fagos. Tais técnicas são conhecidas do especialista na técnica e podem ser implementadas a partir de anticorpos monoclonais ou fragmentos de ligação dos mesmos, como divulgado no presente pedido.

[0065] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção compreendendo HCVR e LCVR (ou CDRs) pode compreender um primeiro domínio constante (C_H1 e/ou C_L), cuja sequência de aminoácidos é total ou substancialmente humana.

[0066] Em alguma modalidade, especialmente quando o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, de acordo com a presente invenção, é destinado a usos terapêuticos humanos, é típico para toda a região constante, ou pelo menos uma parte dela, ter uma sequência de aminoácidos total ou substancialmente humana. Portanto, um ou mais ou qualquer combinação do domínio C_H1, região de dobradiça, domínio C_H2, domínio C_H3 e domínio C_L (e domínio C_H4 se presente) podem ser total ou substancialmente humanos em relação à sua sequência de aminoácidos. Vantajosamente, o domínio C_H1, região de dobradiça, domínio C_H2, domínio C_H3 e domínio C_L (e domínio C_H4 se presente) podem todos ter uma sequência de aminoácidos total ou substancialmente humana.

[0067] O termo "substancialmente humano", no contexto da região constante de um anticorpo humanizado ou quimérico ou fragmento de ligação do mesmo, se refere a uma identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70%, de preferência pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais com uma região constante humana.

[0068] O termo "sequência de aminoácidos humanos", neste contexto, se refere a uma sequência de aminoácidos que é codificada por um gene da imunoglobulina humana, que inclui linha germinativa, genes reorganizados e somaticamente mutados. A presente invenção também contempla proteínas compreendendo domínios constantes da sequência "humana" que foram alteradas por uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos em relação à sequência humana, exceto aquelas modalidades em que a presença de uma "região de dobradiça totalmente humana" é expressamente necessária.

[0069] A presença de uma "região de dobradiça totalmente humana" no anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, de acordo com a presente invenção, pode ser benéfica tanto para minimizar a imunogenicidade quanto para otimizar a estabilidade do anticorpo. Considera-se que uma ou mais substituições, inserções ou deleções de aminoácidos podem ser feitas dentro da região constante da cadeia pesada e/ou leve, particularmente dentro da região Fc. As substituições de aminoácidos podem resultar na substituição do aminoácido substituído por um aminoácido de ocorrência natural diferente ou por um aminoácido não natural ou modificado. Outras modificações estruturais também são permitidas, como por exemplo alterações no padrão de glicosilação (por exemplo, por adição ou exclusão de locais de glicosilação ligados a N ou O). Dependendo da utilização pretendida do

anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, pode ser desejável modificar o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção no que diz respeito às suas propriedades de ligação aos receptores Fc, por exemplo, para modular a função efetora. Por exemplo, os resíduos de cisteína podem ser introduzidos na região Fc, permitindo assim a formação de ligações dissulfeto inter-cadeia nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter uma função efetora melhorada (Caron *et al*., 1992. *J Exp Med*. 176(4): 1191-5; Shopes, 1992. *J. Immunol*. 148(9): 2918-22).

"Laço hipervariável"

[0070] O termo "laço hipervariável" não é estritamente sinônimo de região determinante de complementaridade (CDR), uma vez que os laços hipervariáveis (HVs) são definidos com base na estrutura, enquanto as CDRs são definidas com base na variabilidade da sequência (Kabat *et al*., 1991. Sequences of proteins of immunological interest (5ª ed.) Bethesda, MD: Dep. de Saúde e Serviços Humanos dos EUA) e os limites dos VHs e CDRs podem ser diferentes em alguns domínios V_H e V_L. As CDRs dos domínios V_L e V_H podem tipicamente ser definidas pela definição de Kabat/Chothia, como já explicado acima.

"Identidade" ou "idêntico"

[0071] Como usado aqui, o termo "identidade" ou "idêntico", quando usado em um relacionamento entre as sequências de duas ou mais sequências de aminoácidos, ou de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos, se refere ao grau de parentesco entre as sequências de aminoácidos ou sequências de ácidos nucleicos, conforme determinado pelo número de correspondências entre cadeias de dois ou mais resíduos de aminoácidos ou resíduos de ácidos nucleicos. "Identidade" mede a porcentagem de correspondências idênticas entre a menor de duas ou mais sequências com alinhamentos de lacunas (se houver) abordados por um modelo matemático específico ou programa de computador (ou seja, "algoritmos").

[0072] A identidade de sequências de aminoácidos ou sequências de ácidos nucleicos relacionadas pode ser facilmente calculada por métodos conhecidos. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, os descritos em Lesk A. M. (1988). *Computational molecular biology: Sources and methods for sequence analysis*. Nova York, NY: Oxford University Press; Smith D.W. (1993). *Biocomputing: Informatics and genome projects*. San Diego, CA: Academic Press; Griffin A.M. & Griffin H.G. (1994). *Computer analysis of sequence data, Part 1*. Totowa, NJ: Humana Press; von Heijne G. (1987). *Sequence analysis in molecular biology: treasure trove or trivial pursuit*. San Diego, CA: Imprensa

acadêmica; Gribskov M.R. & Devereux J. (1991). *Sequence analysis prime*. Nova York, NY: Stockton Press; Carillo *et al*., 1988. *SIAM J. Appl Math*. 48(5): 1073-82.

[0073] Os métodos preferidos para determinar a identidade são projetados para dar a maior correspondência entre as sequências testadas. Os métodos para determinar a identidade são descritos em programas de computador publicamente disponíveis. Os métodos preferidos de programas de computador para determinar a identidade entre duas sequências incluem o pacote de programas GCG, incluindo GAP (Genetics Computer Group, Universidade de Wisconsin, Madison, WI; Devereux *et al*., 1984. *Nucleic Acids Res*. 12(1 Pt 1): 387 -95), BLASTP, BLASTN, e FASTA (Altschul *et al*., 1990. *J Mol Biol*. 215(3): 403-10). O programa BLASTX está disponível ao público no National Center for Biotechnology Information (NCBI) e em outras fontes (BLAST Manual, Altschul *et al*. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD. 20894). O conhecido algoritmo de Smith Waterman também pode ser usado para determinar a identidade.

"Tolerância imune"

[0074] O termo "tolerância imune", como aqui utilizado, se refere a um estado de não resposta do sistema imune a substâncias ou tecidos específicos que têm a capacidade de provocar uma resposta imune, preservando a resposta imune contra outras substâncias ou tecidos.

"Resposta imune"

[0075] O termo "resposta imune", como aqui utilizado, inclui respostas imunes mediadas por células T e/ou mediadas por células B. Respostas imunes exemplares incluem, mas não estão limitadas a, respostas de células T (por exemplo, produção de citocinas e citotoxicidade celular), mas também respostas imunes que são indiretamente afetadas pela ativação de células T (por exemplo, macrófagos). As células imunes envolvidas na resposta imune incluem linfócitos (como células B e células T, incluindo células $CD4^+$, $CD8^+$, T_h1 e T_h2), células apresentadoras de antígenos (por exemplo, células apresentadoras de antígenos profissionais, como células dendríticas), células exterminadoras naturais, mielóides células (como macrófagos, eosinófilos, mastócitos, basófilos e granulócitos).

"Imunoespecífico", "específico para" ou **"ligado especificamente"**

[0076] Como usado aqui, um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo é considerado "imunoespecífico", "específico para" ou "ligado especificamente" a um antígeno se ele reagir em um nível detectável com o referido antígeno (por exemplo, SEQ ID NO: 1), de preferência com uma constante de afinidade (K_A) maior ou igual a cerca de 10^6 M^{-1}, preferencialmente maior ou igual a cerca de 10^7 M^{-1}, 10^8 M^{-1}, $5x10^8$ M^{-1}, 10^9 M^{-1}, $5x10^9$ M^{-1} ou mais.

[0077] A afinidade de um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo ao seu antígeno cognato também é comumente expressa como uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D). é dito que um anticorpo ou fragmento de ligação é "imunoespecífico", "específico para" ou " ligado especificamente" a um antígeno se ele reagir em um nível detectável com o referido antígeno (por exemplo, SEQ ID NO: 1), de preferência com um KD menor ou igual a 10^{-6} M, preferencialmente menor ou igual a 10^{-7} M, $5x10^{-8}$ M, 10^{-8} M, $5x10^{-9}$ M, 10^{-9} M ou menos.

[0078] As afinidades de anticorpos ou fragmento de ligação dos mesmos podem ser facilmente determinadas utilizando técnicas convencionais, por exemplo, as descritas por Scatchard, 1949. *Ann NY Acad Sci*. 51: 660-672. As propriedades de ligação de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígenos, células ou tecidos podem geralmente ser determinadas e avaliadas usando métodos de imunodetecção, incluindo, por exemplo, ELISA, ensaios baseados em imunofluorescência, como imuno-histoquímica (IHC) e/ou classificação celular ativada por fluorescência (FACS) ou por ressonância plasmônica de superfície (SPR, por exemplo, usando BIAcore®).

"Anticorpo monoclonal"

[0079] Como aqui utilizado, o termo "anticorpo monoclonal" se refere a um anticorpo obtido a partir de uma

população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendidos na população são idênticos, exceto por possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em pequenas quantidades. Por exemplo, os anticorpos individuais podem variar em relação a suas modificações pós-traducionais e, principalmente, em relação a suas estruturas de glicosilação ou seu ponto isoelétrico, mas todos foram codificados pelas mesmas sequências de cadeia pesada e leve e, portanto, antes de qualquer modificação pós-traducional, a mesma sequência de proteínas. Certas diferenças nas sequências de proteínas, relacionadas a modificações pós-traducionais (como, por exemplo, a clivagem da lisina C-terminal da cadeia pesada, desamidação de resíduos de asparagina e/ou isomerização de resíduos de aspartato), podem existir entre os anticorpos individuais presentes em uma composição de anticorpo monoclonal.

[0080] Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único local antigênico. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpos policlonais que incluem anticorpos diferentes direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos, pois podem ser

sintetizados não contaminados por outros anticorpos. O modificador "monoclonal" não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais ou fragmento de ligação dos mesmos de acordo com a presente invenção podem ser preparados pela metodologia de hibridoma descrita pela primeira vez por Kohler *et al*., 1975. *Nature*. 256(5517): 495-7, ou pode ser produzido usando métodos de DNA recombinante em células bacterianas, eucarióticas de animais ou plantas (Patente US 4,816,567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpos de fagos usando as técnicas descritas em Clackson *et al*., 1991. *Nature*. 352(6336): 624-8 e Marks *et al*., 1991. *J. Mol Biol*. 222(3): 581-97, por exemplo.

"Doença monogênica"

[0081] O termo "doença monogênica", também chamado de "distúrbio monogênico", se refere a um distúrbio genético no qual as modificações de um único gene estão associadas a um distúrbio, doença ou condição em um indivíduo. Embora relativamente raras, as doenças monogênicas afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente, os cientistas estimam que mais de 10.000 doenças humanas são conhecidas por serem monogênicas. As doenças genéticas puras são causadas por um único erro em um único gene no DNA humano. A natureza da doença depende das funções desempenhadas pelo gene

modificado. As doenças de um único gene ou monogênicas podem ser classificadas em seis categorias: autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X dominante, ligada ao X recessivo, ligada ao Y e mitocondrial, dependendo do próprio gene mutado e sua ocorrência em um ou dois alelos.

[0082] Alguns exemplos de doenças monogênicas incluem, mas não estão limitados a, deficiência de 11-hidroxilase; Deficiência de 17,20-desmolase; Deficiência de 17-hidroxilase; Acidúria de 3-hidroxi-isobutirato; Deficiência de 3-hidroxisteróide desidrogenase; 46, disgenesia gonadal XY; Síndrome de AAA; Deficiência de ABCA3; Hiperinsulinismo associado ao ABCC8; aceruloplasminemia; acondrogênese tipo 2; síndrome da pele do peeling acral; acrodermatite enteropática; hiperplasia micronodular adrenocortical; adrenoleucodistrofias; adrenomieloneuropatias; Síndrome de Aicardi-Goutieres; Doença de Alagille; Síndrome de Alpers; alfa-manosidose; Síndrome de Alstrom; Doença de Alzheimer; amelogênese imperfeita; microcefalia do tipo amish; esclerose lateral amiotrófica; displasia anauxética; síndrome de insentividade androgênica; Síndrome de Antley-Bixler; APECED; Síndrome de Apert; aplasia das glândulas lacrimais e salivares; argininemia; displasia arritmogica do ventrículo direito (ARVD2); Síndrome de Arts; leucodistrofia metacromática do tipo deficiência em arilsulfatase; ataxia Telangiectasia;

síndrome linfoproliferativa autoimune; síndrome poliglandular autoimune tipo 1; displasia ectodérmica anidrótica autossômica dominante; doença renal policística autossômica dominante; microtia autossômica recessiva; glucosúria renal recessiva autossômica; heterotaxia visceral autossômica; Síndrome de Bardet-Biedl; Síndrome de Bartter; síndrome do nevo basocelular; Doença de Batten; colestase intra-hepática recorrente benigna; beta-manosidose; Miopatia de Bethlem; Anemia de Blackfan-Diamond; blefarofimose; Doença de Byler; Síndrome C; Síndrome de CADASIL; deficiência de carbamil fosfato sintetase; síndrome cardiofaciocutânea; Tríade de Carney; deficiências de carnitina palmitoiltransferase; hipoplasia de cabelo-cartilagem; tipo cblC de acidúria metilmalônica combinada; Deficiência de CD18; Imunodeficiência primária em células T associadas a CD3Z; Deficiência de CD40L; Síndrome CDAGS; CDG1a; CDG1b; CDG1m; CDG2c; Síndrome de CEDNIK; doença de núcleo central; miopatia centronuclear; malformação capilar cerebral; síndrome cerebrooculofaciosquelética do tipo 4; síndrome cerebrooculogaciosquelética; xantomatose cerebrotendinosa; Associação CHARGE; querubismo; Síndrome CHILD; doença granulomatosa crônica; osteomielite multifocal recorrente crônica; deficiência de citrina; hemocromatose clássica; Síndrome do CNPPB; doença de cobalamina C; Síndrome de Cockayne; deficiência de coenzima Q10; Síndrome de Coffin-

Lowry; Síndrome de Cohen; deficiência combinada de fatores de coagulação V; deficiência imune variável comum; insentividade androgênica completa; distrofias de barra de cone; doenças conformacionais; defeito de síntese de ácido biliar congênito tipo 1; defeito de síntese de ácido biliar congênito tipo 2; porfiria eritropoiética congênita; osteosclerose generalizada congênita; Síndrome de Cornelia de Lange; Síndrome de primo; Doença de Cowden; Deficiência de COX; Doença de Crigler-Najjar; Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1; Síndrome de Crisponi; Síndrome de Currarino; Histrix de ictiose do tipo Curth-Macklin; cutis laxa; cistinose; acidúria d-2-hidroxiglutárica; Sdddd; Doença de Dejerine-Sottas; Síndrome de Denys-Drash; cardiomiopatia por desmina; miopatia desminativa; Depleção de DNA mitocondrial associada a DGUOK; desordens do metabolismo do glutamato; atrofia muscular espinhal distal tipo 5; Doenças reparadoras de DNA; atrofia óptica dominante; Distrofia retiniana do favo de mel de Doyne; Distrofia muscular de Duchenne; disqueratose congênita; Síndrome de Ehlers-Danlos tipo 4; Síndromes de Ehlers-Danlos; Doença de Elejalde; Doença de Ellis-van Creveld; Distrofias musculares de Emery-Dreifuss; síndroma de depleção encefalomiopática do mtDNA; doenças enzimáticas; Enteropatia congênita associada a EPCAM; epidermólise bolhosa com atresia pilórica; hipoglicemia induzida pelo exercício; distrofia muscular facioescapulo-umeral;

Histiocitose de Faisalabad; micobacteriose atípica familiar; malformação capilar familiar-arteriovenosa; acalasia esofágica familiar; malformação glomuvenosa familiar; linfohistiocitose hemofagocítica familiar; febre familiar mediterrânea; megacálices familiares; schwannomatose familiar; espinha bífida familiar; asplenia/hipoplasia esplênica familiar; púrpura trombocitopênica trombótica familiar; Doença de Fanconi; Síndrome de Feingold; FENIB; fibrodisplasia ossificante progressiva; FKTN; François-Neetens mancha distrofia da córnea; Síndrome de Frasier; Ataxia de Friedreich; FTDP-17; fucosidose; Deficiência de G6PD; galactosialidose; Síndrome de Galloway; Sdrome de Gardner; Doença de Gaucher; Síndrome de Gitelman; Deficiência de GLUT-1; doença de armazenamento de glicogênio tipo 1b; doença de armazenamento de glicogênio tipo 2; doença de armazenamento de glicogênio tipo 3; doença de armazenamento de glicogênio tipo 4; doença de armazenamento de glicogênio tipo 9a; doenças de armazenamento de glicogênio; Gangliosidose GM1; Síndrome de Greenberg; Síndrome de cefalopolissindactilia de Greig; doenças genéticas do cabelo; Síndrome de HANAC; ictiose congênita do tipo arlequim; Sdrome de HDR; hemocromatose tipo 3; hemocromatose tipo 4; hemofilia A; angioedema hereditário tipo 3; angioedemas hereditários; telangiectasia hemorrágica hereditária; hipofibrinogenemia hereditária; malformação

vascular intraóssea hereditária; leiomiomatose hereditária e câncer de células renais; amiotrofia nevrálgica hereditária; tipo neuropatia sensorial e autonômica hereditária; Doença de Hermansky-Pudlak; Síndrome de HHH; HHT2; displasia ectodérmica hidrótica tipo 1; displasia ectodérmica hidrótica; Hiperinsulinismo associado ao HNF4A; HNPCC; imunodeficiência humana com microcefalia; Doença de Huntington; síndrome de hiper-IgD; síndrome de hiperinsulinismo-hiperammonemia; hipertrofia do epitélio pigmentar da retina; hipocondrogênese; displasia ectodérmica hipohidrótica; Síndrome da CIF; pseudo-obstrução intestinal congênita idiopática; imunodeficiência com hiper-IgM tipo 1; imunodeficiência com hiper-IgM tipo 3; imunodeficiência com hiper-IgM tipo 4; imunodeficiência com hiper-IgM tipo 5; erros inatos da biossíntese do hormônio tireoidiano; miopatia visceral infantil; atrofia muscular espinhal ligada ao X infantil; colestase intra-hepática da gravidez; Síndrome de IPEX; Deficiência de IRAK4; asplenia congênita isolada; Síndrome de Jeune; Síndrome de Johanson-Blizzard; Síndrome de Joubert; Síndrome de JP-HHT; hemocromatose juvenil; fibromatose hialina juvenil; nefronofitese juvenil; Síndrome de máscara de Kabuki; Síndromes de Kallmann; Síndrome de Kartagener; Hiperinsulinismo associado ao KCNJ11; Síndrome de Kearns-Sayre; Doença de Kostmann; Tipo Kozlowski de displasia espondilometafisária; Doença de

Krabbe; Síndrome de LADD; lipofuscinose ceróide neuronal tardia de início infantil; Deficiência de LCK; Sindroma LDHCP; Síndrome de Legius; Síndrome de Leigh; síndrome de contratura congênita letal 2; síndromes de contratura congênita letais; síndrome contratural letal tipo 3; deficiência letal de CPT neonatal tipo 2; displasia óssea osteosclerótica letal; Síndrome de LIG4; lisencefalia tipo 1; lisencefalia tipo 3; Síndrome de Loeys-Dietz; colelitíase baixa associada a fosfolipídios; intolerância à proteína lisinúrica; Síndrome de Maffucci; Síndrome de Majeed; deficiência de proteína de ligação à manose; Doença de Marfan; Síndrome de Marshall; Síndrome MASA; Deficiência de MCAD; Síndrome de McCune-Albright; MCKD2; Síndrome de Meckel; Distrofia da córnea de Meesmann; hipoperistalse de megacystis-microcolon-intestinal; anemia megaloblástica tipo 1; MEHMO; MELAS; Síndrome de Melnick-Needles; MEN2s; Doença de Menkes; leucodistrofias metacromáticas; acidúrias metilmalônicas; acidúria metilvalônica; síndrome de nefrose microcoria-congênita; atrofia microvilosa; encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial; moniletrix; monossomia X; síndrome de trissomia 9 em mosaico; Síndrome de Mowat-Wilson; mucolipidose tipo 2; mucolipidose tipo Ma; mucolipidose tipo IV; mucopolissacaridoses; mucopolissacaridose tipo 3A; mucopolissacaridose tipo 3C; mucopolissacaridose tipo 4B; doença multiminicore;

deficiência múltipla de desidrogenação de acil-CoA; malformações venosas cutâneas e mucosas múltiplas; neoplasia endócrina múltipla tipo 1; deficiência múltipla de sulfatase; NAIC; síndrome da unha-patela; miopatias nemaline; diabetes mellitus neonatal; deficiência de surfactante neonatal; nefronofitose; Doença de Netherton; neurofibromatose; neurofibromatose tipo 1; Doença de Niemann-Pick tipo A; Doença de Niemann-Pick tipo B; Doença de Niemann-Pick tipo C; NKX2E; Sindroma de Noonan; Cirrose indiana norte-americana na infância; DSD associado à duplicação NROB1; doenças genéticas oculares; síndrome oculo-auricular; OLEDAID; oligomeganofronia; hipolasia renal oligomeganofrnica; Doença de Ollier; Síndrome de Opitz-Kaveggia; síndrome orofaciodigital tipo 1; síndrome orofaciodigital tipo 2; doença óssea de Paget; síndrome otopalatodigital tipo 2; Doenças OXPHOS; hiperqueratose palmoplantar; nefroblastomatose panlobar; Síndrome de Parkes-Weber; Doença de Parkinson; deleção parcial de 21q22.2-q22.3; Síndrome de Pearson; Doença de Pelizaeus-Merzbacher; Síndrome de Pendred; pentalogia de Cantrell; deficiência de acil-CoA-oxidase peroxissômica; Síndrome de Peutz-Jeghers; Síndrome de Pfeiffer; Síndrome de Pierson; doença adrenocortical nodular pigmentada; acidemia pipecólica; Síndrome de Pitt-Hopkins; deficiência de plasmalógenos; blastoma pleuropulmonar e nefroma cístico;

osteodisplasia lipomembranosa policística; porfirias; insuficiência ovariana prematura; eritermalgia primária; hemocromatose primária; hiperoxalúria primária; colestase intra-hepática familiar progressiva; acidemia propiônica; deficiência de piruvato descarboxilase; Síndrome de RAPADILINO; cistinose renal; síndrome de predisposição para tumor rabdoide; Síndrome de Rieger; cromossomo 4 em anel; Síndrome de Roberts; Síndrome de Robinow-Sorauf; Síndrome de Rothmund-Thomson; SCID; Síndrome de Saethre-Chotzen; Doença de Sandhoff; Síndrome de phocomelia SC; SCAS; Síndroma de Schinzel phocomelia; síndrome de costela curta e polidactilia tipo 1; síndrome de costela polidactilia curta tipo 4; síndrome de polidactilia de costela curta tipo 2; síndrome de polidactilia de costela curta tipo 3; Doença de Shwachman; Doença de Shwachman-Diamond; anemia falciforme; Síndrome de Silver-Russell; Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel; Síndrome de Smith-Lemli-Opitz; Paraplegia espástica hereditária associada ao SPG7; esferocitose; malformação de mão/pé dividida com deficiências ósseas longas; disostose espondilocostal; miopatia visceral esporádica com corpos de inclusão; doenças de armazenamento; Síndrome associada a STRA6; Doença de Tay-Sachs; displasia tanatofórica; doenças do metabolismo da tireóide; Síndrome de Tourette; amiloidose associada a transtirretina; trissomia 13; trissomia 22; síndrome de trissomia 2p; esclerose tuberosa; enteropatia de

tufos; doenças do ciclo da uréia; Síndrome de Van Den Ende-Gupta; Síndrome de Van der Woude; síndrome de aneuploidia em mosaico variegada; Deficiência de VLCAD; doença de von Hippel-Lindau; Síndrome de Waardenburg; Síndrome WAGR; Síndrome de Walker-Warburg; Síndrome de Werner; Doença de Wilson; Síndrome de Wolcott-Rallison; Síndrome de Wolfram; Agammaglobulinemia ligada ao X; Pseudo-obstrução intestinal idiopática crônica ligada ao X; Fenda palatina ligada ao X com anquiloglossia; Condrodisplasia punctata dominante ligada ao X; Displasia ectodérmica ligada ao X; Distrofia muscular de Emery-Dreifuss ligada ao X; Lisencefalia ligada ao X; Doença linfoproliferativa ligada ao X; Heterotaxia visceral ligada ao X; xantinúria tipo 1; xantinúria tipo 2; xeroderma pigmentoso; XPV; e doença de Zellweger.

"Indivíduo"

[0083] Como usado aqui, o termo "indivíduo" se refere a um mamífero, preferencialmente um humano. Em uma modalidade, um indivíduo pode ser um "paciente", isto é, um animal de sangue quente, mais preferencialmente um humano, que/o qual está aguardando o recebimento ou está recebendo cuidados médicos ou foi/é/será objeto de um procedimento médico, ou é monitorado para o desenvolvimento de uma doença. O termo "mamífero" se refere aqui a qualquer mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de fazenda e zoológico, esportes, ou animais de estimação, como cães,

gatos, gado, cavalos, ovelhas, porcos, cabras, coelhos etc. De preferência, o mamífero é um primata, mais preferencialmente um humano.

"Quantidade terapeuticamente eficaz"

[0084] Como aqui utilizada, a expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" significa o nível, quantidade ou concentração de agente (por exemplo, um anticorpo anti-CD45RC) que visa, sem causar efeitos colaterais negativos ou adversos significativos ao indivíduo, (1) atrasar ou prevenir o aparecimento de doenças monogênicas; (2) desacelerar ou interromper a progressão, agravamento ou deterioração de um ou mais sintomas de doenças monogênicas; (3) promover melhorias dos sintomas de doenças monogênicas; (4) reduzir a gravidade ou incidência de doenças monogênicas; ou (5) cura de doenças monogênicas. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada antes do início da doença monogênica, para uma ação profilática ou preventiva. Alternativa ou adicionalmente, a quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada após o início da doença monogênica, para uma ação terapêutica.

"Tratar" ou **"tratamento"** ou **"alívio"**

[0085] Como usado aqui, os termos "tratar" ou "tratamento" ou "alívio" se referem a medidas terapêuticas e profiláticas (ou preventivas); em que o objetivo é desacelerar (ou diminuir) a condição ou distúrbio patológico

alvo. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles que já estão com a doença monogênica, bem como aqueles com suspeita de ter a doença monogênica. Um indivíduo é “tratado” com sucesso para a doença monogênica alvo se, após receber uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente (por exemplo, um anticorpo anti-CD45RC), o referido indivíduo mostra uma redução observável e/ou mensurável ou ausência de um ou mais dos seguintes: redução no número de células $CD45RC^+$; redução na porcentagem do total de células $CD45RC^+$; alívio até certo ponto (como redução, alívio, diminuição ou inibição) de um ou mais dos sintomas associados à doença monogênica; morbimortalidade reduzida; e/ou melhoria nas questões de qualidade de vida. Os parâmetros acima para avaliar o sucesso do tratamento e a melhoria da doença monogênica são facilmente mensuráveis por procedimentos de rotina familiares a um médico.

"Região variável" ou **"domínio variável"**

[0086] Como usado aqui, o termo "variável" se refere ao fato de que certas regiões dos domínios variáveis V_H e V_L diferem extensivamente na sequência entre os anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico para seu antígeno alvo. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente pelos domínios variáveis dos anticorpos. Ele está concentrado em três

segmentos chamados "laços hipervariáveis" em cada domínio V_L e domínio V_H, que fazem parte do local de ligação ao antígeno.

[0087] Os primeiro, segundo e terceiro laços hipervariáveis do domínio de cadeia leve Vλ são aqui referidos como L1 (λ), L2 (λ) e L3 (λ) e podem ser definidos como compreendendo os resíduos 24-33 (L1 (λ), consistindo de 9, 10 ou 11 resíduos de aminoácidos), 49-53 (L2 (λ), consistindo de 3 resíduos) e 90-96 (L3 (λ), consistindo de 6 resíduos) no domínio V_L (Morea *et al.*, 2000. *Methods* 20(3): 267-79).

[0088] Os primeiro, segundo e terceiro laços hipervariáveis do domínio de cadeia leve Vκ são aqui referidos como L1 (κ), L2 (κ) e L3 (κ) e podem ser definidos como compreendendo os resíduos 25-33 (L1 (κ), consistindo de 6, 7, 8, 11, 12 ou 13 resíduos), 49-53 (L2 (κ), consistindo de 3 resíduos) e 90-97 (L3 (κ), consistindo de 6 resíduos) no domínio V_L (Morea *et al.*, 2000. *Methods* 20(3): 267-79).

[0089] O primeiro, segundo e terceiro laços hipervariáveis do domínio V_H são aqui referidos como H1, H2 e H3 e podem ser definidos como compreendendo os resíduos 25-33 (H1, consistindo de 7, 8 ou 9 resíduos), 52-56 (H2, consistindo de 3 ou 4 resíduos) e 91-105 (H3, comprimento altamente variável) no domínio V_H (Morea *et al.*, 2000. *Methods* 20(3): 267-79).

[0090] Salvo indicação em contrário, os termos L1, L2 e L3 referem-se, respectivamente, ao primeiro, segundo e terceiro laços hipervariáveis de um domínio V_L, e abrangem laços hipervariáveis obtidos a partir dos isotipos $V\kappa$ e $V\lambda$. Os termos H1, H2 e H3 se referem, respectivamente, ao primeiro, segundo e terceiro laços hipervariáveis do domínio V_H e abrangem laços hipervariáveis obtidos a partir de qualquer um dos isotipos de cadeia pesada conhecidos, incluindo gama (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) ou epsilon (ε). Os laços hipervariáveis L1, L2, L3, H1, H2 e H3 podem cada um compreender parte de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR", conforme definido acima.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0091] A presente invenção se refere a anticorpos anti-CD45RC ou fragmentos de ligação dos mesmos, para uso na prevenção e/ou tratamento de doenças monogênicas.

[0092] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a invenção é isolado. O termo "isolado", como aqui utilizado em referência a um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, significa que o referido anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo está substancialmente livre de outros anticorpos ou fragmentos de ligação com diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente ao CD45RC está

substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos que não o CD45RC). Um anticorpo isolado que se liga especificamente ao CD45RC de uma espécie pode, no entanto, ter reatividade cruzada com outros antígenos, como o CD45RC de outras espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode estar substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos, em particular aqueles que interfeririam nos usos diagnósticos ou terapêuticos do anticorpo, incluindo, sem limitação, enzimas, hormônios e outros componentes proteicos ou não proteicos.

[0093] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a invenção é purificado. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a invenção é purificado para:

(1) superior a 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% ou mais em peso de anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, conforme determinado pelo método de Lowry, e mais preferencialmente acima de 96%, 97%, 98% ou 99% em peso;

(2) um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna pela utilização de um sequenciador de copo giratório; ou

(3) homogeneidade como mostrado por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras e utilizando coloração azul de Coomassie ou, preferencialmente, prata.

[0094] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a CD45RC. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga ao CD45RC humano (hCD45RC).

[0095] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga ao determinante C codificado pelo exon 6 do hCD45RC. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo no determinante C codificado pelo exon 6 do hCD45RC.

[0096] Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do determinante C codificada pelo exon 6 de hCD45RC compreende ou consiste em SEQ ID NO: 1. Em uma modalidade, a sequência de ácidos nucleicos do exon 6 que codifica o determinante C de hCD45RC compreende ou consiste em SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 1

DVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTLSLAHHSSAALPARTSNTTITANTS

SEQ ID NO: 2

GATGTCCCAGGAGAGAGGAGTACAGCCAGCACCTTTCCTACAGACCCAGTTTCCCCA TTGACAACCACCCTCAGCCTTGCACACCACAGCTCTGCTGCCTTACCTGCACGCACC TCCAACACCACCATCACAGCGAACACCTCA

[0097] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma.

[0098] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo que compreende ou consiste em uma sequência que compartilha pelo menos cerca de 70%, preferencialmente pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma.

[0099] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo codificado por uma sequência de ácido nucleico compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 2 ou um fragmento da mesma.

[0100] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo codificado

por uma sequência de ácido nucleico compreendendo ou consistindo em uma sequência que compartilha pelo menos cerca de 70%, preferencialmente pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 2 ou um fragmento da mesma.

[0101] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo compreendendo ou consistindo em pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 ou 47 aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma; ou de uma sequência que compartilhe pelo menos cerca de 70%, de preferência pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma.

[0102] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a pelo menos um epítopo compreendendo ou consistindo em pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 ou 47 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma; ou de uma sequência

que compartilhe pelo menos cerca de 70%, de preferência pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma.

[0103] Em uma modalidade, um fragmento de pelo menos um epítopo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1 compreende ou consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 ou 47 resíduos de aminoácidos.

[0104] Em uma modalidade, um fragmento de pelo menos um epítopo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1 compreende ou consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 ou 47 resíduos de aminoácidos espalhados por um período de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 73, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030,

1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100 ou mais aminoácidos contíguos resíduos de uma sequência compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1.

[0105] Em uma modalidade, uma sequência compreendendo SEQ ID NO: 1 é SEQ ID NO: 3, correspondente ao UniProt Accession P08575-3 (versão 3, modificada em 28 de março de 2018 - soma de verificação: 6E942E2BF6B17AC5) ou uma sequência que compartilha pelo menos cerca de 70%, de preferência pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade com a SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 3

MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAKMPSVPLSSDPLPTHTTAF
SPASTFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLDNASAFNTTGVSSVQTPHLPTHAD
SQTPSAGTDTQTFSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTLS
LAHHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTC
DEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISH
NSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRF
QCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIF
CRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYV
LSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNG
PHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHH
STSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQL
MNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFNQNKNRYV

DILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIW
EQKATVIVMVTRCEEGNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLN
IVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSA
GVGRTGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEY
NQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEENK
SKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDDSDSEEPSKYINASFIMSY
WKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEGKQTY
GDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISM
IQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDI
FQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDK
VKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

[0106] Em uma modalidade, o pelo menos um epítopo é um epítopo conformacional. Em outra modalidade, o pelo menos um epítopo é um epítopo sequencial.

[0107] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a hCD45RC com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de $5x10^{-7}$ M ou menos, preferencialmente cerca de $2,5x10^{-7}$ M ou menos, cerca de $1x10^{-7}$ M ou menos, cerca de $7,5x10^{-8}$ M ou menos, cerca de $5x10^{-8}$ M ou menos, cerca de $1x10^{-8}$ M ou menos.

[0108] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a hCD45RC com uma taxa de

associação (K_{on}) de cerca de $1x10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, preferencialmente de cerca de $5x10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, cerca de $1x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, cerca de $2,5x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, cerca de $5x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais.

[0109] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga ao hCD45RC com uma taxa de dissociação (K_{off}) de cerca de $5x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, preferencialmente de cerca de $4x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, cerca de $3x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, cerca de $2x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, cerca de $1,5x10^{-2}$ s^{-1} ou menos.

[0110] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção se liga a hCD45RC com pelo menos um dentre, de preferência pelo menos dois dentre, mais preferencialmente entre os três:

- uma constante de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de $5x10^{-7}$ M ou menos, preferencialmente de cerca de $2,5x10^{-7}$ M ou menos, cerca de $1x10^{-7}$ M ou menos, cerca de $7,5x10^{-8}$ M ou menos, cerca de $7,5x10^{-8}$ M ou menos, cerca de $5x10^{-8}$ M ou menos, cerca de $1x10^{-8}$ M ou menos;

- uma taxa de associação (K_{on}) de cerca de $1x10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, preferencialmente cerca de $5x10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, cerca de $1x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, cerca de $2,5x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais, cerca de $5x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ ou mais; e

- uma taxa de dissociação (K_{off}) de cerca de $5x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, preferencialmente de cerca de $4x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, cerca de $3x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, cerca de $2x10^{-2}$ s^{-1} ou menos, cerca de $1,5x10^{-2}$ s^{-1} ou menos.

[0111] Os métodos para determinar a afinidade (incluindo, por exemplo, a determinação de K_d, k_{off} e k_on) de um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo para seu ligante são bem conhecidos na arte e incluem, sem limitação, ressonância plasmônica de superfície (SPR), triagem de células ativadas por fluorescência (FACS), ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), AlphaLISA e KinExA.

[0112] Um método preferido é o BIAcore®, que depende do SPR usando CD45RC imobilizado para determinar a afinidade de um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo. Uma maneira de implementar esse método será mais ilustrada na seção Exemplos.

[0113] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção é um anticorpo policlonal ou fragmento de ligação do mesmo.

[0114] Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo para uso de acordo com a presente invenção é um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação do mesmo.

[0115] Os anticorpos direcionados contra CD45RC podem ser obtidos de acordo com métodos conhecidos, administrando o antígeno ou epítopo apropriado (como o peptídeo de SEQ ID NO: 1) a um animal hospedeiro selecionado, por exemplo, de ratos, porcos, vacas, cavalos, coelhos, cabras, ovinos, Camelidae (camelo, dromedário, lhama) e camundongos, entre outros. Vários adjuvantes conhecidos na técnica podem ser utilizados para aumentar a produção de anticorpos. As técnicas para produção e isolamento incluem, entre outras, a técnica de hibridoma, a técnica de hibridoma de células B humanas e a técnica de hibridoma EBV. Alternativamente, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (divulgadas, por exemplo, na Patente US 4,946,778) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única contra CD45RC.

[0116] Em uma modalidade, o anticorpo para uso de acordo com a invenção é um anticorpo quimérico ou um anticorpo biespecífico ou um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano ou um fragmento de anticorpo ou um derivado do mesmo. De fato, isso dá a possibilidade de evitar reações imunes do paciente contra os anticorpos administrados.

[0117] Um "derivado" de um anticorpo significa uma proteína de ligação formada por um peptídeo de suporte e pelo menos uma CDR do anticorpo original, preservando sua

capacidade de reconhecer especificamente um antígeno, como CD45RC, em particular a SEQ ID NO: 1.

[0118] Domínios variáveis estão envolvidos no reconhecimento do antígeno, enquanto domínios constantes estão envolvidos nas propriedades biológicas, farmacocinéticas e efetoras do anticorpo. Ao contrário dos domínios variáveis, para os quais a sequência varia fortemente de um anticorpo para outro, os domínios constantes são caracterizados por uma sequência de aminoácidos muito próxima de um anticorpo para o outro, típica da espécie e do isotipo, com opcionalmente algumas mutações somáticas.

[0119] Em uma modalidade, o anticorpo para uso de acordo com a presente invenção é um anticorpo multiespecífico que compreende um primeiro local de ligação ao antígeno direcionado contra CDR45RC e pelo menos um segundo local de ligação ao antígeno direcionado contra uma célula efetora, sendo a referida célula efetora capaz de mediar a depleção de células T $CD45RC_{alto}$ através de ligação direta, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou fagocitose dependente de anticorpo.

[0120] Na referida modalidade, o segundo local de ligação ao antígeno é usado para recrutar um mecanismo de extermínio, como, por exemplo, ligando um antígeno a uma célula efetora humana. Em algumas modalidades, uma célula

efetora é capaz de induzir ADCC, como uma célula exterminadora natural. Por exemplo, monócitos, macrófagos, que expressam FcRs, estão envolvidos no extermínio específico de células-alvo e na apresentação de antígenos para outros componentes do sistema imune. Em algumas modalidades, uma célula efetora pode fagocitar um antígeno ou célula alvo. A expressão de um FcR específico em uma célula efetora pode ser regulada por fatores humorais, como citocinas. Uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo ou fagocitar ou lisar uma célula alvo. Agentes citotóxicos adequados e agentes terapêuticos secundários são exemplificados abaixo e incluem toxinas (tais como peptídeos radiomarcados), agentes quimioterapêuticos e pró-fármacos. Em algumas modalidades, o segundo local de ligação se liga a um receptor Fc como definido acima. Em algumas modalidades, o segundo local de ligação se liga a uma molécula de superfície de células NK, para que as referidas células possam ser ativadas. Em algumas modalidades, o segundo local de ligação se liga a NKp46.

[0121] Formatos exemplares para as moléculas de anticorpo multiespecíficas da presente invenção incluem, mas não estão limitados a

(i) dois anticorpos reticulados por hetero-conjugação química, um com uma especificidade para uma molécula de

superfície específica da ILC e outro com uma especificidade para um segundo antígeno;

(ii) um anticorpo único que compreende duas regiões diferentes de ligação ao antígeno;

(iii) um anticorpo de cadeia única que compreende duas regiões diferentes de ligação ao antígeno, por exemplo, dois scFvs ligados em conjunto por um ligante peptídico extra;

(iv) um anticorpo de domínio variável duplo (DVD-Ig), em que cada cadeia leve e cadeia pesada contém dois domínios variáveis em conjunto através de uma ligação peptídica curta;

(v) um fragmento biespecífico (Fab')2 quimicamente ligado;

(vi) um Tandab, que é uma fusão de dois diacorpos de cadeia única, resultando em um anticorpo biespecífico tetravalente que possui dois locais de ligação para cada um dos antígenos alvo;

(vii) um anticorpo, que é uma combinação de scFvs com um diacorpo, resultando em uma molécula multivalente;

(viii) uma molécula chamada "dock and lock", com base no "domínio de dimerização e docking" na Proteína Quinase A, que, quando aplicada a Fabs, pode produzir uma proteína de ligação biespecífica trivalente consistindo em dois fragmentos Fab idênticos ligados a um fragmento Fab diferente;

(ix) uma molécula chamada Scorpion, compreendendo, por exemplo, dois scFvs fundidos aos dois terminais de um braço Fab humano; e

(x) um diacorpo.

[0122] Outro formato exemplificativo para anticorpos biespecíficos são moléculas do tipo IgG com domínios C_H3 complementares para forçar a heterodimerização. Essas moléculas podem ser preparadas usando tecnologias conhecidas, como, por exemplo, aquelas conhecidas como tecnologias Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-into-Hole (Genentech), CrossMAb (Roche) and electrostatically-matched (Amgen), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) e DuoBody (Genmab A/S).

[0123] Em algumas modalidades, um anticorpo biespecífico é obtido ou obtenível por meio de uma troca de braço Fab controlada, normalmente usando a tecnologia DuoBody®. Os métodos *in vitro* para a produção de anticorpos biespecíficos por troca de braço Fab controlada foram descritos em WO2008119353 e WO2011131746 (ambos por Genmab A/S).

[0124] Em um método exemplar, descrito em WO2008119353, um anticorpo biespecífico é formado por uma troca de "braço Fab" ou "meia molécula" (troca de uma cadeia pesada e cadeia leve ligada) entre dois anticorpos

monoespecíficos, ambos compreendendo regiões C_H3 do tipo IgG4, após incubação sob condições redutoras. O produto resultante é um anticorpo biespecífico com dois braços Fab que podem compreender sequências diferentes.

[0125] Em outro método exemplar, descrito em WO2011131746, os anticorpos biespecíficos são preparados por um método compreendendo as etapas a seguir, em que pelo menos um dos primeiro e segundo anticorpos é um anticorpo monoclonal humano da presente invenção:

a) fornecer um primeiro anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina, a referida região Fc compreendendo uma primeira região C_H3;

b) fornecer um segundo anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina, a referida região Fc compreendendo uma segunda região C_H3;

em que as sequências das referidas primeira e segunda regiões C_H3 são diferentes e são tais que a interação heterodimérica entre as referidas primeira e segunda regiões C_H3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das referidas primeira e segunda regiões C_H3;

c) incubar o referido primeiro anticorpo em conjunto com o referido segundo anticorpo em condições redutoras; e

d) obter o referido anticorpo biespecífico, em que o primeiro anticorpo é um anticorpo monoclonal humano da

presente invenção e o segundo anticorpo tem uma especificidade de ligação diferente, ou vice-versa.

[0126] As condições de redução podem, por exemplo, ser fornecidas adicionando um agente redutor, por exemplo, selecionado a partir de 2-mercaptoetilamina, ditiotreitol e tris (2-carboxietil) fosfina. A etapa d) pode ainda compreender restaurar as condições para se tornarem não redutoras ou redutoras, por exemplo, por remoção de um agente redutor, por exemplo, dessalinização. De preferência, as sequências da primeira e segunda regiões C_H3 são diferentes, compreendendo apenas algumas mutações assimétricas bastante conservadoras, de modo que a interação heterodimérica entre as referidas primeira e segunda regiões C_H3 é mais forte do que cada uma das interações homodiméricas das referidas primeira e segunda regiões C_H3. Mais detalhes sobre essas interações e como elas podem ser alcançadas são fornecidos em WO2011131746, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0127] A seguir, são exemplos de modalidades de combinações de tais mutações assimétricas, opcionalmente em que uma ou ambas as regiões Fc são do isotipo IgG1. Em algumas modalidades, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409, e a segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em

uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405, 407 e 409, e em que a primeira e a segunda regiões Fc não são substituídas nas mesmas posições. Em algumas modalidades, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 405, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 399, 407 e 409, opcionalmente 409. Em algumas modalidades, a primeira região Fc tem uma substituição de aminoácidos na posição 409, e a referida segunda região Fc tem uma substituição de aminoácidos em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 366, 368, 370, 399, 405 e 407, opcionalmente 405 ou 368. Em algumas modalidades, a primeira e a segunda regiões Fc são do isotipo IgG1, com a primeira região Fc tendo um Leu na posição 405 e a segunda região Fc tendo um Arg na posição 409. Estas mutações pontuais, indicadas de acordo com a numeração de Kabat, são bem conhecidas pelo especialista na técnica, uma vez que são divulgadas em vários pedidos de patente, como por exemplo em WO2016091891.

[0128] Os anticorpos podem ser de vários isotipos, dependendo da natureza de sua região constante: as regiões constantes γ, α, μ, ε e δ correspondem respectivamente às imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.

[0129] Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal para uso de acordo com a presente invenção é uma IgG. Em particular, o isotipo IgG mostra uma capacidade de gerar atividade ADCC e/ou CDC no maior número de indivíduos (humanos). As regiões constantes γ compreendem vários subtipos: γ1, γ2, γ3, esses três tipos de regiões constantes com a particularidade de se ligar ao complemento humano, e γ4, gerando, assim, os sub-isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal de acordo com a invenção é de um isotipo IgG1 ou IgG3, preferencialmente IgG1. O anticorpo monoclonal pode ser produzido por um clone celular, um animal transgênico não humano ou uma planta transgênica, por tecnologias bem conhecidas dos especialistas na técnica.

[0130] Em uma modalidade alternativa, o anticorpo monoclonal para uso de acordo com a presente invenção não compreende um fragmento Fc. Em particular, os anticorpos ausentes ou privados de um fragmento Fc não geram atividade ADCC ou CDC. Esse anticorpo é particularmente adequado quando seu uso não é dependente de ADCC e/ou CDC.

[0131] Exemplos adequados de anticorpo anti-CD45RC foram descritos em WO2016016442, cujo conteúdo é especificamente incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[0132] Outros exemplos adequados de anticorpos monoclonais direcionados contra CD45RC são bem conhecidos dos especialistas na técnica e incluem anticorpos comercializados. Exemplos de tais anticorpos incluem, sem limitação, os anticorpos monoclonais de camundongo OX-22 (CD45RC anti-rato), OX-32 (CD45RC anti-rato), 3H1437 (CD45RC anti-camundongo/rato/humano), MT2 (CD45RC anti-humano) e RP1/12 (CD45RC anti-humano) ou derivados dos mesmos, bem como anticorpos monoclonais de rato DNL 1.9 (CD45RC anti-camundongo) e C455.1F (CD45RC anti-camundongo). Tais anticorpos monoclonais são bem conhecidos dos especialistas na técnica e são comercializados por várias empresas (Spickett *et al*., 1983. *J Exp Med*. 158(3): 795-810).

[0133] Em uma modalidade específica, o anticorpo anti-CDR45RC para uso de acordo com a presente invenção é um anticorpo monoclonal OX-22, OX-32, 3H1437, MT2, RP1/12, DNL 1.9, C455.1F ou um derivado dos mesmos. Tais anticorpos monoclonais são bem conhecidos dos especialistas na técnica e são comercializados por várias empresas.

[0134] A expressão "um derivado do mesmo", com referência a um anticorpo monoclonal, se refere a um anticorpo anti-CD45RC que se liga especificamente a CD45RC, preferencialmente a CD45RC humano, e que compreende as 6 CDRs do referido anticorpo monoclonal. Em uma modalidade, o "derivado do mesmo" é um anticorpo que compreende a cadeia

V_L e a cadeia V_H do referido anticorpo monoclonal. Em outra modalidade, o "derivado do mesmo" é um anticorpo quimérico ou anticorpo humanizado, o qual compreende os domínios variáveis do referido anticorpo monoclonal.

[0135] Em uma modalidade, o anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser modificado para aumentar a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou fagocitose dependente de anticorpo. Tais modificações são bem conhecidas na arte.

[0136] Por exemplo, sabe-se que os anticorpos que compreendem um baixo teor de fucose aumentam a resposta de ADCC através do receptor FcγRIII (publicação de patente internacional WO2014140322). Assim, o anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender um baixo teor de fucose.

[0137] O termo "teor de fucose", como aqui utilizado, se refere à porcentagem de formas fucosiladas dentro dos N-glicanos ligados ao resíduo N297 do fragmento Fc de cada cadeia pesada de cada anticorpo.

[0138] O termo "baixo teor de fucose", como usado aqui, se refere a um teor de fucose menor ou igual a 65%. Vantajosamente, o teor de fucose é menor ou igual a 65%, preferencialmente menor ou igual a 60%, 55% ou 50%, ou ainda menor ou igual a 45%, 40%, 35%, 30%, 25% ou 20%. No entanto,

não é necessário que o teor de fucose seja zero, e ele pode ser, por exemplo, maior ou igual a 5%, 35 10%, 15% ou 20%.

[0139] Em uma modalidade, o anticorpo de acordo com a presente invenção pode ainda compreender diferentes tipos de glicosilação (N-glicanos do tipo oligomannose ou complexo biantennário, com uma proporção variável de resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ou resíduos de galactose em bissecção no caso de N-glicanos do tipo complexo biantennário), desde que tenham um baixo teor de fucose (publicação de patente internacional WO2007048077). Por exemplo, os anticorpos com N-glicanos ligeiramente fucosilados podem ser obtidos como descrito na publicação da patente europeia 1176195 ou nas publicações de patentes internacionais WO2001077181 ou WO2012041768.

[0140] Os N-glicanos do tipo oligomannose reduziram a meia-vida *in vivo* em comparação com os N-glicanos do tipo complexo biantennário. Consequentemente, vantajosamente, os anticorpos de acordo com a presente invenção têm nos seus locais de N-glicosilação das estruturas glicanas do fragmento Fc do tipo complexo biantennário, com um baixo teor de fucose, como definido acima.

[0141] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a uma porção terapêutica, isto é, um medicamento. Em uma modalidade, a porção terapêutica é selecionada a partir de uma citotoxina, um

agente quimioterapêutico, uma citocina, um imunossupressor, um estimulador imune, um peptídeo lítico e um radioisótopo. Tais conjugados são aqui referidos como "conjugados anticorpo-medicamento" ou "ADCs".

[0142] Em algumas modalidades, o anticorpo da presente invenção é conjugado a uma fração citotóxica. Em uma modalidade, a fração citotóxica é selecionada a partir de taxol; citocalasina B; gramicidina D; brometo de etídio; emetina; mitomicina; etoposido; tenoposídeo; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorrubicina; daunorrubicina; di-hidroxi-antracina diona; inibidores de tubulina (tais como, por exemplo, maitansina ou um análogo ou derivado do mesmo); agentes antimitóticos (tais como, por exemplo, monometil auristatina E ou F ou um análogo ou derivado do mesmo); dolastatina ou um análogo da mesma; irinotecano ou um análogo do mesmo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-desidrotestosterona; glicocorticóides; procaína; tetracaína; lidocaína; propranolol; puromicina; caliqueamicina ou um análogo ou derivado do mesmo; antimetabólitos (como, por exemplo, metotrexato, mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil, decarbazina, hidroxiureia, asparaginase, gencitabina ou cladribina); um agente alquilante (tal como, por exemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucil, melfalano, carmustina, lomustina, ciclofosfamida, bussulfano,

dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina, procarbazina ou mitomicina C); derivados de platina (tais como, por exemplo, cisplatina ou carboplatina); duocarmicina A, duocarmicina SA, rachelmicina ou um análogo ou derivado do mesmo; antibióticos (tais como, por exemplo, dactinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina ou antramicina); pirrolo [2,1-c][1,4]-benzodiazepinas; toxina da difteria e moléculas relacionadas (como, por exemplo, cadeia da difteria A e fragmentos ativos da mesma e moléculas híbridas, toxina da ricina como a ricina A ou uma toxina da cadeia da ricina A desglicosilada, toxina da cólera, uma toxina do tipo Shiga como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetânica, soja Inibidor da protease de Bowman-Birk, exotoxina de Pseudomonas, exotoxina de Pseudomonas, alorina, saporina, modeccina, gelanina, abrina Cadeia A, cadeia modecina A, alphasarcina, Aleurites fordii proteínas, proteínas de dianthina, proteínas de Phytolacca americana, tais como PAPI, PAPII e PAP-S, inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, toxinas de gelonina, mitogelina, restritocina, fenomicina e enomicina); ribonucleases; DNase I; Enterotoxina estafilocócica A; proteína antiviral em pó; toxina da difterina; e endotoxina de Pseudomonas.

[0143] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a uma auristatina ou um análogo peptídico, derivado ou pró-fármaco do mesmo. Foi demonstrado que as auristatinas interferem na dinâmica dos microtúbulos, na hidrólise de GTP e na divisão nuclear e celular (Woyke *et al*., 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(12): 3802-8) e têm atividade anticancerígena (Patente US N° 5,663,149) e antifúngica (Pettit *et al*., 1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 42(11): 2961-5). Por exemplo, a auristatina E pode reagir com ácido para-acetilbenzóico ou ácido benzoilvalérico para produzir AEB e AEVB, respectivamente. Outros derivados típicos da auristatina incluem AFP, MMAF (monometil auristatina F) e MMAE (monometil auristatina E). Auristatinas e análogos de auristatina adequados, derivados e pró-fármacos, bem como ligantes adequados para conjugação de auristatinas a anticorpos, são descritos em, por exemplo, Patentes dos EUA N°s 5,635,483, 5,780,588 e 6,214,345 e nas publicações internacionais de patente WO2002088172, WO2004010957, WO2005081711, WO2005084311, WO2005084311, WO2005084311, WO2006132670, WO2003026577, WO200700860, WO2007011968 e WO2005082023.

[0144] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a pirrolo[2,1-c][l,4] - benzodiazepina (PDB) ou um análogo, derivado ou pró-fármaco

do mesmo. PDBs e derivados de PDB adequados e tecnologias relacionadas são descritos na arte.

[0145] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a uma fração citotóxica selecionada de antraciclina, maitansina, caliqueamicina, duocarmicina, rachelmycina (CC-1065), dolastatina 10, dolastatina 15, irinotecano, monometil auristatina E, monometil auristatina F, um PDB, ou um análogo, derivado ou pró-fármaco de qualquer um dos mesmos.

[0146] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a uma antraciclina ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0147] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a maitansina ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0148] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a caliqueamicina ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0149] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a duocarmicina ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0150] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a rachelmycin (CC-1065) ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0151] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a dolastatina ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0152] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a monometil auristatina E ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0153] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a monometil auristatina F ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0154] Em algumas modalidades, o anticorpo de acordo com a presente invenção é conjugado a irinotecano ou um análogo, derivado ou pró-fármaco do mesmo.

[0155] Técnicas para conjugar molécula com anticorpos são bem conhecidas na arte (ver, por exemplo, Arnon, 1985. Em Reisfeld & Sell, *Monoclonal antibodies and cancer therapy* (Vol. 27, simpósios da UCLA sobre biologia molecular e celular, pp. 243-256 Nova York, NY: Alan R. Liss; e publicação PCT WO1989012624). Tipicamente, a molécula de ácido nucleico é covalentemente ligada a lisinas ou cisteínas no anticorpo, através da funcionalidade éster N-hidroxissuccinimida ou maleimida, respectivamente. Foram relatados métodos de conjugação usando cisteínas manipuladas ou incorporação de aminoácidos não naturais para melhorar a homogeneidade do conjugado. Junutula *et al*. (2008. *J Immunol Methods*. 332(1-2): 41-52) desenvolveram conjugação

específica de local à base de cisteína denominada "THIOMABs" (TDCs) que alegadamente exibem um índice terapêutico aprimorado em comparação com os métodos de conjugação convencionais. A conjugação com aminoácidos não naturais que foram incorporados ao anticorpo também está sendo explorada para ADCs; no entanto, a generalidade dessa abordagem ainda está para ser estabelecida. Em particular, o especialista na técnica também pode considerar o polipeptídeo contendo Fc manipulado com um marcador contendo glutamina doadora de acil (por exemplo, marcadores peptídicos ou marcadores Q contendo Gin) ou uma glutamina endógena reativada pela manipulação de polipeptídeos (por exemplo, via deleção, inserção, substituição ou mutação de aminoácido no polipeptídeo). Em seguida, uma transglutaminase pode reticular covalentemente com um agente doador de amina (por exemplo, uma pequena molécula compreendendo ou ligada a uma amina reativa) para formar uma população estável e homogênea de um polipeptídeo contendo Fc manipulado conjugado ao agente doador de amina sendo o local específico conjugado ao polipeptídeo contendo Fc através do marcador contendo glutamina doador acil ou da glutamina endógena acessível/exposta/reativa (ver, por exemplo, WO2012059882).

[0156] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é usado para prevenir e/ou tratar doenças monogênicas.

[0157] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é usado para prevenir e/ou tratar doenças monogênicas envolvendo um gene não associado à função imune, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes.

[0158] Exemplos dessas doenças monogênicas que envolvem um gene não associado à função imune, mas cuja deficiência está associada à inflamação e/ou reações imunes incluem, entre outros, distrofia muscular de Duchenne (DMD), fibrose cística, doenças de armazenamento lisossômico e α1-anti deficiência de tripsina.

[0159] Em uma modalidade, a doença monogênica que envolve um gene não associado à função imune, mas cuja deficiência está associada à inflamação e/ou reações imunes é DMD.

[0160] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é usado para prevenir e/ou tratar doenças monogênicas envolvendo um gene envolvido no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes.

[0161] Exemplos dessas doenças monogênicas que envolvem um gene envolvido no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes incluem, entre outras, imunodeficiências primárias de células T (tais como, por exemplo, tais como síndrome de desregulaçao imune,

poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X [IPEX] e poliendocrinopatia autoimune candidíase-distrofia ectodérmica [APECED]), imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto-inflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada à NLRP12 e síndrome periódica do fator de necrose tumoral 1.

[0162] Em uma modalidade, a doença monogênica envolvendo um gene envolvido no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes é APECED.

[0163] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é usado para prevenir e/ou tratar doenças monogênicas selecionadas a partir de doenças que envolvem:

- genes não associados à função imune, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes, como genes deficientes nas seguintes doenças: distrofia muscular de Duchenne (DMD), fibrose cística, doenças lisossômicas e deficiência de α1-anti-tripsina; e/ou

- genes envolvidos no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes, como genes deficientes nas seguintes doenças: Imunodeficiências primárias de células T (tais como, por exemplo, tais como

síndrome de desregulaçao imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X [IPEX] e poliendocrinopatia autoimune candidíase-distrofia ectodérmica [APECED]), imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto-inflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada a NLRP12 e síndrome periódica hereditária associada a NLRP12 e síndrome periódica associada ao receptor de fator de necrose tumoral 1.

[0164] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é usado para prevenir e/ou tratar DMD e/ou APECED.

[0165] Em uma outra modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é usado para reduzir, aliviar, diminuir ou inibir sintomas e/ou sinais associados a doenças monogênicas.

[0166] Os sintomas e sinais associados a doenças monogênicas nas quais a resposta autoimune e/ou a inflamação estão envolvidos incluem, entre outros, perda de peso, fraqueza, fadiga, febre baixa, dor nos músculos, músculos, articulações, diarreia, diabetes, alterações hormonais, alopecia, despigmentação da pele e arquitetura tecidual deteriorada de diferentes tecidos com infiltrados linfocitários.

[0167] Em particular, demonstrou-se que os sintomas monogênicos estão associados a várias desregulações moleculares, incluindo, entre outras, aumento da frequência de células $CD45RC^{+}$ (particularmente células T $CD45RC^{+}$), diminuição da frequência de células CD45RC- (particularmente células T, B e NK CD45RC-), aumento da frequência dos efetores T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ e redução dos T_{regs} $FoxP3^{+}$.

[0168] Em algumas modalidades, o anticorpo para uso de acordo com a invenção induz tolerância imunológica em um indivíduo. Em algumas modalidades, o anticorpo para uso de acordo com a invenção induz tolerância imunológica em um indivíduo.

[0169] Em algumas modalidades, o anticorpo para uso de acordo com a invenção medeia a depleção de células T que expressam CD45RC em um nível alto ou intermediário.

[0170] O nível relativo de expressão de CD45RC pode ser medido usando técnicas conhecidas do especialista, incluindo, mas não limitado a, citofluorometria. É possível distinguir três tipos de células: células que apresentam um nível alto ($CD45RC_{alto}$), um nível intermediário ($CD45RC_{int}$) e um nível negativo ($CD45RC_{neg}$) da expressão de CD45RC, conforme ilustrado na Figura 9. Conforme usado aqui, as células designadas como "$CD45RC^{+}$" abrangem as células $CD45RC_{alto}$ e $CD45RC_{int}$.

[0171] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a presente invenção é um anticorpo anti-CD45RC que esgota as células T CD45RC$_{alto}$. As células T CD45RC$_{alto}$ são linfócitos T que expressam o marcador CD45RC (CD45RC^{+}) em grande quantidade, conforme definido acima. Entende-se que o referido anticorpo que empobrece as células T CD45RC^{+alta} pode ser capaz de empobrecer outros tipos de células CD45RC^{+}, tais como as células NK ou B CD45RC^{+}.

[0172] Conforme usado aqui, os termos "esgotar" ou "esgotando", com relação às células que expressam CD45RC, referem-se a uma diminuição mensurável no número de células no indivíduo. A redução pode ser de pelo menos cerca de 10%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais. Em algumas modalidades, os termos se referem a uma diminuição no número de células CD45RC^{+} em um indivíduo ou em uma amostra para uma quantidade abaixo dos limites detectáveis. De acordo com a presente invenção, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a presente invenção medeia especificamente a depleção de células efetoras que expressam fortemente CD45RC, em particular aquelas projetadas como CD45RC$_{alto}$ T$_{eff}$.

[0173] Em particular, o referido anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a presente invenção esgota as células T CD45RC$_{alto}$ ligando-se ao hCD45RC e transduzindo sinais pró-apoptóticos e/ou ativando a citotoxicidade

mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou fagocitose dependente de anticorpo.

[0174] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a presente invenção medeia citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC).

[0175] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a presente invenção medeia a citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

[0176] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a presente invenção medeia a fagocitose dependente de anticorpo.

[0177] Em uma modalidade particular, o anticorpo isolado ou fragmento de ligação do mesmo de acordo com a presente invenção pode ser conjugado com um agente citotóxico ou um agente inibidor de crescimento.

[0178] Em algumas modalidades, o anticorpo para uso de acordo com a invenção é capaz de expandir e/ou potencializar células T reguladoras em um indivíduo.

[0179] Como usado aqui, o termo "expandir" se refere ao processo de conversão e/ou amplificação de uma dada população de células (por exemplo, células imunes, como T_{regs}). Como usado aqui, o termo "potenciado" se refere ao processo de aumentar a função de uma dada população de

células (por exemplo, aumentar a capacidade supressora de células T_{regs}).

[0180] "Células T reguladoras" ou "T_{regs}" são células T que suprimem uma resposta imune anormal ou excessiva e desempenham um papel na tolerância imunológica. As T_{regs} são tipicamente “células T reguladoras da caixa da forquilha P3 (Foxp3+)” e/ou “células $CD45RC_{baixo/-}$”. Conforme usado neste documento, os termos "células T reguladoras da caixa da forquilha P3 (Foxp3+)" e "células $CD45RC_{baixo/-}$" referem-se a 0,1-10% das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ em humanos e roedores cujo marcador característico é o fator de transcrição Foxp3.

[0181] Em algumas modalidades, o anticorpo para uso de acordo com a invenção é capaz de expandir e/ou potencializar T_{regs} $Foxp3^+$ e/ou $CD45RC_{baixo}$.

[0182] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado na forma de uma composição farmacêutica, compreendendo o referido anticorpo anti-CD45RC e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[0183] O termo "farmaceuticamente" ou "farmaceuticamente aceitável" se refere a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra reação desagradável quando administradas a um mamífero, especialmente um humano, conforme apropriado. Um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente

aceitável se refere a um material sólido, semi-sólido ou líquido não tóxico, diluente, material de encapsulamento ou formulação auxiliar de qualquer tipo. A forma das composições farmacêuticas, a via de administração, a dosagem e o regime dependem naturalmente da condição a ser tratada, da gravidade da doença, da idade, peso e sexo do paciente, etc. As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas para uma administração tópica, oral, parentérica, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea e similares.

[0184] Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende um anticorpo monoclonal anti-CD45RC selecionado do grupo que compreende ou consiste em OX-22, OX-32, 3H1437, MT2, RP1/12, DNL 1.9, C455.1F e derivados dos mesmos; e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[0185] Portanto, um anticorpo da invenção pode ser combinado com excipientes, carreador ou veículo farmaceuticamente aceitáveis, e opcionalmente matrizes de liberação sustentada, como polímeros biodegradáveis, para formar composições terapêuticas.

[0186] Preferencialmente, as composições farmacêuticas contêm veículos que são farmaceuticamente aceitáveis para uma formulação capaz de ser injetada. Podem ser, em particular, soluções salinas isotônicas, estéreis

(fosfato monossódico ou dissódico, sódio, potássio, cálcio ou cloreto de magnésio e similares ou misturas de tais sais) ou composições secas, especialmente liofilizadas que, por adição, dependendo da caso, de água esterilizada ou soro fisiológico, permitem a constituição de soluções injetáveis. As doses utilizadas para a administração podem ser adaptadas em função de vários parâmetros e, em particular, em função do modo de administração utilizado, da patologia relevante ou, alternativamente, da duração desejada do tratamento. Para preparar composições farmacêuticas, uma quantidade eficaz do anticorpo pode ser dissolvida ou dispersa em um carreador ou meio aquoso farmaceuticamente aceitável. As formas farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis; formulações incluindo óleo de gergelim, óleo de amendoim ou propilenoglicol aquoso; e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma deve ser estéril e fluida, na medida em que exista uma fácil seringabilidade. Deve ser estável nas condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminante de microrganismos, como bactérias e fungos.

[0187] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção será formulado para administração ao indivíduo.

[0188] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado sistemicamente ou localmente.

[0189] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado por injeção, por via oral, tópica, nasal, bucal, retal, vaginal, intratraqueal, endoscópica, transmucosal ou por administração percutânea.

[0190] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser injetado, de preferência injetado sistemicamente.

[0191] Exemplos de formulações adaptadas para injeção incluem, mas não se limitam a, soluções, como, por exemplo, soluções aquosas estéreis, géis, dispersões, emulsões, suspensões, formas sólidas adequadas para uso na preparação de soluções ou suspensões com a adição de um líquido antes da utilização, tal como, por exemplo, pó, formas lipossômicas e similares.

[0192] Exemplos de injeções sistêmicas incluem, mas não estão limitados a, injeção e perfusão intravenosa (iv), subcutânea, intramuscular (im), intradérmica (id), intraperitoneal (ip) e perfusão.

[0193] Em uma modalidade, quando injetado, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é estéril. Os métodos para obter uma composição estéril

incluem, entre outros, a síntese de GMP (onde GMP significa "Boas práticas de fabricação").

[0194] As formas injetáveis estéreis de uma composição podem ser uma suspensão aquosa ou uma oleaginosa. Estas suspensões podem ser formuladas de acordo com técnicas conhecidas na arte utilizando agentes dispersantes ou umectantes e agentes de suspensão adequados. A preparação injetável estéril também pode ser uma solução ou suspensão injetável estéril em um diluente ou solvente parentericamente aceitável não tóxico. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregados estão água, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Além disso, óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como solvente ou meio de suspensão. Para este fim, qualquer óleo fixo suave pode ser empregado, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Os ácidos graxos, como o ácido oleico e seus derivados de glicéridos, são úteis na preparação de injetáveis, assim como os óleos naturais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, como o azeite ou o óleo de mamona, especialmente em suas versões polioxietiladas. Estas soluções ou suspensões oleosas também podem conter um diluente ou dispersante de álcool de cadeia longa, como carboximetilcelulose ou agentes dispersantes similares que são comumente usados na formulação de formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis, incluindo emulsões

e suspensões. Outros surfactantes comumente usados, como Tweens, Spans e outros agentes emulsificantes ou intensificadores de biodisponibilidade que são comumente usados na fabricação de formas sólidas, líquidas ou outras formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis também podem ser utilizados para os propósitos da formulação.

[0195] Será entendido que outras vias de administração adequadas também são contempladas na presente invenção, e o modo de administração será finalmente decidido pelo médico assistente dentro do escopo do julgamento médico correto. Além da administração por injeção (iv, ip, im e similares), outras rotas estão disponíveis, como a nebulização (Respaud *et al.*, 2014. *MAbs*. 6(5): 1347-55; Guilleminault *et al.*, 2014. *J Control Release* 196: 344-54; Respaud *et al.*, 2015. *Expert Opin Drug Drug* 12(6): 1027-39) ou administração subcutânea (Jackisch *et al.*, 2014. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 74(4): 343-349; Solal-Celigny, 2015. *Expert Rev Hematol*. 8(2): 147-53).

[0196] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado ao indivíduo em necessidade do mesmo em uma quantidade terapeuticamente eficaz.

[0197] No entanto, será entendido que o uso diário total do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção será decidido pelo médico assistente dentro do

escopo do julgamento médico correto. O nível de dose terapeuticamente eficaz específico para qualquer paciente em particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a doença a ser tratada e a gravidade da doença; atividade do anticorpo anti-CD45RC empregado; a idade, peso corporal, estado geral de saúde, sexo e dieta do indivíduo; o tempo de administração, via de administração e taxa de excreção do anticorpo anti-CD45RC específico empregado; a duração do tratamento; medicamentos utilizados em combinação ou coincidentes com o anticorpo anti-CD45RC específico empregado; e fatores semelhantes bem conhecidos nas artes médicas. Por exemplo, está bem dentro da habilidade da arte iniciar doses do composto em níveis inferiores aos necessários para alcançar o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado. A dose total necessária para cada tratamento pode ser administrada por doses múltiplas ou em uma dose única. No entanto, a dosagem diária dos anticorpos pode variar em uma ampla faixa de 0,01 a 1.000 mg por adulto por dia. Preferencialmente, as composições contêm 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 e 500 mg do ingrediente ativo para o ajuste sintomático da dosagem ao indivíduo a ser tratado. Um medicamento contém tipicamente de cerca de 0,01 mg a cerca de 500 mg do ingrediente ativo, preferencialmente de 1 mg a cerca de 100

mg do ingrediente ativo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do medicamento é normalmente fornecida a um nível de dosagem de 0,0002 mg/kg a cerca de 20 mg/kg de peso corporal por dia, especialmente de cerca de 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por dia.

[0198] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção varia de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, de cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 4 mg/kg, de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, de cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 2,5 mg/kg, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 2 mg/kg.

[0199] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção varia de cerca de 10 µg/kg a cerca de 400 µg/kg, de cerca de 20 µg/kg a cerca de 300 µg/kg, de cerca de 30 µg/kg a cerca de 250 µg/kg, de cerca de 35 µg/kg a cerca de 200 µg/kg, de cerca de 40 µg/kg a cerca de 160 µg/kg.

[0200] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada uma vez ao dia, duas vezes ao dia, três vezes ao dia ou mais.

[0201] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada todos os dias,

a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, a cada seis dias.

[0202] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas.

[0203] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada todos os meses, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada cinco meses, a cada seis meses.

[0204] Em uma modalidade preferida, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada a cada 12 horas, a cada 24 horas, a cada 36 horas, a cada 48 horas, a cada 48 horas, a cada 60 horas, a cada 72 horas, a cada 84 horas, a cada 96 horas.

[0205] Em uma modalidade preferida, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada a cada 60 horas. Em uma modalidade preferida, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada a cada 84 horas.

[0206] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é para administração aguda.

Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção é para administração crônica.

[0207] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada por cerca de 5 dias, 7 dias, 10 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 ano ou mais.

[0208] Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada por um período de tempo que varia de cerca de uma semana a cerca de oito semanas, de cerca de duas semanas a cerca de sete semanas, de cerca de duas semanas a cerca de seis semanas, de cerca de duas semanas a cerca de cinco semanas.

[0209] Em uma modalidade preferida, uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrada por um período de tempo que varia de cerca de 10 dias a cerca de 40 dias, de cerca de 15 dias a cerca de 35 dias, de cerca de 20 dias a cerca de 30 dias.

[0210] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado sozinho.

[0211] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado em

combinação com pelo menos um medicamento terapêutico, tal como, por exemplo, antes, concomitantemente com ou após um medicamento terapêutico.

[0212] Em algumas modalidades, o medicamento terapêutico pode ser um medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório. O termo "medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório" se refere a uma classe de medicamentos que suprimem, reduzem, diminuem ou aliviam a força da resposta imune em um indivíduo. Tais medicamentos são particularmente adequados para o tratamento de doenças monogênicas ligadas a genes envolvidos no sistema imune ou a genes não associados a funções imunes, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes. A utilização do medicamento imunossupressor de acordo com a invenção, juntamente com o anticorpo anti-CD45RC de acordo com a invenção, ajudaria portanto a reduzir o impacto da resposta imune no indivíduo afetado por uma doença monogênica.

[0213] Exemplos adequados de medicamentos imunossupressoras incluem, sem limitação, inibidores de mTOR, tais como, por exemplo, sirolimus, everolimus, ridaforolimus, temsirolimus, umirolimus e zotarolimus; Antagonistas do receptor de IL-1 tais como, por exemplo, anacinra; antimetabólitos tais como, por exemplo, azatioprina, leflunomida, metotrexato, ácido micofenólico e teriflunomida; IMiDs como, por exemplo, apremilast,

lenalidomida, pomalidomida e talidomida; e anticorpos como, por exemplo, eculizumabe, adalimumabe, afelimomabe, certolizumabe pegol, golimumabe, infliximabe, nerelimomabe, mepolizumabe, omalizumabe, faralimomabe, elsilimomabe, lebrikizizizbe, ustekinumabe, secukinumabe, secotelinumabe, secotelinumabe, secotelinumabe, secotelinumabe, zanolimumab, efalizumab, erlizumab, obinutuzumab, rituximab, ocrelizumab, pascolizumab, gomiliximab, lumiliximab, teneliximab, toralizumab, aselizumab, galiximabe, gavilimomab, ruplizumab, belimumab, blisibimod, ipilimumab, tremelimumabe, bertilimumab, lerdelimumab, metelimumab, natalizumab, tocilizumab, odulimomab, basiliximab, daclizumabe, inolimomabe, zolimomabe aritox, atorolimumabe, cedelizumabe, fontolizumabe, maslimomabe, morolimumabe, pexelizumabe, reslizumabe, rovelizumabe, siplizumabe, talizumabe, telimomabept, vapalix,

[0214] Exemplos adequados de medicamentos anti-inflamatórios incluem, sem limitação, corticoides (como glicocorticóides selecionados de dexametasona, betametasona, 17-valerato de betametasona-17, triancinolona, acetonida de triamcinolona, acetonida de fluocinolona, fluocinonida, cortisona, hidrocortisona, prednisona, budnisona, prednisona, e deflazacort).

[0215] De preferência, o medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório é prednisolona ou deflazacort.

[0216] Por conseguinte, a presente invenção abrange composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo anti-CD45RC como definido anteriormente, um medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende um anticorpo anti-CD45RC como definido anteriormente, prednisolona ou deflazacort, e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[0217] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado em combinação com terapia gênica ou terapia celular. Vantajosamente, a referida terapia gênica ou terapia celular é usada antes ou após o uso do referido anticorpo anti-CD45RC, preferencialmente antes do uso do referido anticorpo anti-CD45RC.

[0218] Por conseguinte, a presente invenção abrange composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo anti-CD45RC como definido anteriormente, um vírus ou lentivírus adeno-associado contendo pelo menos um gene de mini-distrofina e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial. O termo "gene da mini-distrofina" se refere aqui a genes da mini-distrofina

sintética de 6 a 8 kb, como os genes da mini-distrofina descritos por Odom *et al*. (2011. *Mol Ther*. 19(1): 36-45), Clemens *et al*. (1995. *Hum Gene Ther*. 6(11): 1477-85), Harper *et al*. (2002. *Nat Med*. 8(3): 253-61) e Lai *et al*. (2009. *J Clin Invest*. 119(3): 624-35).

[0219] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD45RC para uso de acordo com a invenção deve ser administrado em combinação com um medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório e com terapia gênica ou terapia celular.

[0220] Por conseguinte, a presente invenção abrange composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo anti-CD45RC como definido anteriormente, um medicamento imunossupressor e/ou anti-inflamatório, um vírus ou lentivírus adeno-associado contendo pelo menos um gene de mini-distrofina e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0221] A Figura 1 é um conjunto de gráficos que mostram o número de leucócitos no músculo e baço de ratos *Dmd*$_{mdx}$. Músculos esqueléticos de membros posteriores e baço foram colhidos de ratos do tipo selvagem (WT) ou *Dmd*$_{mdx}$ (KO) de ninhada nos pontos de idade indicados. O músculo e o baço foram digeridos com colagenase e as células mononucleares

foram isoladas usando um gradiente de densidade. (A) Análise representativa de plotagem de pontos do músculo de células mononucleares (painel esquerdo) e baço (painel direito) de animais com 8 semanas de idade corados com um corante de viabilidade e um anticorpo monoclonal CD45 anti-leucócitos pan (OX1). (B) Número de células $CD45_+$ por grama de tecido muscular ou pelo baço total em diferentes momentos. WT, n = 4, 5, 7, 7, 9 em 2, 4, 8, 12 e 16 semanas, respectivamente. KO, n = 3, 6, 10, 11, 16 às 2, 4, 8, 12 e 16 semanas, respectivamente. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0222] A Figura 2 é um conjunto de dois gráficos que mostram o número de células TCR_+ no músculo e baço de ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$. As PBMCs dos membros posteriores (painel esquerdo) e baço (painel direito) foram obtidas conforme explicado na legenda da Figura 1. O número de células TCR_+ foi determinado pela coloração de PBMCs com um anticorpo monoclonal anti-TCRab (clone R7/3) e calculando o número de células TCR_+ entre células $CD45R_+$ viáveis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

[0223] A Figura 3 é um conjunto de quatro gráficos que mostram os números de células T $CD8_+$ $CD45RC_{alto}$ e $CD45RC_{int/neg}$ após o tratamento usando um anticorpo monoclonal anti-CD45RC. Ratos de controle do tipo selvagem (WT) ou *Dmd*$_{mdx}$ (KO) receberam desde a segunda semana de vida injeções intraperitoneais do anticorpo monoclonal CD45RC de

camundongo anti-rato até a semana 12, quando os animais foram sacrificados. As células mononucleares do músculo e do baço foram isoladas e analisadas quanto à presença de células TCR^+ $CD8^+$ que expressam CD45RC em níveis altos ($CD45RC_{alto}$) ou intermediários/negativos ($CD45RC_{int/neg}$). Cada ponto representa um único animal. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

[0224] A Figura 4 é um gráfico que mostra a força muscular em ratos Dmd_{mdx} após o tratamento com um anticorpo monoclonal anti-CD45RC. Ratos do tipo selvagem (WT) ou Dmd_{mdx} (KO) receberam injeções intraperitoneais de CD45RC ou prednisolona de camundongo anti-rato, desde a segunda semana de vida até a semana 12, quando a força muscular foi analisada usando um teste de aderência. Cada ponto representa um único animal. * $p < 0,05$.

[0225] A Figura 5 é um conjunto de quatro gráficos que mostram os números de células T $CD8^+$ $CD45RC_{alto}$ e $CD45RC_{int/neg}$ após o tratamento com prednisolona. Ratos de controle do tipo selvagem (WT) ou Dmd_{mdx} (KO) receberam desde a segunda semana de vida injeções intraperitoneais de prednisolona até a semana 12, quando os animais foram sacrificados. As células mononucleares do músculo e do baço foram isoladas e analisadas quanto à presença de células TCR^+ $CD8^+$ que expressam CD45RC em níveis altos ($CD45RC_{alto}$) ou intermediários/negativos ($CD45RC_{int/neg}$). Cada ponto representa um único animal. * $p < 0,05$.

[0226] A Figura 6 é um conjunto de dois gráficos que mostram o peso de ratos do tipo selvagem ou *Dmd*$_{mdx}$ durante o tratamento usando prednisolona ou anticorpo monoclonal anti-CD45RC. Os ratos controle do tipo selvagem (WT) ou *Dmd*$_{mdx}$ (KO) receberam injeções intraperitoneais de prednisolona ou anticorpo monoclonal anti-CD45RC (OX22) desde a segunda semana de vida até a semana 12 de idade e o peso foi registrado nos momentos indicados.

[0227] A Figura 7 é um conjunto de fotografias e um gráfico que mostram sinais autoimunes reduzidos da doença em ratos *Aire*$^{-/-}$ tratados com mAb anti-CD45RC. Os ratos *Aire*$^{-/-}$ receberam desde a segunda semana de vida as injeções intraperitoneais de camundongo CD45RC MAb de rato (clone OX22, 1,5 mg/kg duas vezes por semana) até a semana 20, quando os animais foram sacrificados. (A). Imagem que mostra o aspecto visual de ratos *Aire*$^{-/-}$ com 20 semanas de idade tratados com controle de isotipo (linha superior) ou mAb anti-CD45RC (linha inferior). (B) Imagem que mostra o tamanho do timo de ratos *Aire*$^{-/-}$ tratados com mAb anti-CD45RC ou isotipo de controle. (C) Pesos de ratos SPD da mesma ninhada *Aire*$^{-/-}$ mAb anti-CD45RC ou controle de isotipo foram medidos todas as semanas durante as 20 semanas seguintes ao nascimento. Os resultados são mostrados como a % do peso corporal inicial a partir da segunda semana após o nascimento (média de 31,3 g) ± SEM (n = 3).

[0228] A Figura 8 é um conjunto de gráficos que mostram a depleção eficiente de células T $CD45RC_{alto}$ no baço e nos linfonodos mesentéricos (MLN) após a administração de mAb anti-CD45RC. Análise representativa de plotagem de pontos de células mononucleares (células T $CD4^+$ e $CD8^+$) de MLN e baço de *Aire*$^{-/-}$ tratados com anti-CD45RC ou controle de isotipo Mabs ou animais não tratados WT às 20 semanas de idade e tratados a partir da segunda semana corados com um corante de viabilidade e um anti-leucócito pan CD45 MAb (OX1), CD3, TCR, CD4 e CD45RC MAb.

[0229] A Figura 9 é um gráfico que define 3 populações de células $CD8^+$ de acordo com os diferentes níveis de expressão de CD45RC ($CD45RC_{alto}$, $CD45RC_{int}$ e $CD45RC_{neg}$) em células T $CD8^+$ de rato marcadas com Mab OX22 anti-CD45RC.

[0230] A Figura 10 é um conjunto de dois géis de SDS-PAGE mostrando o efeito do tratamento com anti-CD45RC MAb nos autoanticorpos séricos em ratos tipo *Aire* deficientes. Ratos tipo *Aire* deficientes foram tratados com (A) um controle isotípico MAb ou (B) um anti-CD45RC MAb (OX22) a 1,5 mg/kg duas vezes por semana, das semanas 2 a 20 de idade. Coloração de prata. A β-actina foi usada como controle.

[0231] A Figura 11 é um conjunto de oito fotografias de seções de tecido (timo, pâncreas, pele, rim) coradas com hematoxilina-eosina-safran, mostrando a arquitetura do tecido e infiltrados linfocitários em ratos tratados com um

anticorpo isotipo (fotografias à esquerda) ou com um anticorpo anti-CD45RC (fotografias à direita). As setas brancas representam as principais regiões de cada órgão que diferem entre os receptores tratados com anti-CD45RC ou isotipo.

EXEMPLOS

Materiais e métodos relacionados aos Exemplos 1 a 4

Preparação de suspensões unicelulares de músculo e baço

[0232] Os músculos de ambos os membros posteriores de ratos WT ou *Dmd*$_{mdx}$ foram excisados e pesados. Os músculos foram picados e colocados em tubos MACS C suaves com colagenase D na presença de FCS 2%, 1 mM de EDTA. Duas execuções de 30 minutos cada, em um dissociador MACS suave, foram realizadas com nova colagenase adicionada entre cada execução. As células foram suspensas em 30 mL de PBS FCS 2%, EDM 1 mM, foram então aplicadas a 15 mL de Hystopaque e centrifugadas a 1000 g por 30 minutos sem interrupção. As células mononucleares foram coletadas da interface Hystopaque e PBS, lavadas e suspensas em PBS FCS 2%, 1 mM de EDTA.

[0233] O baço foi colhido, perfundido com PBS e digerido por colagenase D por 15 minutos a 37 °C. As células foram suspensas em PBS FCS 2%, 1 mM de EDTA e as células mononucleares foram recuperadas como explicado acima.

Análise por citometria de fluxo

[0234] As células mononucleares foram coradas com anticorpos contra os seguintes antígenos: CD45 (clone OX-1), receptor de células T (TCR; clone R7/3), CD45RC (clone OX22), CD8 (clone OX8) e CD4 (W3/25) , bem como com os corantes de viabilidade eFluor506 ou eFluor450, todos da eBiosciences. A análise foi realizada em um BD FACS Verse com Software FACSuite versão 1.0.6. A análise pós-aquisição foi realizada com o software FlowJo.

Tratamento com anti-CD45RC ou prednisolona

[0235] Ratos do tipo selvagem (WT) ou *Dmd*$_{mdx}$ (KO) receberam injeções intraperitoneais de um anticorpo monoclonal CD45RC de camundongo anti-rato (clone OX22, 2 mg/kg, a cada 3,5 dias) da segunda semana de vida até a semana 12.

[0236] A prednisolona foi administrada por injeções intraperitoneais (0,5 mg/kg, 5 dias por semana) da segunda semana de vida até a semana 12.

[0237] Na semana 12 da idade, os ratos tratados foram analisados quanto à força muscular utilizando um teste de aderência.

Teste de aderência

[0238] Os ratos foram colocados com as patas dianteiras em uma grade e gentilmente puxados para trás até liberar a aderência. Um medidor de aderência (Bio-GT3,

BIOSEB, França), conectado a um transdutor de força, mediu a força de pico gerada.

Exemplo 1

Análise do total de leucócitos e células T em ratos *Dmd*$_{mdx}$

[0239] Os leucócitos no músculo e baço de ratos *Dmd*$_{mdx}$ foram analisados por citometria de fluxo (Figura 1).

[0240] O total de leucócitos no músculo dos ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ foi comparável às 2 semanas de idade, mas às 4 semanas os ratos *Dmd*$_{mdx}$ mostraram um aumento acentuado que foi mantido até a semana 8 e depois diminuiu nas semanas 12 e 14, embora ainda seja significativamente maior do que em ratos WT da mesma ninhada.

[0241] Os números de leucócitos do baço foram comparáveis entre os ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ em todos os momentos analisados.

[0242] A análise do número de células TCR^{+} no músculo e baço de ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ mostrou um aumento significativo no músculo de ratos *Dmd*$_{mdx}$ às 4 e 12 semanas de idade, com uma tendência aumentada nas 8 e 16 semanas (Figura 2).

[0243] O número de células TCR^{+} no baço não mostrou diferenças entre os ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ em nenhum momento.

Exemplo 2

O tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD45RC esgota as células T CD45RC$_{alto}$

[0244] A administração de um anticorpo monoclonal anti rato-CD45RC de camundongo a partir da segunda semana de idade resultou na depleção parcial de células T $CD8^+$ $CD45RC_{alto}$ analisadas às 12 semanas de idade no músculo de ratos *Dmd*$_{mdx}$ e no baço de ambos os ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ da mesma ninhada (Figura 3).

[0245] T $CD8^+$ ou $CD4^+$ $CD45RC_{int/neg}$, incluindo todos os T_{regs} $CD8^+$ e $CD4^+$, não foram modificados no baço ou músculo de ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ (Figura 3).

[0246] Todas as outras populações principais de leucócitos (macrófagos, células B e células NK) permaneceram inalteradas (dados não mostrados).

Exemplo 3

Tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD45RC melhora a força muscular em ratos *Dmd*$_{mdx}$

[0247] Para examinar se a função muscular foi melhorada pelo tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD45RC, a força muscular foi analisada por um teste de aderência dos membros anteriores em ratos WT e *Dmd*$_{mdx}$ com 12 semanas de idade após o início do tratamento com 2 semanas de idade.

[0248] Uma diminuição significativa na força de aderência do membro anterior indicou uma alteração generalizada no desempenho muscular de todo o corpo. Como descrito anteriormente por Larcher *et al*. (2014. *PLoS One*.

9(10): e110371), uma força 30% mais fraca foi exercida por ratos *Dmd*$_{mdx}$ em comparação com ratos da mesma ninhada WT.

[0249] Após a administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RC, a força muscular em ratos *Dmd*$_{mdx}$ vs. ratos *Dmd*$_{mdx}$ não tratados aumentou significativamente e era indistinguível dos controles WT da mesma ninhada (Figura 4).

Exemplo 4

Tratamento com prednisolona melhorou a força muscular esquelética

[0250] Como os corticóides são o tratamento padrão em pacientes com DMD (Alman, 2005. *J Pediatr Orthop*. 25(4): 554-6), o efeito da prednisolona foi analisado na força muscular de ratos *Dmd*$_{mdx}$.

[0251] O tratamento de ratos *Dmd*$_{mdx}$ com prednisolona, desde a segunda semana de idade, aumentou a força muscular em 12 semanas para níveis idênticos aos de ratos tratados com WT ou anti-CD45RC (Figura 4).

[0252] Curiosamente, os ratos tratados com prednisolona também mostraram uma diminuição específica das células CD8$^+$ CD45RC$_{alto}$ no músculo e no baço dos ratos *Dmd*$_{mdx}$ e no baço dos ratos WT, enquanto as células CD8$^+$ CD45RC$_{int/neg}$ foram mantidas (Figura 5).

[0253] Da mesma forma, as células CD4$^+$ CD45RC$_{alto}$ foram numericamente reduzidas no músculo e no baço de ratos

Dmd$_{mdx}$ e no baço de ratos WT, enquanto as células CD8^{+} CD45RC$_{int/neg}$ foram mantidas (dados não mostrados).

[0254] Os ratos *Dmd*$_{mdx}$ tratados com prednisolona apresentaram redução severa no crescimento animal, enquanto os ratos tratados com anticorpo monoclonal anti-CD45RC não apresentaram (Figura 6).

Exemplo 5

Tratamento da doença APECED

Materiais e métodos

Isolamento celular

[0255] O baço e os linfonodos foram digeridos pela colagenase D por 30 minutos a 37 °C. A reação foi parada pela adição de 0,01 mM de EDTA.

[0256] As células do sangue e da medula óssea também foram isoladas e os glóbulos vermelhos foram lisados usando uma solução de lise (8,29 g de NH_4Cl, 1 g de $KHCO_3$, 37,2 mg de EDTA qsp 1 L de água desionizada pH 7,2-7,4).

Anticorpos e citometria de fluxo

[0257] O fenótipo celular foi analisado utilizando anticorpos monoclonais do farmacêutico BD: contra TCRαβ (R73), CD25 (Ox39), CD4 (Ox35) e CD45 (Ox1).

[0258] Foram utilizados Abs contra CD45RC (Ox22) e CD8 (Ox8) produzidos em nosso laboratório.

[0259] Os anticorpos foram utilizados para corar as células e a fluorescência foi medida com um citômetro de

fluxo FACSCanto II (BD Bioscience) e o software FlowJo foi usado para analisar os dados. As células foram primeiramente bloqueadas em sua morfologia e, em seguida, as células mortas foram excluídas por coloração com corante de viabilidade fixável efluor 506 (Ebioscience).

Tratamento com anti-CD45RC ou controle de isotipo

[0260] Os ratos Aire-/- (KO) receberam injeções intraperitoneais de um anticorpo monoclonal CD45RC de camundongo anti-rato (clone OX22, 1,5 mg/kg, a cada 3,5 dias) da segunda semana da idade até a semana 20, quando os animais foram sacrificados. O controle de isotipo foi administrado de maneira semelhante. Os ratos foram pesados duas vezes por semana desde o início do tratamento até o dia do sacrifício. Na semana 20, ratos tratados foram sacrificados e analisados.

Detecção de autoanticorpos

[0261] Soro de ratos Aire deficientes tratados com anti-CD45RC ou tratados com controle de isotipo às 20 semanas de idade foram incubados com membranas nas quais lisados de diferentes órgãos (baço, cólon, rim, olho, pulmão, testículo, linfonodos mesentéricos [MLN] e íleo) de um rato deficiente em Il2rg (subunidade gama de receptores IL2rg: interleucina 2), portanto sem imunoglobulinas endógenas, foram previamente submetidos a eletroforese. A ligação dos autoanticorpos de rato foi revelada usando anticorpos de

imunoglobulina anti-rato ou com um anticorpo anti-β-actina acoplado à peroxidase.

Histoquímica

[0262] Os órgãos de ratos Aire deficientes tratados com anti-CD45RC ou tratados com um controle de isotipo foram colhidos com 20 semanas de idade. Seções de tecido (timo, pâncreas, pele, rim) foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina-safran.

Resultados

[0263] Observamos que 100% dos ratos Aire com deficiência desenvolveram espontaneamente alopecia e despigmentação da pele em animais tratados com controle de isotipo (Figura 7A, linha superior), sinais que se correlacionam com uma doença autoimune grave e que são manifestações clínicas regularmente encontradas em pacientes com APECED.

[0264] Em contraste, ratos Aire deficientes tratados com mAb anti-CD45RC não desenvolveram alopecia e despigmentação da pele (Figura 7A, linha inferior), tiveram um tamanho de timo maior (Figura 7B) e um peso corporal normal (Figura 7C), indicando um crescimento normal, uma preservação da estrutura do timo e também diminuição da doença autoimune.

[0265] A administração de um anticorpo monoclonal anti-CD45RC de camundongo a partir da segunda semana de idade

resultou em forte depleção de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ $CD45RC^{alto}$ no baço e no linfonodo de ratos Aire-/- em comparação com ratos tratados com controle de isotipo e ratos WT não tratados (Figura 8).

[0266] O número de outras populações principais de leucócitos (macrófagos, células B e células NK) não foi alterado (dados não mostrados).

[0267] As análises de autoanticorpos direcionados contra antígenos teciduais também foram avaliadas, por western blot, em homogenatos teciduais e soro.

[0268] Na ausência de tratamento com anticorpo monoclonal anti-rato-CD45RC, muitas bandas foram detectadas em diferentes órgãos, indicando a presença de antoanticorpos (Figura 10A).

[0269] Por outro lado, o tratamento com um anticorpo monoclonal anti-rato-CD45RC reduziu o número de bandas e, portanto, o número de autoanticorpos (Figura 10B).

[0270] Na semana 20 do tratamento, a arquitetura do tecido foi destruída e infiltrados de linfócitos estavam presentes em muitos órgãos na ausência de tratamento, enquanto o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-rato-CD45RC restaurou a integridade do tecido e reduziu o infiltrado de linfócitos (Figura 11).

Conclusão

[0271] No total, os dados apresentados acima nos Exemplos 1-5 fornecem uma demonstração clara de inflamação reduzida, se não inibida, e reações autoimunes tipicamente associadas a certas doenças monogênicas através do uso de anticorpos anti-CD45RC. Um desequilíbrio entre T_{eff} e T_{regs} com o resultado final de respostas T aumentadas, mas também respostas mediadas por células B através da produção de autoanticorpos, está envolvido em outras doenças monogênicas, como fibrose cística, doenças lisossômicas, deficiência de α1-anti-tripsina, IPEX , Imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome autoinflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada ao NLRP12 e síndrome periódica associada ao receptor de fator de necrose tumoral 1.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-CD45RC **caracterizado** pelo fato de ser para uso na prevenção e/ou no tratamento de doenças monogênicas selecionadas do grupo que compreende:

- doenças monogênicas causadas por um gene que não está associado à função imune, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes, e selecionadas a partir de distrofia muscular de Duchenne (DMD), fibrose cística, doenças lisossômicas e deficiência de α1-anti-tripsina; e/ou

- doenças monogênicas causadas por um gene envolvido no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes e selecionadas a partir de síndrome ligada ao X por enteropatia poliendocrinopatia por imunodesregulação, (IPEX), distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica (APECED), célula B imunodeficiências primárias, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto inflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada ao NLRP12 e síndrome periódica associada ao receptor do fator de necrose tumoral 1.

2. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo monoclonal.

3. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o

referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo monoclonal anti-CD45RC humano.

4. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo quimérico, um anticorpo biespecífico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano.

5. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a prevenção e/ou o tratamento de doenças monogênicas compreende redução, alívio, diminuição e/ou inibição de sintomas ou sinais associados às referidas doenças monogênicas, preferencialmente de sintomas ou sinais autoimunes e/ou inflamatórios.

6. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC esgota as células T $CD45RC_{alto}$.

7. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC é um anticorpo multiespecífico compreendendo um primeiro sítio de ligação ao antígeno direcionado contra CDR45RC e pelo menos um segundo sítio de ligação ao antígeno direcionado contra uma célula efetora capaz de mediar o esgotamento de células T

$CD45RC_{alto}$ através de ligação direta, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou fagocitose dependente de anticorpo.

8. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 7, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC é conjugado a uma fração citotóxica.

9. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de ser na forma de uma composição farmacêutica compreendendo o referido anticorpo anti-CD45RC e um carreador ou excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

10. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC deve ser administrado em combinação com um fármaco imunossupressor e/ou anti-inflamatório.

11. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD45RC deve ser administrado em combinação com terapia gênica ou terapia celular.

12. Anticorpo anti-CD45RC, para uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a referida terapia gênica ou terapia celular deve ser administrada antes ou após a administração do referido anticorpo anti-CD45RC, preferencialmente antes da administração do referido anticorpo anti-CD45RC.

13. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que a referida doença monogênica é selecionada a partir de DMD, fibrose cística, doenças de armazenamento lisossômico e deficiência de α1-anti-tripsina, de preferência a referida doença monogênica é DMD.

14. Anticorpo anti-CD45RC para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que a referida doença monogênica é selecionada a partir de IPEX, APECED, imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto inflamatória e autoimune mista, síndrome da febre periódica hereditária associada ao NLRP12 e síndrome periódica associada ao receptor do fator de necrose tumoral 1, preferencialmente a referida doença monogênica é APECED.

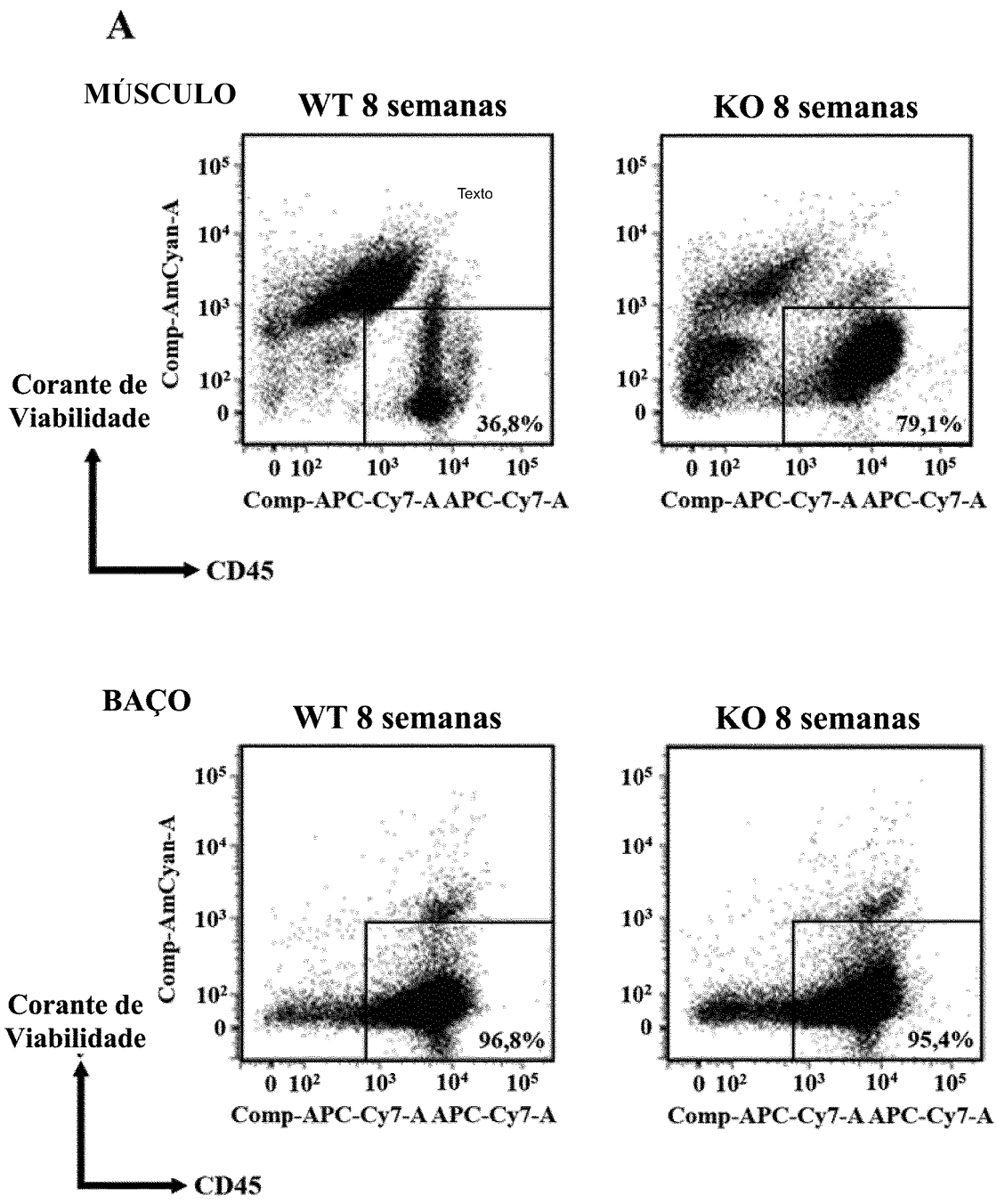

A
MÚSCULO
WT 8 semanas
KO 8 semanas
Texto
Comp-AmCyan-A
Corante de Viabilidade
36,8%
79,1%
Comp-APC-Cy7-A APC-Cy7-A
CD45
BAÇO
WT 8 semanas
KO 8 semanas
Comp-AmCyan-A
Corante de Viabilidade
96,8%
95,4%
Comp-APC-Cy7-A APC-Cy7-A
CD45

FIG. 1A

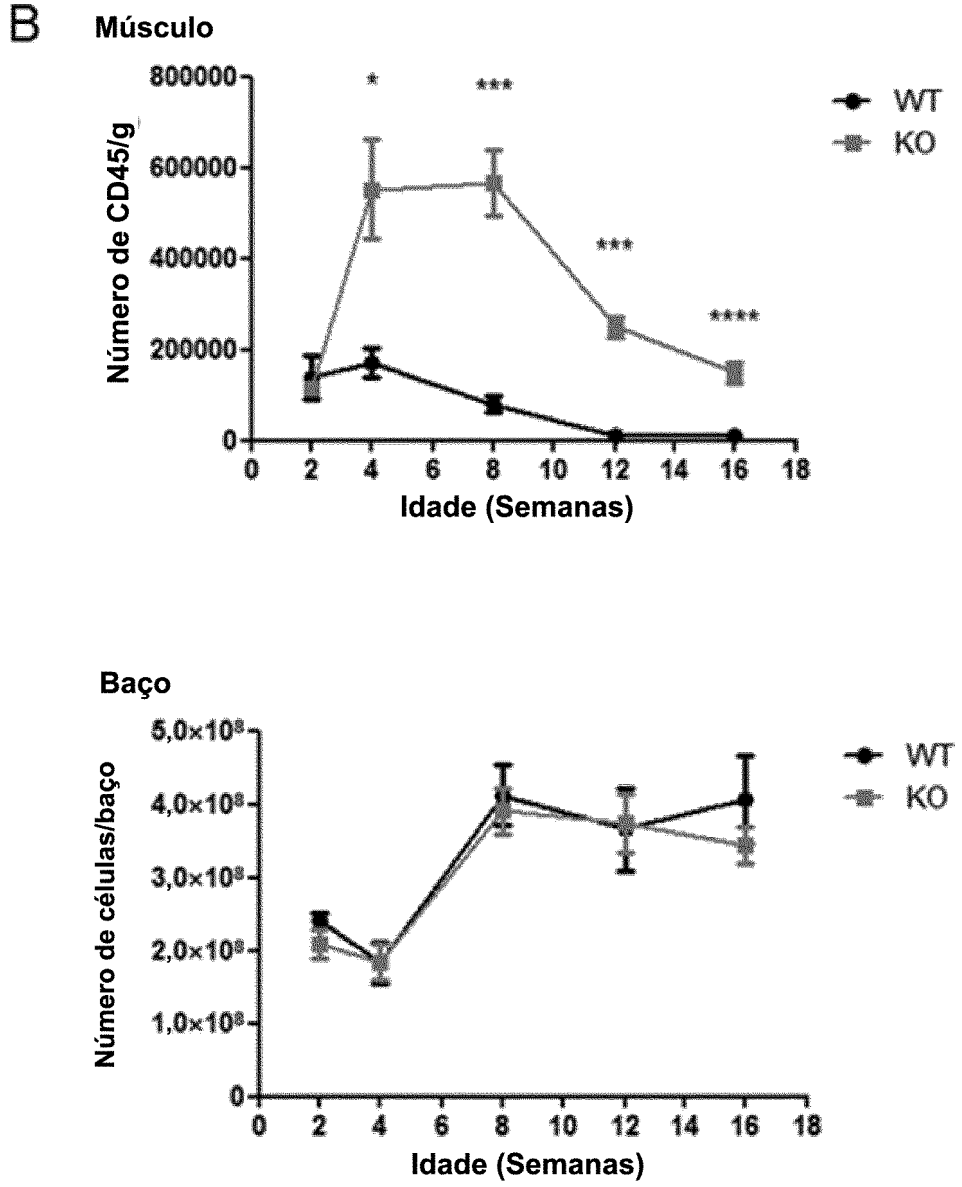

B
Músculo
800000
600000
400000
200000
0
Número de CD45/g
*
***
***
****
WT
KO
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Idade (Semanas)
Baço
5,0x10⁸
4,0x10⁸
3,0x10⁸
2,0x10⁸
1,0x10⁸
0
Número de células/baço
WT
KO
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Idade (Semanas)

FIG. 1B

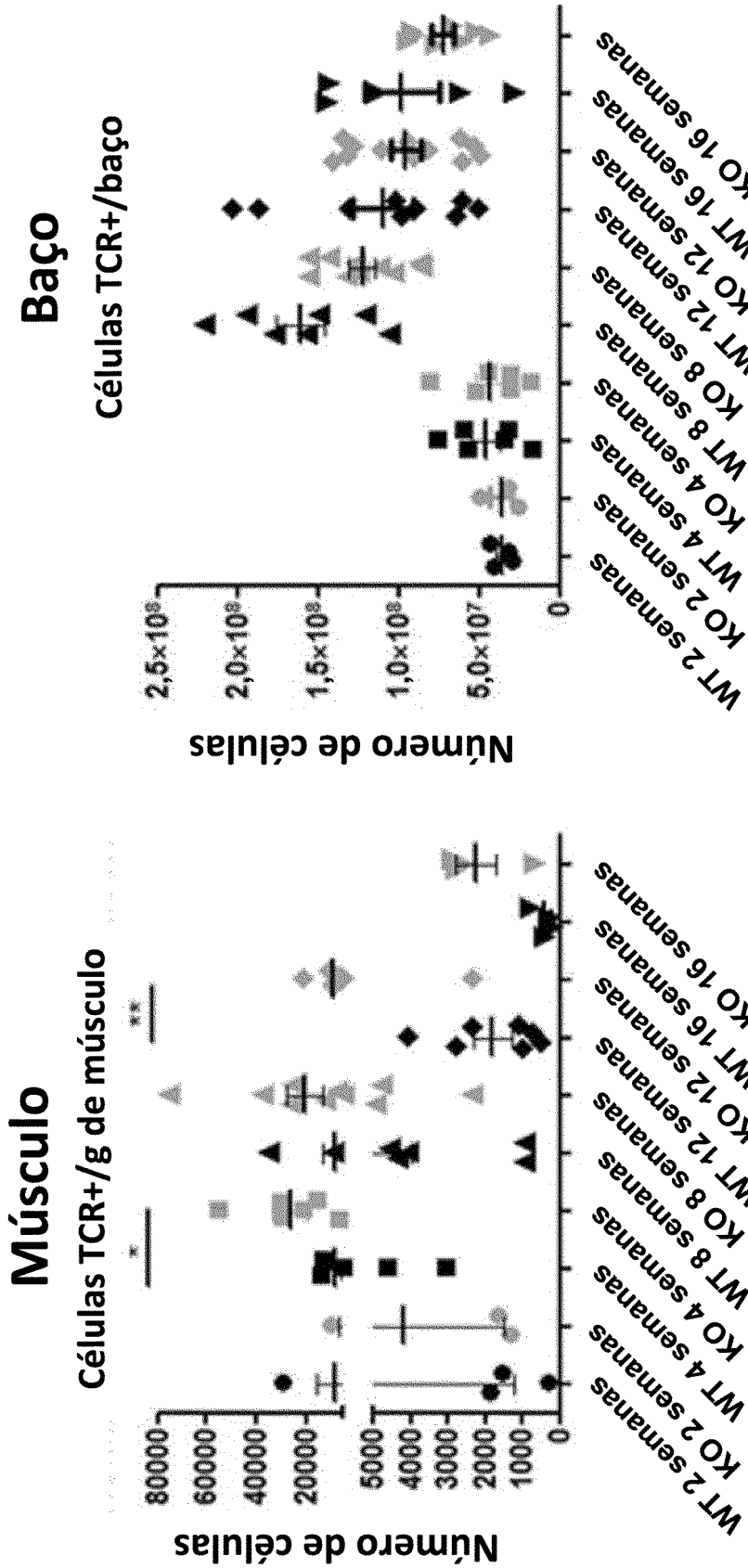

Baço
Células TCR+/baço
Número de células
2,5×10⁸
2,0×10⁸
1,5×10⁸
1,0×10⁸
5,0×10⁷
0
WT 2 semanas
KO 2 semanas
WT 4 semanas
KO 4 semanas
WT 8 semanas
KO 8 semanas
WT 12 semanas
KO 12 semanas
WT 16 semanas
KO 16 semanas
Músculo
Células TCR+/g de músculo
Número de células
80000
60000
40000
20000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
**
WT 2 semanas
KO 2 semanas
WT 4 semanas
KO 4 semanas
WT 8 semanas
KO 8 semanas
WT 12 semanas
KO 12 semanas
WT 16 semanas
KO 16 semanas

FIG. 2

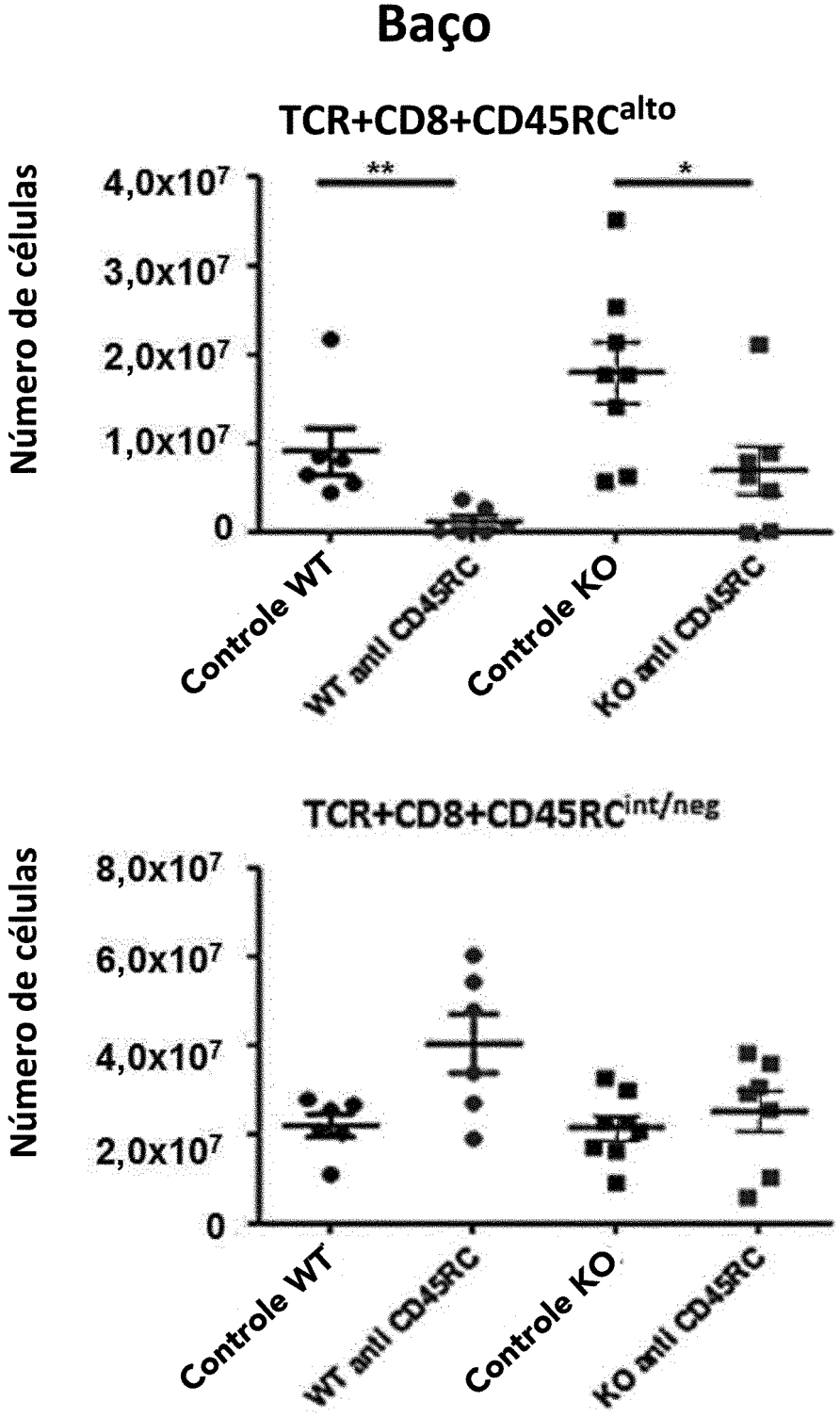

Baço
TCR+CD8+CD45RC^alto
Número de células
4,0x10^7
3,0x10^7
2,0x10^7
1,0x10^7
0
**
*
Controle WT
WT anti CD45RC
Controle KO
KO anti CD45RC
TCR+CD8+CD45RC^int/neg
Número de células
8,0x10^7
6,0x10^7
4,0x10^7
2,0x10^7
0
Controle WT
WT anti CD45RC
Controle KO
KO anti CD45RC

FIG. 3

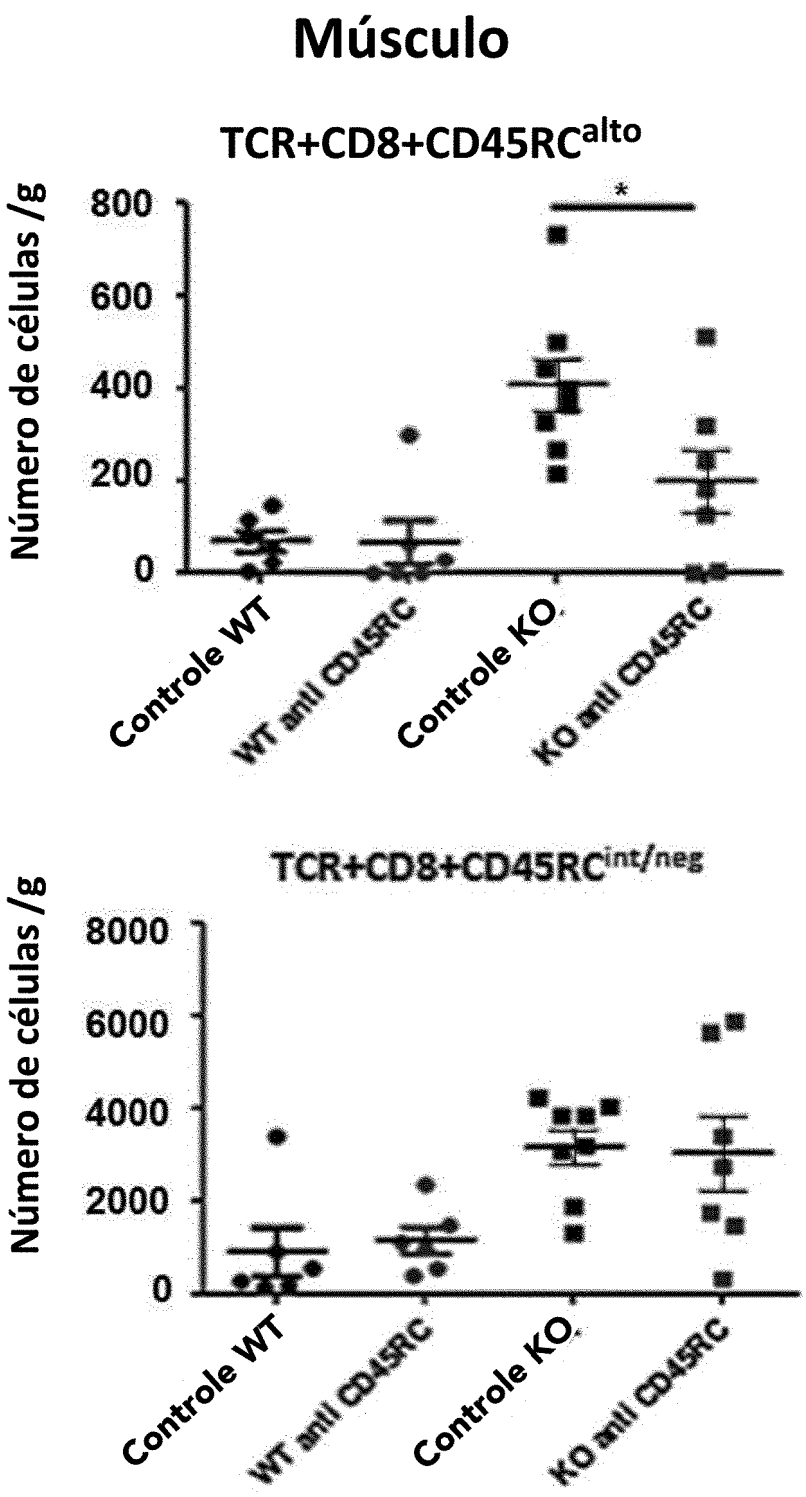

Músculo
TCR+CD8+CD45RC^alto
Número de células /g
800
600
400
200
0
*
Controle WT
WT anti CD45RC
Controle KO
KO anti CD45RC
TCR+CD8+CD45RC^int/neg
Número de células /g
8000
6000
4000
2000
0
Controle WT
WT anti CD45RC
Controle KO
KO anti CD45RC

FIG. 3 (Cont.)

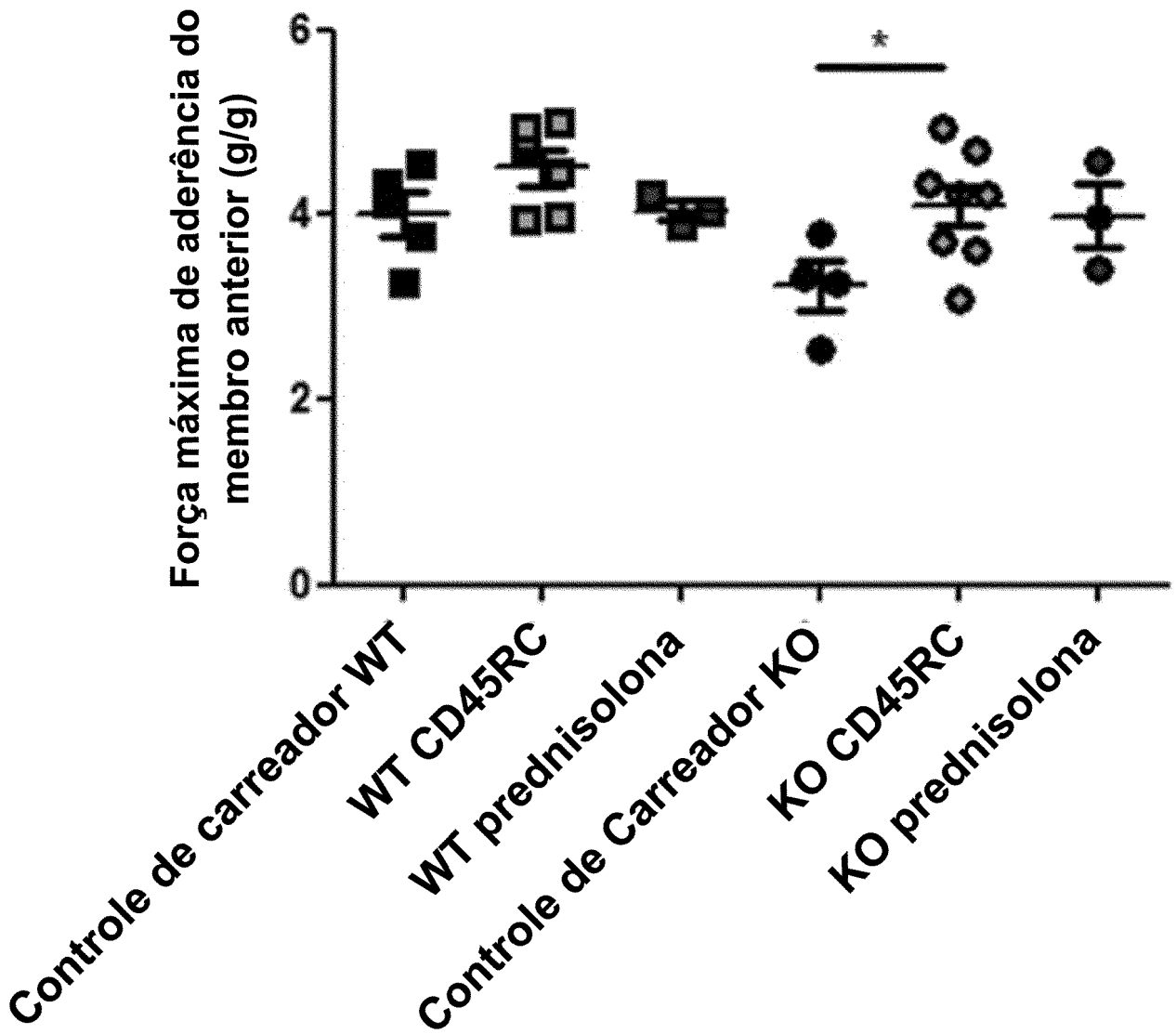

Força máxima de aderência do membro anterior (g/g)
6
4
2
0
*
Controle de carreador WT
WT CD45RC
WT prednisolona
Controle de Carreador KO
KO CD45RC
KO prednisolona

FIG. 4

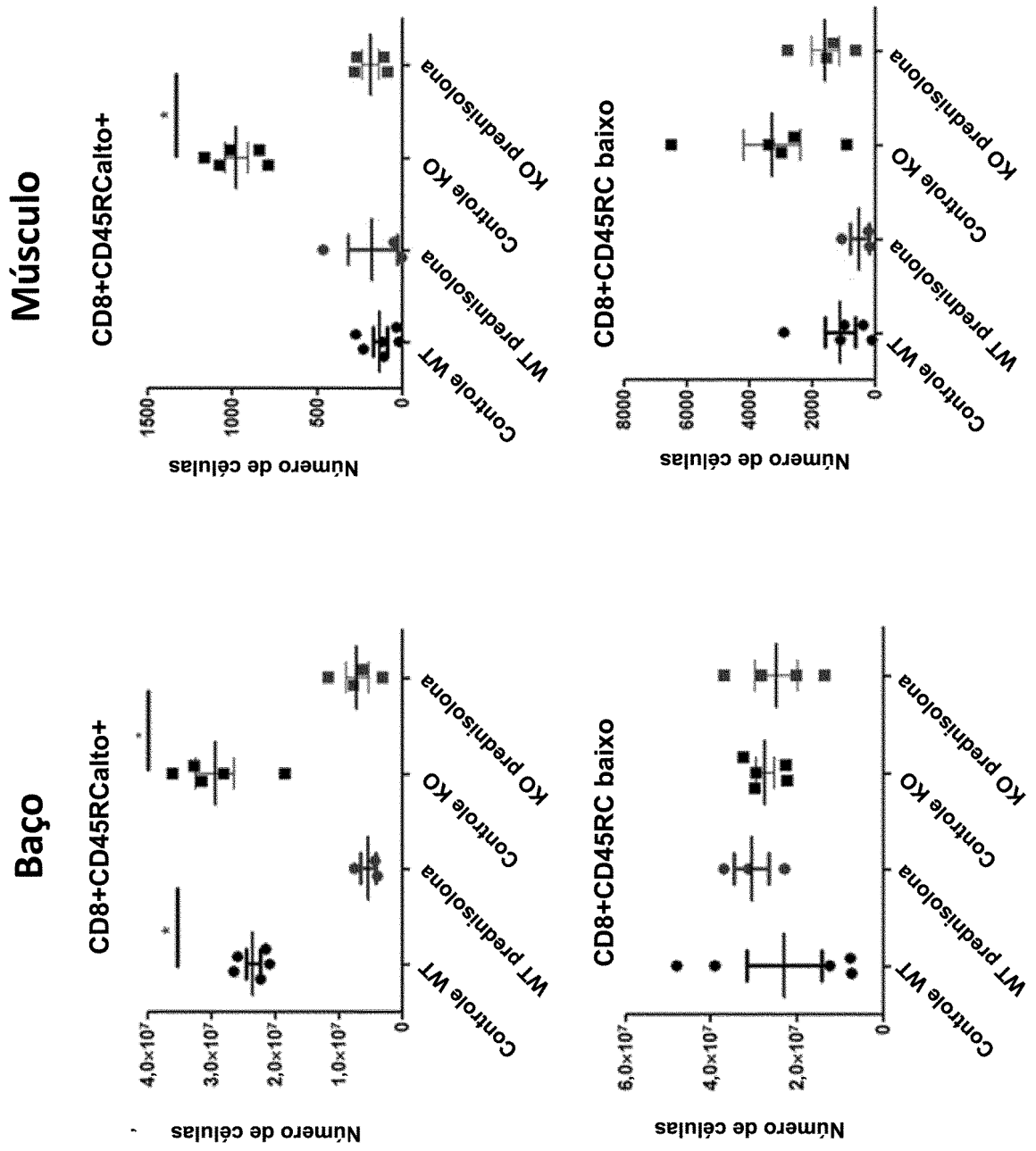

Músculo
CD8+CD45RCalto+
Número de células
1500
1000
500
0
Controle WT
WT prednisolona
Controle KO
KO prednisolona
CD8+CD45RC baixo
Número de células
8000
6000
4000
2000
0
Controle WT
WT prednisolona
Controle KO
KO prednisolona
Baço
CD8+CD45RCalto+
Número de células
4,0×10⁷
3,0×10⁷
2,0×10⁷
1,0×10⁷
0
Controle WT
WT prednisolona
Controle KO
KO prednisolona
CD8+CD45RC baixo
Número de células
6,0×10⁷
4,0×10⁷
2,0×10⁷
0
Controle WT
WT prednisolona
Controle KO
KO prednisolona

FIG. 5

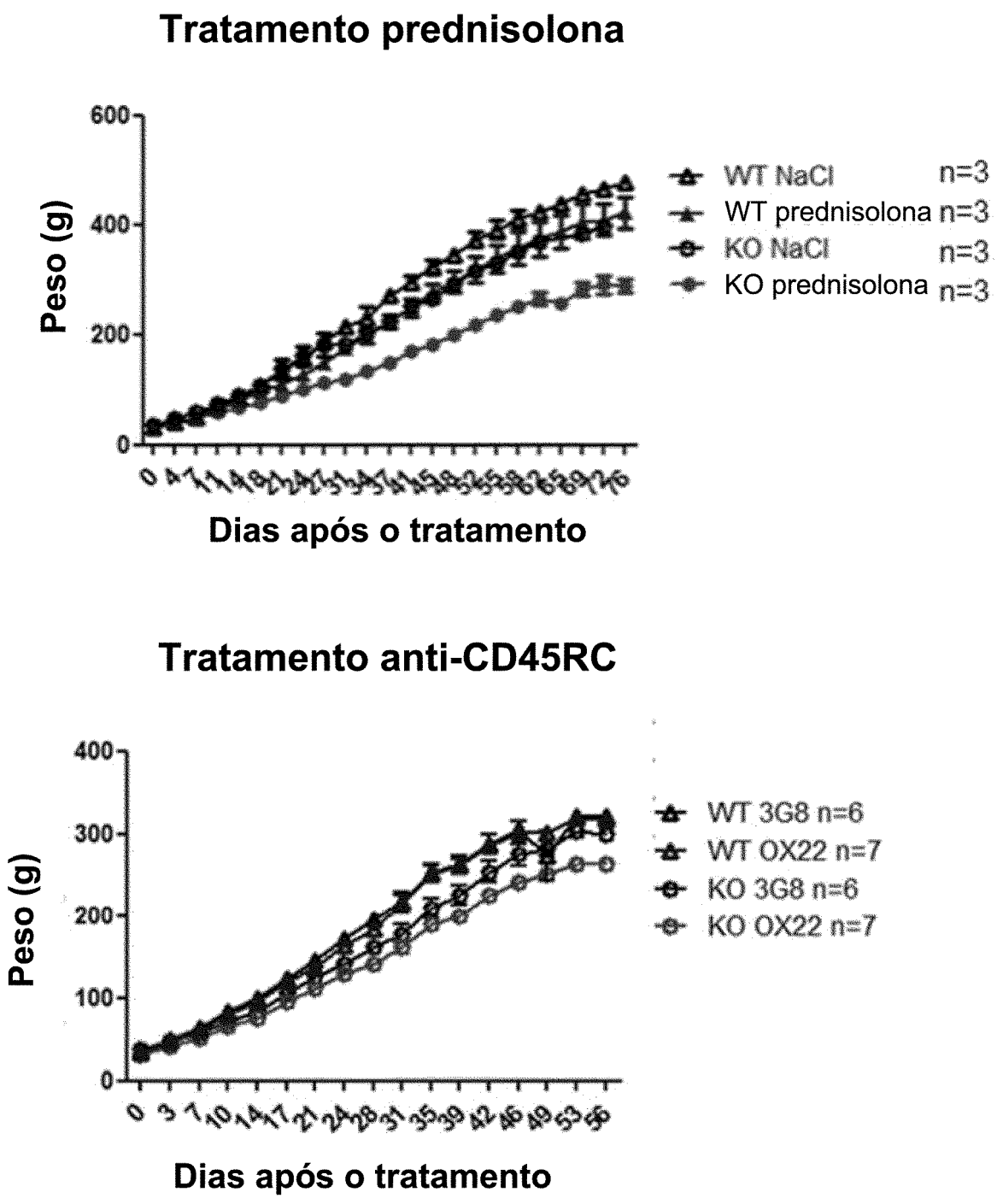

Tratamento prednisolona
Peso (g)
600
400
200
0
Dias após o tratamento
WT NaCl n=3
WT prednisolona n=3
KO NaCl n=3
KO prednisolona n=3
Tratamento anti-CD45RC
Peso (g)
400
300
200
100
0
Dias após o tratamento
WT 3G8 n=6
WT OX22 n=7
KO 3G8 n=6
KO OX22 n=7

FIG. 6

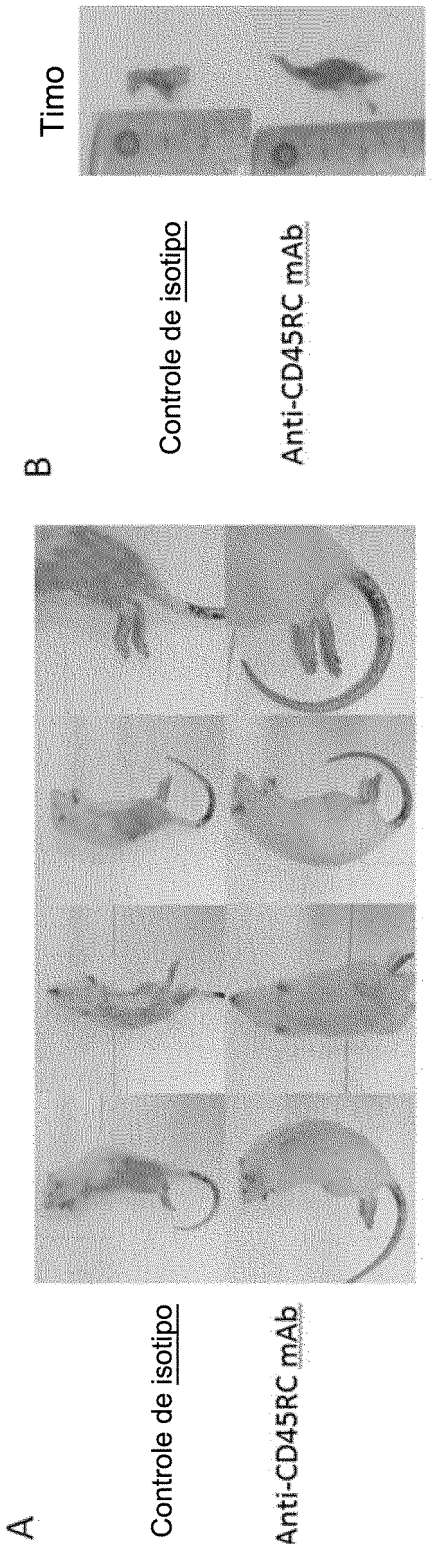

A
Controle de isotipo
Anti-CD45RC mAb
B
Timo
Controle de isotipo
Anti-CD45RC mAb

FIG. 7A-B

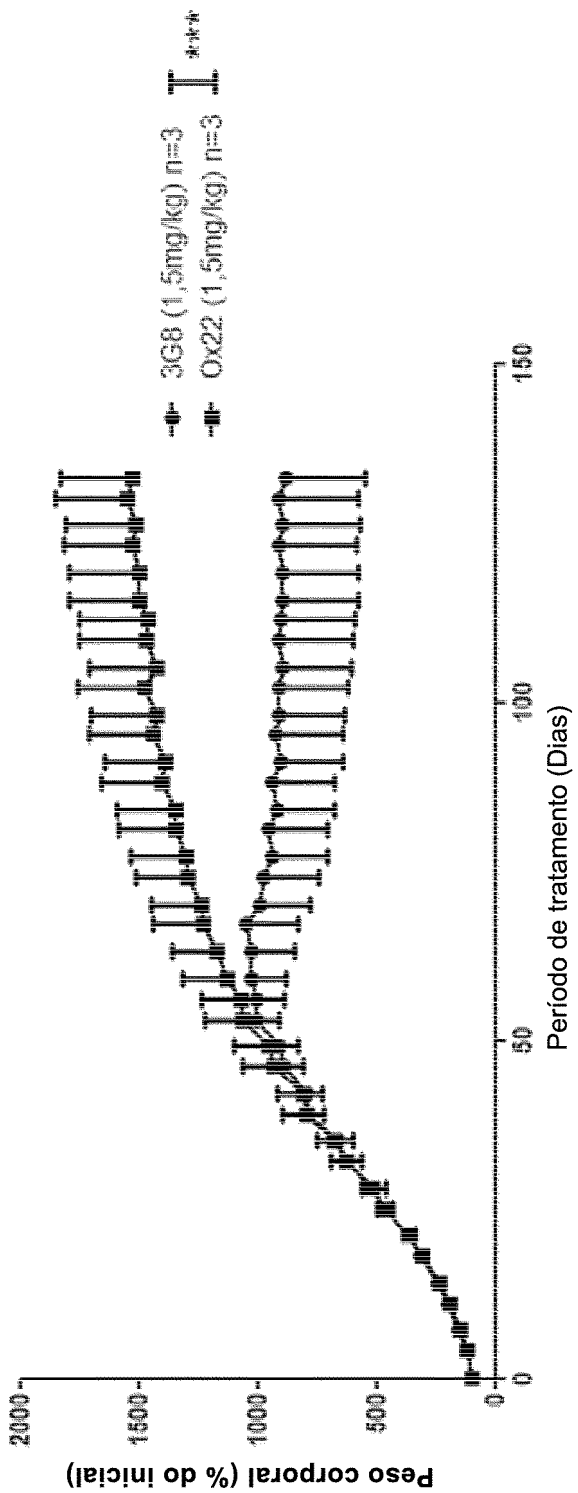

3G8 (1,5mg/kg) n=3
Ox22 (1,5mg/kg) n=3
***
Peso corporal (% do inicial)
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
Período de tratamento (Dias)

FIG. 7C

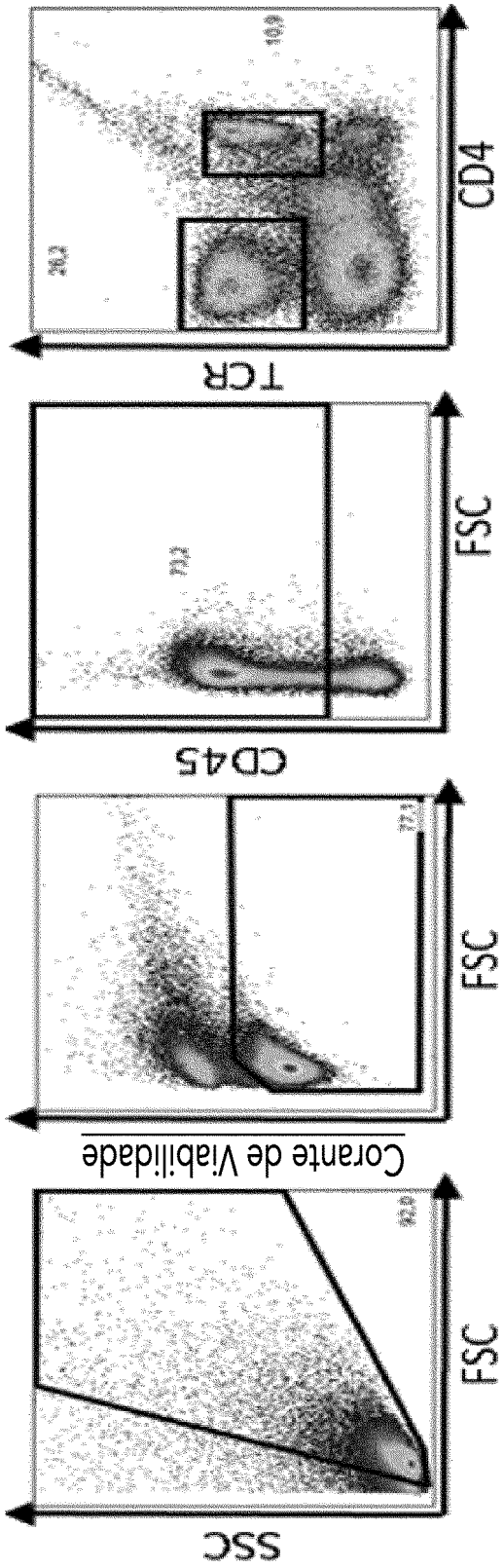


FIG.8

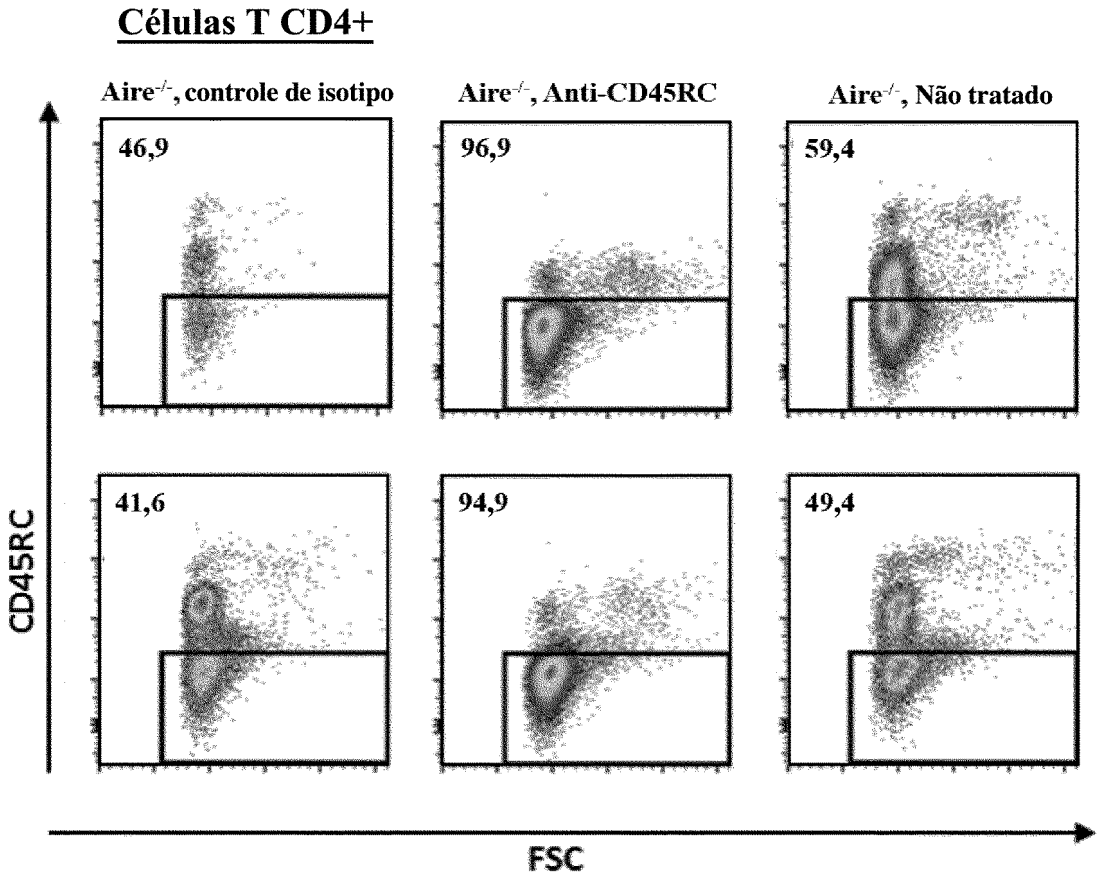

Células T CD4+
Aire-/-, controle de isotipo
Aire-/-, Anti-CD45RC
Aire-/-, Não tratado
46,9
96,9
59,4
41,6
94,9
49,4
CD45RC
FSC

FIG.8 (Cont.)

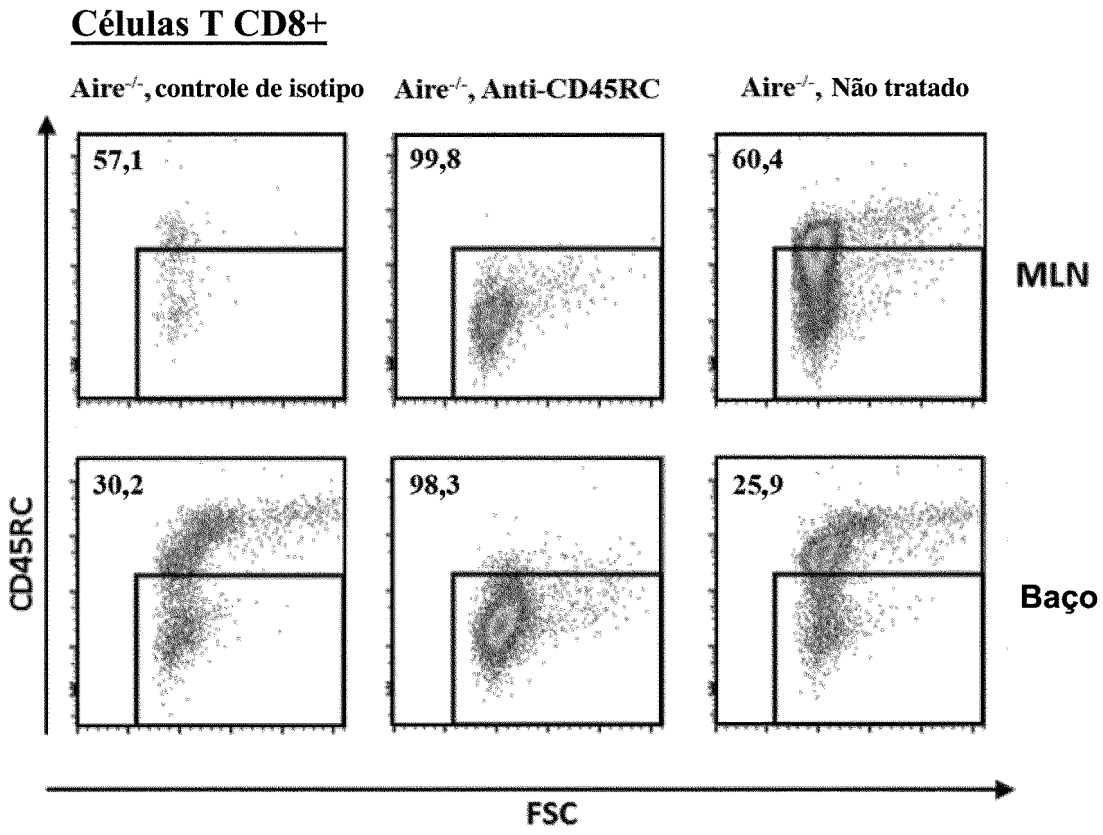

Células T CD8+
Aire-/-, controle de isotipo
Aire-/-, Anti-CD45RC
Aire-/-, Não tratado
57,1
99,8
60,4
MLN
30,2
98,3
25,9
Baço
CD45RC
FSC

FIG.8 (Cont.)

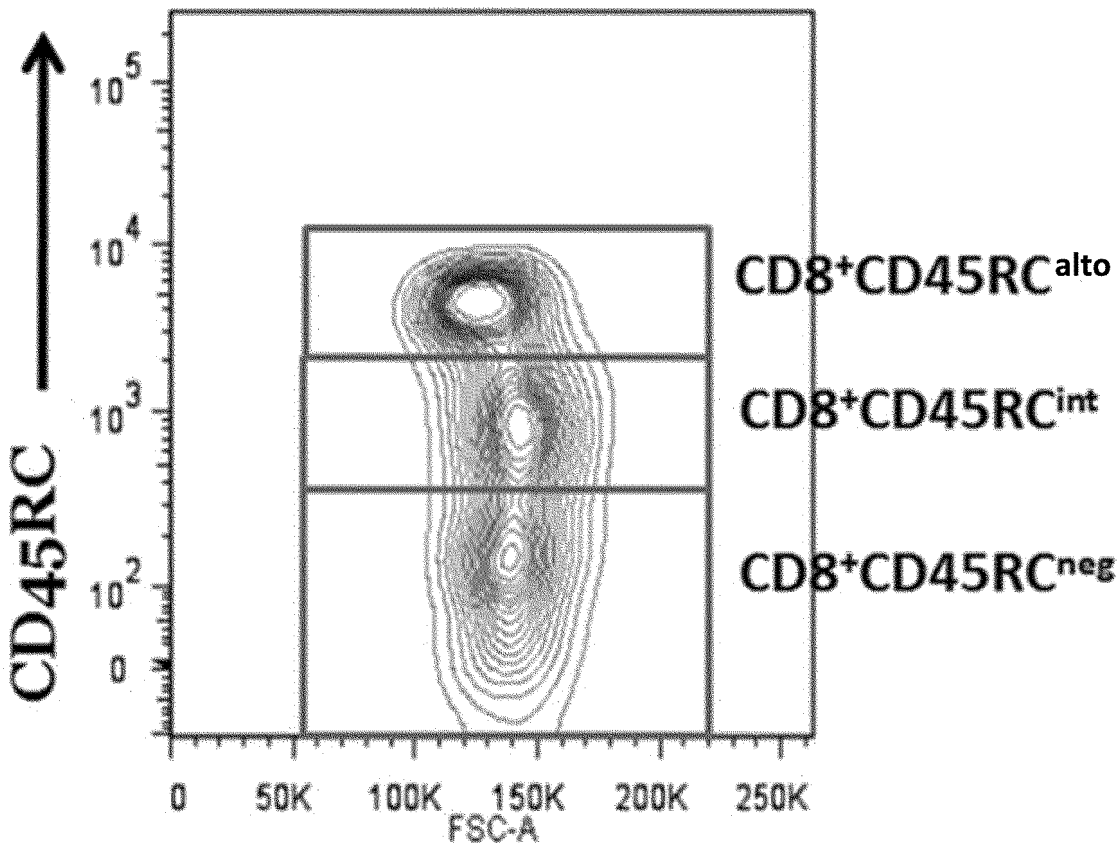

CD45RC
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
50K
100K
150K
200K
250K
FSC-A
CD8+CD45RCalto
CD8+CD45RCint
CD8+CD45RCneg

FIG. 9

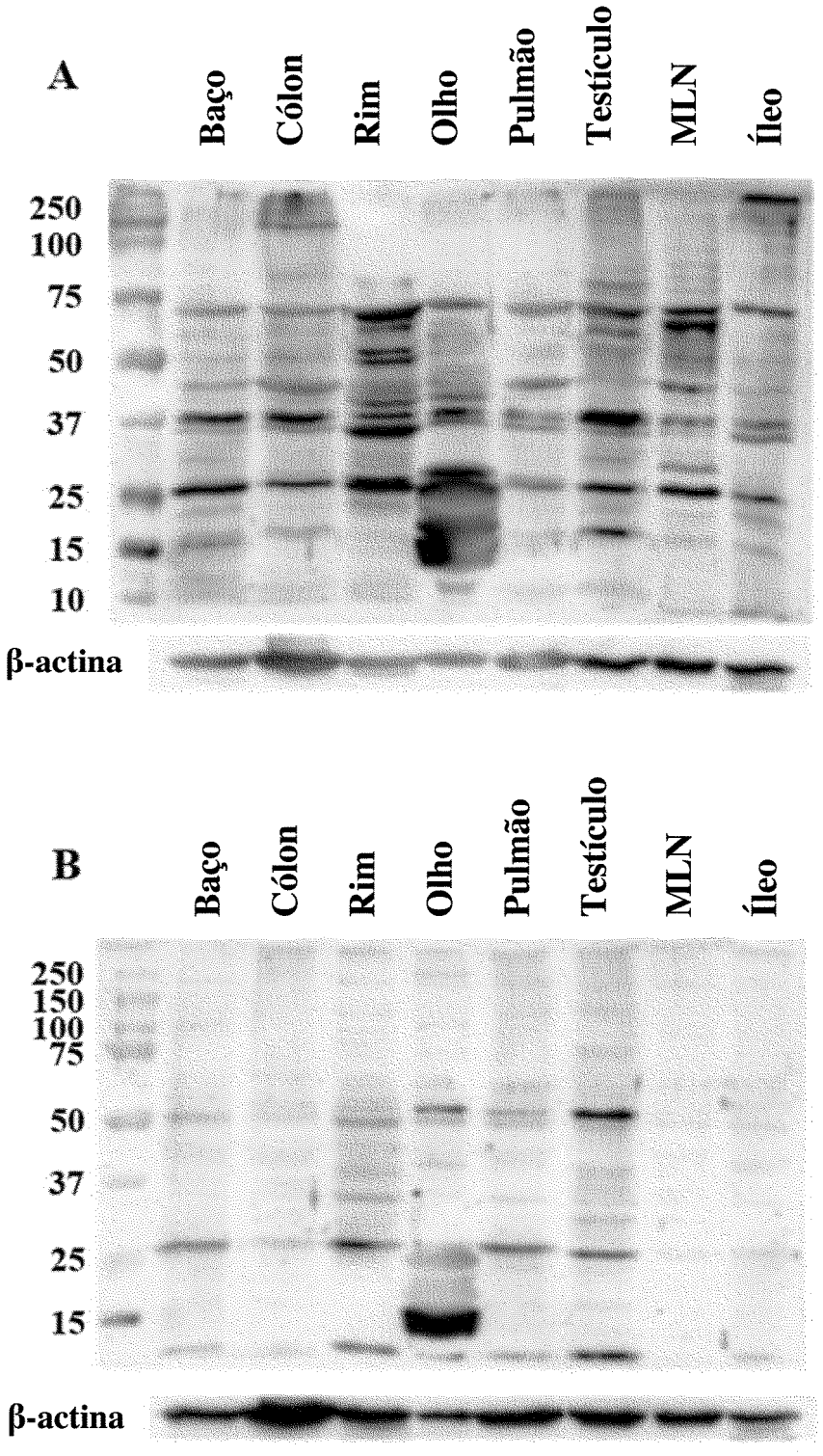

A
Baço
Cólon
Rim
Olho
Pulmão
Testículo
MLN
Íleo
250
100
75
50
37
25
15
10
β-actina
B
Baço
Cólon
Rim
Olho
Pulmão
Testículo
MLN
Íleo
250
150
100
75
50
37
25
15
β-actina

FIG. 10

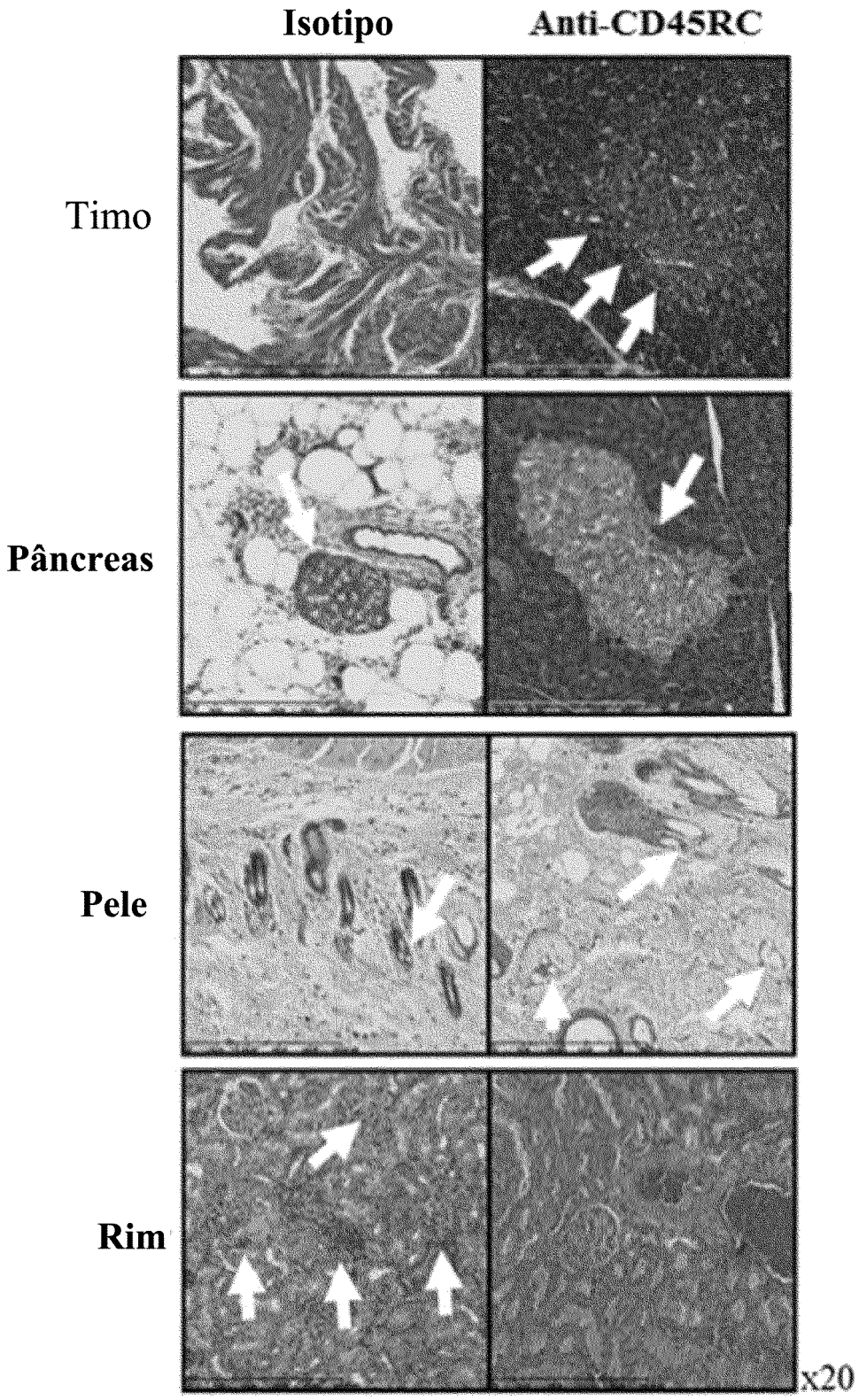


FIG. 11

Resumo da Patente de Invenção para: “**TRATAMENTO DE DOENÇAS MONOGÊNICAS COM UM ANTICORPO ANTI-CD45RC**”

A presente invenção se refere a anticorpos anti-CD45RC, para uso no tratamento de doenças monogênicas causadas por genes não associados à função imune, mas cuja deficiência está associada a inflamação e/ou reações imunes (tais como genes deficientes na distrofia muscular de Duchenne (DMD) fibrose cística, doenças lisossômicas e deficiência de α1-anti-tripsina); ou causada por genes envolvidos no sistema imune e cuja deficiência gera inflamação e/ou reações autoimunes (tais como genes deficientes em imunodeficiências primárias de células T, tal como IPEX (síndrome ligada ao X de enteropatia poliendocrinopatia por imunodesregulação), APECED (distrofia autoimune por poliendocrinopatia-candidíase-ectodérmica), imunodeficiências primárias de células B, síndrome de Muckle-Wells, síndrome auto inflamatória e autoimune mista, síndrome de febre periódica hereditária associada ao NLRP12, e síndrome periódica associada ao receptor do fator de necrose tumoral 1).

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 Sequências I.10.022.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 15/06/2020
- Hora de Geração do Código: 11:14:14
- Código de Controle:
  - Campo 1: B1D67E35F0872B97
  - Campo 2: 6099C867F01A6649