



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

(21) BR 112019027353-0 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 7 3 5 3 A 2 *

(22) Data do Depósito: 09/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: AGENTES, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KITS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE LINFÓCITOS, MÉTODO IN VITRO DE MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE LINFÓCITOS E COMPOSIÇÃO

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

(30) Prioridade Unionista: 10/07/2017 US 62/530,454.

(71) Depositante(es): INNATE PHARMA.

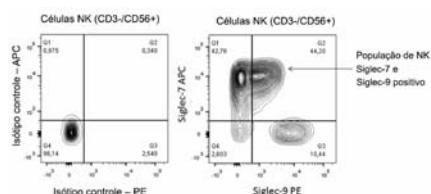
(72) Inventor(es): STÉPHANIE CORNEN; BENJAMIN ROSSI; NICOLAI WAGTMANN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018068532 de 09/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/011852 de 17/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 19/12/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a agentes que ligam Siglecs humanos que possuem atividade inibidora em células imunes e que neutralizam a atividade inibidora desses Siglecs. Esses agentes podem ser utilizados para o tratamento de cânceres.



**“AGENTES, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KITS,
MÉTODO DE MODULAÇÃO DE LINFÓCITOS, MÉTODO *IN VITRO* DE
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE LINFÓCITOS E COMPOSIÇÃO”**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Norte-Americano nº 62/530.454, depositado em 10 de julho de 2017, que é integralmente incorporado ao presente como referência, incluindo quaisquer desenhos e listagem de sequências.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido de patente está sendo depositado em conjunto com uma Listagem de Sequências em formato eletrônico. A Listagem de Sequências é fornecida na forma de arquivo intitulado “Sig793 PCT_ST25.txt”, criado em 3 de julho de 2018, com tamanho de 156 kB. As informações no formato eletrônico da Listagem de Sequências são integralmente incorporadas ao presente como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se a agentes que ligam proteínas Siglec humanas que possuem atividade inibidora em células NK e/ou outras imunes e que neutralizam a atividade inibidora dessas Siglecs. Esses agentes podem ser utilizados para o tratamento de cânceres.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Células NK são células mononucleares que se desenvolvem na medula óssea a partir de progenitores linfoides e características morfológicas e propriedades biológicas incluem tipicamente a expressão dos determinantes de conjuntos (CDs) CD16, CD56 e/ou CD57; a ausência do complexo de TCR alfa/beta ou gama/delta sobre a superfície celular; a capacidade de ligar e matar células alvo que deixarem de expressar proteínas “próprias” do complexo de histocompatibilidade maior

(MHC)/antígeno de leucócitos humanos (HLA); e a capacidade de matar células de tumores ou outras células doentes que expressam ligantes para ativação de receptores NK. Células NK são caracterizadas pela sua capacidade de ligar e matar diversos tipos de linhagens de células de tumores sem necessidade de imunização ou ativação anterior. Células NK podem também liberar citoquinas e proteínas solúveis que exercem efeito regulador sobre o sistema imunológico; e podem sofrer diversas rodadas de divisão celular e produzir células filhotes com propriedades biológicas similares à célula parental. Células saudáveis normais são protegidas contra lise por células NK.

[005] Com base nas suas propriedades biológicas, foram propostas na técnica diversas estratégias de vacina e terapêuticas que dependem da modulação de células NK. A atividade de células NK é regulada, entretanto, por um mecanismo complexo que envolve sinais estimulantes e inibidores. Resumidamente, a atividade lítica de células NK é regulada por diversos receptores da superfície celular que realizam transdução de sinais intracelulares positivos ou negativos mediante interação com ligantes sobre a célula alvo. O equilíbrio entre sinais positivos e negativos transmitidos por meio desses receptores determina se a célula alvo é ou não lisada (morta) por uma célula NK. Sinais estimulantes de células NK podem ser mediados por Receptores da Citotoxicidade Naturais (NCR), tais como NKp30, NKp44 e NKp46; bem como receptores NKG2C, receptores NKG2D, certos receptores similares a Ig matadores (KIRs) ativadores e outros receptores NK ativadores (Lanier, *Annual Review of Immunology* 2005; 23: 225-74). Sinais inibidores das células NK podem ser mediados por receptores como CD94/NKG2-A, bem como certos KIRs inibidores, que reconhecem moléculas da classe I do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (Wagtmann et al (1995), *Immunity* 5: 439-449). Esses receptores inibidores ligam-se a determinantes

polimórficos de moléculas MHC classe I (incluindo HLA classe I) presentes sobre outras células e inibem a lise mediada por células NK.

[006] A atividade lítica de células NK pode ser também regulada por polipeptídeos Siglec. Siglecs (lectinas similares a imunoglobulina que ligam ácido siálico) são um subconjunto de lectinas do tipo I que se ligam a sialoglicanos e são predominantemente expressas sobre células do sistema hematopoiético de forma dependente do tipo e diferenciação celular. Embora ácido siálico seja expresso de forma onipresente, tipicamente na posição terminal de glicoproteínas e lipídios, somente estruturas de sialoglicano distintas muito específicas são reconhecidas por receptores Siglec individuais, dependendo da identidade e da ligação a porções de carboidrato subterminais. Siglecs possuem afinidade geral apenas baixa às estruturas de sialosida de mamíferos comuns que contêm ligações α2-6 e α2-3 de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac).

[007] Siglecs são geralmente divididos em dois grupos, um primeiro subconjunto composto de Siglec-1, 2, 4 e 15 e o grupo relativo a CD33 de Siglecs que inclui Siglec-3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 e 16. Os Siglecs relativos a CD33 são caracterizados, entre outros, por baixa conservação evolutiva e sequência de rápida evolução por diversos mecanismos.

[008] Siglec-7 (CD328), proteína transmembrana do tipo 1 clonada e caracterizada em primeiro lugar em 1999 pelo grupo Moretta em Gênova, Itália, e pertencente aos receptores Siglec relativos a CD33 humanos, é caracterizado por um domínio Ig conjunto V N-terminal que liga ácido siálico, dois domínios Ig conjunto C2 e uma região intracitoplasmática que contém um motivo inibidor com base em tirosina receptor imune (ITIM) e um motivo similar a ITIM. Siglec-7 é expresso constitutivamente sobre células NK, células dendríticas, monócitos e neutrófilos. O domínio extracelular desse receptor liga preferencialmente ácidos dissíálicos ligados (2,8) e resíduos de α 2,6-sialila

ramificados, tais como os exibidos pelo gangliosídeo GD3.

[009] Siglec-9 (CD329) foi caracterizado em 2000 pelo grupo Varki (vide, por exemplo, Angata et al, *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 22127–22135) e é expresso sobre monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células CD34+ e células NK. Concluiu-se que Siglec-9 (bem como Siglec-8) possui especificidade diferencial para ligantes de sialosida que contêm ácido siálico e sulfato, em que a posição do sulfato é um importante determinante da especificidade. Concluiu-se que Siglec-9 liga MUC16 que é sobre-expresso sobre células de câncer. Como Siglec-7, Siglec-9 também contém um domínio Ig conjunto V N-terminal que liga ácido siálico, dois domínios Ig conjunto C2 e uma região intracitoplasmática que contém um motivo inibidor com base em tirosina receptor imune (ITIM) e um motivo similar a ITIM. Domínio Ig conjunto V N-terminal de Siglec-9 humano compartilha identidade de sequência de aminoácidos geral de cerca de 77% com domínio Ig conjunto V N-terminal de Siglec-7 humano e esses dois Siglecs exibem diferentes especificidades de ligação de ácido siálico.

[0010] Testes de ligação relataram que, de forma similar a Siglec-7, Siglec-9 reconheceu ácido siálico na ligação α2,3 ou α2,6-glicosídica a galactose. Utilizando mAb específico de Siglec-9, Zhang et al ((2000), *J. Biol. Chem.* Vol. 275, nº 29: 22121-22126) relataram que se concluiu que Siglec-9 é expresso em níveis altos ou intermediários por monócitos, neutrófilos e uma população menor de células CD16+, CD56-. Observou-se, entretanto, expressão mais fraca em cerca de 50% de células B e células NK e subconjuntos menores de células T CD8+ e células T CD4+. Os autores concluíram que, apesar do seu alto grau de similaridade de sequências, Siglec-7 e Siglec-9 possuem perfis de expressão distintos.

[0011] Apesar do perfil de expressão interessante de Siglec-9 em células NK e outras imunes e do potencial interesse terapêutico na

neutralização de Siglec-9, até o momento nenhum possível agente terapêutico que neutralize Siglec-9 foi adiantado ou proposto para uso terapêutico. Relatou-se que o envolvimento de Siglec-9 em células da linhagem mielomonocítica por ligantes de ácido siálico associados a tumores inibe a imunovigilância e morte de células de tumores por células NK, bem como por neutrófilos, granulócitos especializados que reconhecem e matam diretamente os micro-organismos (Laubli et al (2014), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (39): 14211-14216). Carlin et al ((2009) *Blood* 113: 3333-3336) relataram que o mimetismo de glicanos sialilados hospedeiros permite que patógenos bacterianos açãoem o neutrófilo Siglec-9 e amortecam a reação imunológica inata. Carlin et al descreveram anticorpo anti-Siglec-9 191240 (R&D Systems, Inc.) como ligando-se ao local de ligação de ácido siálico em Siglec-9 e inibindo a interação com ácido siálico. Carlin et al relataram adicionalmente que, ao contrário de um anticorpo não de bloqueio (clone E10-286, BD Biosciences Inc.), o clone 191240 ampliou a ativação de neutrófilos para células bacterianas. De forma similar, Laubli et al (2014) acima relataram que o clone de anticorpo anti-Siglec-9 191240 foi capaz de ampliar a morte de células de tumores por neutrófilos, em comparação com o clone E10-286 que não ampliou a morte de células de tumores por neutrófilos.

[0012] Anticorpos anti-Siglec-7 foram descritos na Patente Europeia 1238282B1 (Moretta et al) e Vitale et al ((1999), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96 (26): 15091-96), referente ao anticorpo anti-Siglec-7 murino QA79, bem como em Falco et al (1999), *J. Exp. Med.* 190: 793-801, que relatam anticorpo anti-Siglec-7 Z176.

[0013] Hudak et al (2014), *Nat. Chem. Biol.* 10: 69-77 relataram que o bloqueio de anticorpos anti-Siglec-7 inibiu a proteção mediada por Siglec-7 de células alvo de tumores contra a lise por células NK. Com relação a Siglec-9, entretanto, anticorpos anti-Siglec-9 (utilizou-se o clone 191240) não

foram capazes de inibir a proteção mediada por Siglec-9 de células alvo de tumores contra lise por células NK purificadas de doadores humanos (vide Hudak et al (2014)), apesar da capacidade de ampliar a morte de células de tumores por neutrófilos (vide Laubli et al (2014)). O clone de anticorpo de ligação bivalente E10-286, relatado em Laubli et al (2014) como não bloqueador e não amplificador da morte de células de tumores por neutrófilos também deixou de inibir a proteção mediada por Siglec-9 de células de tumores alvo contra lise por células NK primárias (Jandus et al (2014), *J. Clin. Invest.* 124 (4): 1810-1820).

[0014] Apesar do interesse em Siglec-7 e 9, nenhum agente terapêutico dirigido a esses receptores foi desenvolvido. Existe, portanto, a necessidade de agentes que se dirijam a esses receptores para uso no tratamento de doenças como câncer.

DESCRÍÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[0015] Em um aspecto, a presente invenção decorre da descoberta de anticorpos ligantes de alta afinidade que agem como potentes neutralizadores de Siglecs humanos, notadamente em células NK que expressam níveis mais baixos de Siglec da superfície celular em comparação com neutrófilos e/ou outras células e agem como receptores da superfície celular inibidores em linfócitos efetores (Siglec-7 e Siglec-9).

[0016] Em outro aspecto, a presente invenção surge da descoberta de que anticorpos que ligam e neutralizam a atividade inibidora de Siglec-9 humana (e, opcionalmente, ligam e neutralizam adicionalmente a atividade inibidora de Siglec-7 humano) exibem capacidade muito ampliada para causar eliminação mediada por imunidade (por exemplo, mediada por células NK) de células alvo (por exemplo, células de tumores e células infectadas) quando utilizadas em combinação com um agente que neutralize a atividade do polipeptídeo NKG2A humano. Particularmente, os inventores

observaram que polipeptídeos Siglec inibem a atividade citotóxica de células NK que expressam NKG2A para células de tumores que expressam HLA-E quando a atividade inibidora de NKG2A for neutralizada.

[0017] Em uma realização, a presente invenção fornece agentes que inibem a atividade de polipeptídeo Siglec-9 (por exemplo, Siglec-9 expresso na superfície da célula), incluindo agentes (por exemplo, agentes de anticorpos) que são inibidores competitivos e não competitivos de Siglec-9. Os agentes correspondentes possuem potência particularmente alta na neutralização da atividade inibidora de Siglec, com ou sem bloqueio substancial da interação entre o Siglec e um de seus ligantes de ácido siálico. Em uma realização, é fornecido um método de tratamento de indivíduos portadores de câncer ou doença infecciosa, em que o método compreende a administração ao indivíduo de um agente que inibe Siglec-9 e/ou Siglec-7 em combinação com um agente que neutraliza a atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano. Em uma realização, é fornecido um agente que inibe Siglec-9 e/ou Siglec-7, para uso no tratamento ou prevenção de câncer ou doença infecciosa, opcionalmente, em que o câncer ou a doença infecciosa é caracterizada por células (por exemplo, célula de tumor e células infectadas) que expressam HLA-E, opcionalmente em que o agente que inibe Siglec-9 e/ou Siglec-7 é administrado em combinação com um agente que neutraliza a atividade inibidora de um polipeptídeo NKG2A humano. Em uma realização, o agente que inibe Siglec-9 e/ou Siglec-7 é um agente de anticorpo que neutraliza a atividade inibidora de um polipeptídeo Siglec-9 (e, opcionalmente, um polipeptídeo Siglec-7 adicional). Em uma realização, é fornecido o uso de um agente (por exemplo, agente de anticorpo) que neutraliza a atividade inibidora de um polipeptídeo Siglec-9 (e, opcionalmente, um polipeptídeo Siglec-7 adicional) em combinação com um agente (por exemplo, um agente de anticorpo) que neutraliza a atividade inibidora de um polipeptídeo NKG2A

humano, opcionalmente para o tratamento de câncer ou doença infecciosa. Em uma realização, é fornecido um agente inibidor de Siglec-9 e/ou Siglec-7, para uso na potencialização da atividade terapêutica de um agente (por exemplo, anticorpo) que neutraliza a atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano. Em uma realização, é fornecido um agente (por exemplo, anticorpo) que neutraliza a atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano, para uso no tratamento ou prevenção de câncer ou doença infecciosa, opcionalmente, em que o câncer ou a doença infecciosa é caracterizada por células (por exemplo, célula de tumor e células infectadas) que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-9 e/ou Siglec-7 (por exemplo, ácido siálico que compreende uma estrutura Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb), opcionalmente em que o agente neutralizador da atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano é administrado em combinação com um inibidor de Siglec-9 e/ou Siglec-7. Em uma realização, é fornecido um agente (por exemplo, anticorpo) neutralizador da atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano, para uso na potencialização da atividade terapêutica de um inibidor de Siglec-9 e/ou Siglec-7. Em uma realização, o agente neutralizador da atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano é um anticorpo que liga um polipeptídeo NKG2A e neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo NKG2A humano. Em uma realização, o agente neutralizador da atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano é um anticorpo que liga HLE-A e inibe a interação entre NKG2A e HLA-E, de forma a neutralizar a atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano.

[0018] Em uma realização, a presente invenção fornece um método de tratamento de indivíduos portadores de câncer ou doença infecciosa, em que o método compreende a administração ao indivíduo de um agente neutralizador da atividade inibidora de polipeptídeo Siglec-9 (e, opcionalmente um polipeptídeo Siglec-7 adicional) em combinação com um

agente que neutraliza a atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano. Em uma realização, o agente neutralizador da atividade inibidora de um polipeptídeo Siglec-9 é um anticorpo que possui as características conforme descrito adicionalmente no presente. Em uma realização, é fornecido um método de tratamento ou prevenção de câncer em indivíduos, em que o método compreende a administração a indivíduos de: (a) quantidade terapeuticamente ativa de um agente inibidor de polipeptídeo NKG2A humano; e (b) quantidade terapeuticamente ativa de agente inibidor de polipeptídeo Siglec-7 e/ou Siglec-9 humano. Em uma realização, o câncer é um tumor sólido. Em uma realização, o câncer é um tumor hematológico. Em uma realização, o câncer compreende células malignas que expressam HLA-E na sua superfície. Em uma realização, o agente inibidor de polipeptídeo NKG2A humano é um anticorpo que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A. Em uma realização, o agente inibidor de polipeptídeo Siglec-9 humano é um anticorpo anti-Siglec-9 que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9. O indivíduo pode ser especificado como sendo humano.

[0019] Em uma realização, é fornecido um método de ativação ou potencialização da atividade de células de linfócitos infiltradas em tumores (por exemplo, células NK) em indivíduos, em que o método compreende a administração ao indivíduo de: (a) quantidade terapeuticamente ativa de um agente inibidor de polipeptídeo NKG2A humano; e (b) quantidade terapeuticamente ativa de agente inibidor de polipeptídeo Siglec-9 humano. Em uma realização, é fornecido um método de ativação ou potencialização da atividade de células NK infiltradas em tumores em indivíduos, em que o método compreende a administração ao indivíduo de: (a) quantidade terapeuticamente ativa de um agente inibidor de polipeptídeo NKG2A humano; e (b) quantidade terapeuticamente ativa de agente inibidor de polipeptídeo Siglec-9 humano. Em uma realização, é fornecido um método de aumento da capacidade de células

NK (por exemplo, células NK que expressam NKG2A) para causar a morte da célula que expressa HLA-E (por exemplo, célula de câncer ou célula infectada) em indivíduos, em que o método compreende a administração ao indivíduo de: (a) quantidade terapeuticamente ativa de um agente inibidor de polipeptídeo NKG2A humano; e (b) quantidade terapeuticamente ativa de agente inibidor de polipeptídeo Siglec-9 humano.

[0020] Em um aspecto, é fornecida uma composição que compreende um agente (por exemplo, anticorpo) que inibe um polipeptídeo NKG2A humano e um agente (por exemplo, um anticorpo) que inibe um polipeptídeo Siglec-9 humano.

[0021] Em um aspecto, as composições e o método de acordo com o presente destinam-se a uso no tratamento ou prevenção de câncer, opcionalmente tumores sólidos, opcionalmente malignidades hematológicas, opcionalmente tumores positivos para HLA-E, por exemplo, caracterizados por células de tumores que possuem HLA-E na sua superfície. Em uma realização, o câncer é um tumor sólido avançado e/ou refratário. Em realização não limitadora, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste de carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço (HNSCC), câncer do pulmão não de células pequenas (NSCLC), câncer renal, adenocarcinoma pancreático ou do esôfago, câncer de mama, carcinoma de células renais (RCC), melanoma, câncer colorretal e câncer do ovário.

[0022] Em uma realização, o anticorpo anti-Siglec-9 é administrado em quantidade que resulta na neutralização da atividade inibidora de Siglec-9 humano em indivíduos humanos (*in vivo*), tal como quantidade que resulta na neutralização da atividade inibidora de Siglec-9 humano em células NK em indivíduos humanos, opcionalmente por pelo menos uma semana, duas semanas, três semanas ou um mês após a administração do anticorpo anti-Siglec-9. Em uma realização, o anticorpo anti-NKG2A é administrado em

quantidade que resulta na neutralização da atividade inibidora de CD94/NKG2A humano em indivíduos humanos (*in vivo*), tal como quantidade que resulta na neutralização da atividade inibidora de CD94/NKG2A humano em células NK em indivíduos humanos, opcionalmente por pelo menos uma semana, duas semanas, três semanas ou um mês após a administração do anticorpo anti-NKG2A.

[0023] Em uma realização, o inibidor de Siglec (o agente que inibe polipeptídeo Siglec-9) é uma proteína que compreende um domínio de ligação de抗ígenos de imunoglobulina que se liga especificamente a uma proteína Siglec-9 humana, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo, ou uma proteína que o compreende. Em uma realização, o inibidor de Siglec liga-se especificamente à proteína Siglec-9 humana sem ligar-se a Siglec-7 humano e/ou outros Siglecs humanos da Tabela 1 (exemplificados por mAbsA, B, C, D, E e F). Em uma realização, o inibidor de Siglec liga-se especificamente à proteína Siglec-9 humana e à proteína Siglec-7 humana, ainda opcionalmente sem ligar-se a outros Siglecs humanos da Tabela 1 (exemplificados por mAbs4, 5 e 6). Em uma realização, o inibidor de Siglec é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente à proteína Siglec-9 humana, proteína Siglec-7 humana e à proteína Siglec-12 humana, ainda opcionalmente sem ligar-se a outros Siglecs humanos da Tabela 1 (exemplificados por mAbs1, 2 e 3). Em uma realização, o inibidor de Siglec é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é capaz de ligação bivalente a uma proteína Siglec-9 humana (o inibidor compreende dois domínios de ligação de抗ígenos, cada qual capaz de ligar-se a uma proteína Siglec-9 humana).

[0024] Em uma realização, um anticorpo que se liga à proteína Siglec-9 humana é um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo Siglec-9 humano e neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-9, opcionalmente em que o anticorpo ou

fragmento de anticorpo não bloqueia substancialmente a interação entre o polipeptídeo Siglec-9 e um de seus ligantes de ácido siálico (exemplificados por mAbs 1, 2 e 3, vide o Exemplo 10), opcionalmente em que o anticorpo ou fragmento de anticorpo bloqueia a interação entre o polipeptídeo Siglec-9 e um de seus ligantes de ácido siálico (exemplificados por mAbsA, B e C, vide o Exemplo 10). Opcionalmente, o polipeptídeo Siglec-9 é expresso na superfície de uma célula, tal como um linfócito efetor, célula NK, tal como célula NK primária, célula NK CD56^{dim} de indivíduos humanos. Opcionalmente, o polipeptídeo Siglec-9 é expresso na superfície de células dendríticas derivadas de monócitos. Em uma realização, o anticorpo liga-se adicionalmente a um polipeptídeo Siglec-7 humano e neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-7, ainda opcionalmente em que o anticorpo não bloqueia substancialmente a interação entre o polipeptídeo Siglec-7 e um de seus ligantes de ácido siálico. Opcionalmente, o polipeptídeo Siglec-7 é expresso na superfície de células, tais como células dendríticas derivadas de monócitos. Em outra realização, o anticorpo não se liga a um polipeptídeo Siglec-7 humano.

[0025] Em um aspecto, o anticorpo que liga especificamente Siglec-9 humano aumenta a atividade (por exemplo, citotoxicidade) de células NK (por exemplo, células NK primárias) para uma célula alvo que contém ligante ácido siálico. Ao contrário de alguns anticorpos que podem aumentar a citotoxicidade apenas em neutrófilos, transfectantes Siglec e/ou outras células que expressam ou são levadas a expressar altos níveis de Siglec-9 na sua superfície celular, os anticorpos descritos no presente são funcionais mesmo em células que expressam baixos níveis de Siglec-9, tais como células NK em seres humanos (por exemplo, células NK CD56^{dim}). A capacidade de aumentar a citotoxicidade dessas células NK com baixa expressão de Siglec-9 possui a vantagem de ser capaz de mobilizar adicionalmente essa população de células contra células alvo de doenças, tais como células de tumores e/ou células

bacterianas.

[0026] Em uma realização, um anticorpo que se liga à proteína Siglec-9 humana é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (ou uma proteína que compreende esse fragmento) que liga especificamente Siglec-9 humano e aumenta e/ou restaura a citotoxicidade de células NK (células NK primárias) em um teste de citotoxicidade *in vitro* por quatro horas padrão no qual células NK que expressam Siglec-9 são incubadas com células alvo que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-9. Em uma realização, as células alvo são marcadas com ⁵¹Cr antes da adição de células NK e, em seguida, a morte (citotoxicidade) é estimada como proporcional à liberação de ⁵¹Cr das células para o meio. Opcionalmente, pode-se conduzir um teste de acordo com os métodos dos Exemplos do presente; vide, por exemplo, o Exemplo 8. Em uma realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é capaz de restaurar a citotoxicidade de células NK que expressam Siglec-9 pelo menos até o nível observado com células NK que não expressam Siglec-9 (por exemplo, conforme determinado de acordo com os métodos dos Exemplos do presente).

[0027] Em uma realização, anticorpos que se ligam a Siglec-9 humano aumentam e/ou restauram a citotoxicidade de células NK (células NK primárias; células que expressam NKG2A) na presença de anticorpos que ligam e neutralizam a atividade inibidora de NKG2A em testes de citotoxicidade (por exemplo, teste de expressão de CD137) nos quais células NK que expressam Siglec-9 são incubadas com células alvo que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-9.

[0028] Em qualquer aspecto do presente, células NK (por exemplo, células NK primárias) podem ser especificadas como sendo células NK novas purificadas de doadores, opcionalmente incubadas por uma noite a 37 °C antes do uso. Em qualquer aspecto do presente, células NK ou células NK primárias podem ser especificadas como expressando Siglec-9; para uso

em testes, por exemplo, as células podem ser fechadas sobre Siglec-9 por meio de citometria de fluxo. Vide, por exemplo, células NK conforme descrito no Exemplo 8 do presente. Em qualquer aspecto do presente, células NK ou células NK primárias podem ser especificadas como expressando NKG2A; para uso em testes, por exemplo, as células podem ser fechadas sobre NKG2A por meio de citometria de fluxo.

[0029] Em outra realização, um anticorpo que se liga à proteína Siglec-9 humana é um anticorpo ou fragmento de anticorpo (ou uma proteína que compreende esse fragmento) que liga especificamente Siglec-9 humano e neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-9 em células dendríticas derivadas de monócitos (moDC). Em uma realização, a moDC contém ligantes de ácido siálico de Siglec-9 na sua superfície. Em uma realização, a moDC contém, na sua superfície, polipeptídeos Siglec-9 dedicados a interações cis com ácidos siálicos. Em uma realização, o anticorpo aumenta a ativação ou sinalização em moDC. Em uma realização, o anticorpo neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-9 em uma moDC que contém ligantes de ácido siálico de Siglec-9, em que a moDC é uma célula na qual o tratamento da moDC com neuramidase para remover ligantes de ácido siálico resulta em EC₅₀ inferior para ligação de anticorpo à moDC.

[0030] Opcionalmente, anticorpos anti-Siglec-9 podem ligar polipeptídeos Siglec-7 e Siglec-9 com afinidade comparável. Esses anticorpos possuem características farmacológicas vantajosas. Conforme exibido no presente, células NK podem expressar a proteína Siglec-7 inibidora e a proteína Siglec-9 inibidora, mas Siglec-7 e Siglec-9 podem também possuir perfis de expressão diferentes ao longo de diferentes populações celulares. Além disso, demonstrou-se que células de tumores podem expressar os ligantes naturais (glicanos) para Siglec-7 e para Siglec-9. Consequentemente, agentes terapêuticos que inibem um Siglec mas não o outro podem não

apresentar eficiência máxima de neutralização da restrição mediada por Siglec da atividade de NK e/ou outras populações de células imunes (por exemplo, células dendríticas derivadas de mieloides). A inibição de Siglec 7 e 9 pode, portanto, ser vantajosa. Siglec-9 compartilha, entretanto, identidade de sequência de aminoácidos geral de apenas cerca de 77% com domínio Ig conjunto V N-terminal de Siglec-7 humano. Além disso, esses dois Sigecls exibem diferentes especificidades de ligação de ácido siálico. Em uma realização, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (ou uma proteína que compreende esse fragmento) que liga Siglec-7 humano (além de Siglec-9) neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-7 em neutrófilos; em uma realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo aumenta e/ou restaura a citotoxicidade de neutrófilos para células alvo que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-7. Em uma realização, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (ou uma proteína que compreende esse fragmento) que liga Siglec-7 humano (além de Siglec-9) neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-7 em células dendríticas derivadas de monócitos (moDC). Em uma realização, a moDC contém ligantes de ácido siálico de Siglec-7 na sua superfície. Em uma realização, a moDC contém, na sua superfície, polipeptídeos Siglec-7 dedicados a interações cis com ácidos siálicos. Em uma realização, o anticorpo aumenta a ativação ou sinalização em moDC. Em uma realização, o anticorpo neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo Siglec-7 em uma moDC que contém ligantes de ácido siálico de Siglec-7, em que a moDC é uma célula na qual o tratamento da moDC com neuramidase para remover ligantes de ácido siálico resulta em EC₅₀ inferior para ligação de anticorpo à moDC.

[0031] Em um aspecto, anticorpos que neutralizam a atividade inibidora de Siglec-7 e Siglec-9 são capazes de ligar-se especificamente ao polipeptídeo Siglec-7 humano inibidor e ao polipeptídeo Siglec-9 humano com

afinidade comparável. Os anticorpos que ligam Siglec-7 e Siglec-9 com afinidade comparável podem, por exemplo, possuir, em certas realizações, maior capacidade de bloquear as interações entre cada um dos Sigeles e um ou mais de seus ligantes de ácido siálico (exemplificados por mAbs4, 5 e 6, vide o Exemplo 6). Os anticorpos que ligam Siglec-9 podem, em outras realizações, ser caracterizados como neutralizadores da atividade inibidora de Siglec-9, sem bloquear substancialmente as interações entre Siglec-9 e um ou mais de seus ligantes de ácido siálico, particularmente um ácido siálico que compreende uma estrutura Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb (exemplificado por mAbs1, 2 e 3, vide o Exemplo 9).

[0032] Conforme exibido no presente, Siglec-9 humano liga-se a Sia1 (Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb) e Sia2 (6'-sialil-lactose), enquanto Siglec-7 liga-se apenas a Sia2. Em um aspecto, anticorpos são capazes de bloquear a interação desse(s) polipeptídeo(s) Siglec e um ligante ácido siálico de Siglec-9 e Siglec-7, tal como um ácido siálico Sia2. Em uma realização, o ácido siálico é trissacarídeo sialilado. Em uma realização, o ácido siálico compreende uma estrutura de 6'-sialil-lactose.

[0033] Em outro aspecto, o anticorpo liga um polipeptídeo Siglec-9 humano e neutraliza sua atividade inibidora, em que o anticorpo é capaz de bloquear a interação de ambos, Sia1 (Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb) e Sia2 (6'-sialil-lactose), com um polipeptídeo Siglec-9 (exemplificado por mAbs1, 2 e 3; vide o Exemplo 9).

[0034] Em uma realização, anticorpos que são capazes de ligar Siglec-7 e Siglec-9 possuem EC₅₀ para ligação a polipeptídeo Siglec-7 humano que difere em menos de 1-log da sua EC₅₀ para ligação a polipeptídeo Siglec-9 humano, conforme determinado por meio de citometria de fluxo para ligação a células que expressam, na sua superfície, Siglec-7 ou Siglec-9 (por exemplo, células CHO transfectadas com um dos Sigeles correspondentes, mas que não

expressam o outro Siglec). Em uma realização, o anticorpo possui EC₅₀ para ligação a polipeptídeo Siglec-7 humano e polipeptídeo Siglec-9 humano que difere em não mais de 0,5 log, 0,3 log, 0,2 log ou 0,1 log, conforme determinado por meio de citometria de fluxo para ligação a células que expressam, na sua superfície, Siglec-7 ou Siglec-9. As células que expressam, na sua superfície, Siglec-7 ou Siglec-9 podem ser caracterizadas como expressando o Siglec correspondente em níveis de expressão comparáveis.

[0035] Em uma realização, os anticorpos ligam-se ainda a Siglec de primatas não humanos com afinidade comparável a Siglec-9 humano. Em uma realização, o anticorpo possui EC₅₀ para ligação a polipeptídeo Siglec-9 humano e Siglec de primata não humano que difere em não mais de 1 log, 0,5 log, 0,3 log, 0,2 log ou 0,1 log, conforme determinado por meio de citometria de fluxo para ligação a células que expressam, na sua superfície, o polipeptídeo Siglec correspondente (por exemplo, células CHO transfectadas com o Siglec correspondente).

[0036] Em uma realização, o anticorpo que neutraliza a atividade de Siglec-9 humano possui EC₅₀ para ligação a polipeptídeo Siglec-9 humano e Siglec de primata não humano que difere em não mais de 1 log, 0,5 log, 0,3 log, 0,2 log ou 0,1 log, conforme determinado por meio de citometria de fluxo para ligação a células que expressam, na sua superfície, Siglec-9 (por exemplo, células CHO transfectadas com Siglec).

[0037] Em uma realização, o anticorpo possui KD para afinidade de ligação, conforme determinado, por exemplo, por meio de seleção de ressonância de plasma de superfície (SPR) (por exemplo, por meio de análise com um dispositivo analítico SPR BIACore®) que difere em não mais de 10 vezes, 5 vezes, 3 vezes ou 2 vezes para ligação a um polipeptídeo Siglec-7 humano e a um polipeptídeo Siglec-9 humano (e ainda, opcionalmente, Siglec de primata não humano).

[0038] Em uma realização, o anticorpo possui KD de cerca de 1 x 10⁻⁸ M a cerca de 1 x 10⁻¹⁰ M ou cerca de 1 x 10⁻⁹ M a cerca de 1 x 10⁻¹¹ M, para ligação a um polipeptídeo Siglec-9 humano (e ainda, opcionalmente, um polipeptídeo Siglec-7 humano e/ou Siglec de primata não humano). Em uma realização, anticorpos anti-Siglec-9 possuem KD de cerca de 1 x 10⁻⁸ M a cerca de 1 x 10⁻¹⁰ M ou cerca de 1 x 10⁻⁹ M a cerca de 1 x 10⁻¹¹ M, para ligação (por exemplo, afinidade monovalente) a um polipeptídeo Siglec-9 humano, em que o anticorpo não possui ligação substancial a um polipeptídeo Siglec-7 humano.

[0039] Em uma realização, os anticorpos adicionalmente não ligam substancialmente nenhum dentre Siglecs-3, 5, 6, 8, 10, 11 e 12 humanos. Em uma realização, os anticorpos adicionalmente não ligam substancialmente nenhum dentre Siglecs-14 e 16. Em uma realização, os anticorpos adicionalmente não ligam substancialmente Siglec-6 humano. Em uma realização, os anticorpos adicionalmente não ligam substancialmente Siglec-12 humano.

[0040] Em qualquer uma das realizações do presente, os anticorpos anti-Siglec podem ser caracterizados por ligação a polipeptídeos expressos sobre a superfície da célula (por exemplo, célula NK, célula levada a expressar Siglec-7 e/ou Siglec-9, tal como uma célula hospedeira CHO recombinante levada a expressar Siglec-7 e/ou Siglec-9 na sua superfície, conforme exibido nos Exemplos) e, opcionalmente, em que o anticorpo liga-se ainda com alta afinidade conforme determinado por meio de citometria de fluxo. Um anticorpo pode, por exemplo, ser caracterizado por EC₅₀, conforme determinado por meio de citometria de fluxo, de não mais de 5 µg/ml, não mais de 1 µg/ml, não mais de 0,5 µg/ml, não mais de 0,2 µg/ml ou não mais de 0,1 µg/ml, para ligação a células NK primárias (por exemplo, células NK purificadas a partir de uma amostra biológica de um doador ou indivíduo humano), opcionalmente células NK CD56^{dim}. EC₅₀ pode ser determinada, por exemplo,

de acordo com os métodos do Exemplo 9; por exemplo, quatro ou mais doadores humanos saudáveis testados, manchas obtidas em BD FACS Canto II e analisados utilizando-se o software FlowJo e EC₅₀ calculada utilizando-se enquadramento logístico com quatro parâmetros.

[0041] Em outro aspecto, anticorpos ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, um domínio de ligação de抗ígenos ou proteína que o comprehende) que se ligam especificamente a polipeptídeos Siglec-7 e/ou 9 humanos são capazes de neutralizar a atividade inibidora desse(s) Siglec(s) em células imunes e capazes de bloquear a interação desse(s) polipeptídeo(s) Siglec com um de seus ligantes de ácido siálico. Em uma realização, o ácido siálico é trissacarídeo sialilado. Em uma realização, o ácido siálico comprehende uma estrutura Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb. Em uma realização, o ácido siálico comprehende uma estrutura de 6'-sialil-lactose. Em uma realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo liga-se especificamente a um polipeptídeo Siglec-7 e/ou 9 e é capaz de neutralizar a atividade inibidora desse(s) Siglec(s) em células NK humanas (por exemplo, células NK primárias humanas; células NK CD56^{dim}) em monócitos humanos, células dendríticas humanas, macrófagos humanos (notadamente macrófagos M2 ou imunossupressores), células T CD8 e/ou em neutrófilos humanos. Em uma realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo liga-se especificamente a um polipeptídeo Siglec-7 e/ou 9 humano e é capaz de neutralizar a atividade inibidora desse(s) Siglec(s) em macrófagos imunossupressores (por exemplo, macrófagos M2) de doadores humanos, em que o anticorpo ou fragmento de anticorpo reduz a atividade ou capacidade imunossupressora dos macrófagos.

[0042] Conforme discutido, Siglec-9 humano liga-se a Sia1 (Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb) e Sia2 (6'-sialil-lactose), enquanto Siglec-7 liga-se apenas a Sia2. Em certos aspectos, anticorpos são capazes de bloquear a interação desse(s) polipeptídeo(s) Siglec-9 com um ácido siálico que é ligante

de Siglec-9, mas não Siglec-7, tal como um ácido siálico Sia1. Em uma realização, o ácido siálico é trissacarídeo sialilado. Em uma realização, o ácido siálico compreende uma estrutura Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb. Em uma realização, o anticorpo não bloqueia substancialmente a interação de um ou mais polipeptídeos Siglec-7 com um ácido siálico que é ligante de Siglec-7 mas não Siglec-9, tal como ácido siálico que contém 6'-sialil-lactose.

[0043] Fragmentos e derivados desses anticorpos podem ser também utilizados de acordo com os métodos do presente. Em uma realização, o anticorpo compreende um domínio de ligação de抗ígenos (por exemplo, um único domínio de ligação de抗ígenos, um domínio composto de um domínio variável de cadeia leve e pesada etc.) capaz de ligar-se ao polipeptídeo Siglec-7 humano e/ou polipeptídeo Siglec-9 humano. Em uma realização, o domínio de ligação de抗ígenos liga polipeptídeo Siglec-9 humano e não polipeptídeo Siglec-7 humano (exemplificado por mAbsA, B, C, D, E e F). Em uma realização, o domínio de ligação de抗ígenos liga polipeptídeo Siglec-9 humano e polipeptídeo Siglec-7 humano (exemplificado por mAbs1, 2, 3, 4, 5 e 6). Em uma realização, é fornecida uma proteína (por exemplo, anticorpo, proteína multimérica e/ou multiespecífica) ou ácido nucleico que codifica esse domínio de ligação de抗ígenos.

[0044] Em uma realização, o anticorpo anti-Siglec neutralizador atenua a atividade inibidora exercida por Siglec-7 e/ou 9 em células imunes, aumentando a capacidade de linfócitos de reconhecer eficientemente e/ou eliminar células de câncer que expressam ligantes de ácido siálico de Siglec-7 e/ou ligantes de ácido siálico de Siglec-9. Os anticorpos (ou fragmentos de anticorpos) reduzem a capacidade de células de câncer de escapar da lise devido à expressão de um ou dos outros tipos de ligantes e, portanto, eles aumentam a vigilância de tumores pelo sistema imunológico. No compartimento de NK, Siglec-9 é principalmente expresso em células NK

CD56^{dim}, enquanto Siglec-7 é expresso em células NK CD56^{dim} e CD56^{brilhante}. Células NK CD56^{dim} (CD56^{dim}CD16⁺KIR⁺) representam cerca de 90% de células NK do baço e do sangue periférico, expressam perforina e granzimas e são o principal subconjunto citotóxico, enquanto células NK CD56^{brilhante} (CD56^{brilhante}CD16^{dim/-}KIR⁻) constituem a maior parte das células NK em nódulos linfáticos e amídalas e, mediante ativação, reagem principalmente com a produção de citoquinas. Em uma realização, é fornecido um anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga especificamente Siglec-9 humano e atenua a atividade inibidora exercida por Siglec-9 em células NK humanas (por exemplo, células NK primárias humanas; células NK CD56^{dim}), aumentando a capacidade das células NK de efetivamente reconhecer e/ou eliminar células de câncer que expressam ligantes de ácido siálico de Siglec-9. Em uma realização, é fornecido um anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga especificamente Siglec-7 e Siglec-9 humano e atenua a atividade inibidora exercida por Siglec-7 e Siglec-9 em células NK humanas (por exemplo, células NK primárias humanas; células NK CD56^{dim}), ampliando a capacidade das células NK de efetivamente reconhecer e/ou eliminar células de câncer que expressam ligantes de ácido siálico de Siglec-7 e Siglec-9.

[0045] Em qualquer realização, anticorpos anti-Siglec podem ligar Siglec-7 e Siglec-9 e podem neutralizar a inibição mediada por Siglec-7 e Siglec-9 da citotoxicidade de linfócitos (por exemplo, células NK e células T CD8⁺). Em um aspecto, o anticorpo aumenta a ativação de linfócitos na presença de células alvo (por exemplo, uma célula que expressa um ligante de Siglec-7 e/ou um ligante de Siglec-9, uma célula de tumor). Em uma realização, o anticorpo aumenta a citotoxicidade de células NK, conforme determinado em um teste de citotoxicidade *in vitro* padrão no qual células NK que expressam Siglec-9 são purificadas de doadores humanos e incubadas com células alvo que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-9. Em uma realização,

determina-se o aumento da ativação ou neutralização da inibição da citotoxicidade por meio de aumento de um marcador da citotoxicidade/potencial citotóxico, tal como a expressão de CD107 e/ou CD137 (mobilização). Em uma realização, o aumento da ativação ou neutralização da inibição da citotoxicidade é determinado pelo aumento da liberação de ^{51}Cr em um teste de liberação de ^{51}Cr . Siglec-7 pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 1. Siglec-9 pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 2. Em outra realização, Siglec-9 compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 160.

[0046] Em qualquer realização, um anticorpo é capaz de ligar-se a um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 2 (que possui uma lisina na posição 100, representativa de cerca de 49% da população) e a um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 160 (que possui ácido glutâmico em posição correspondente ao resíduo 100 de SEQ ID N° 2, representativa de cerca de 36% da população). Em qualquer realização, um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser especificado como sendo capaz de neutralizar a atividade inibidora de Siglec-9 em indivíduos que expressam (ou cujas células expressam) um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 2, bem como em indivíduos que expressam (ou cujas células expressam) um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 160.

[0047] Em qualquer realização, um anticorpo anti-Siglec-9 pode ser capaz de neutralizar a atividade inibidora de um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 2 e um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 160. Em uma realização, anticorpos ou fragmentos de anticorpos (ou proteínas que compreendem esses fragmentos) ligam polipeptídeo Siglec-9 humano e são

capazes de neutralizar a atividade inibidora de polipeptídeo Siglec-9 em células NK que expressam polipeptídeos Siglec-9 que compreendem a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 2 e em células NK que expressam polipeptídeos Siglec-9 que compreendem a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 160. Em uma realização, o anticorpo aumenta a citotoxicidade de células NK, conforme determinado em um teste de citotoxicidade *in vitro* padrão no qual células NK que expressam o Siglec-9 específico são purificadas a partir de doadores humanos e incubadas com células alvo que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-9.

[0048] Em um aspecto, o anticorpo anti-Siglec é um anticorpo tetramérico (por exemplo, com comprimento total, fragmento de F(ab')²) ou fragmento de anticorpo que é capaz de ligar-se de forma bivalente a um epítopo presente sobre o domínio extracelular de Siglec. O anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga Siglec de forma bivalente pode compreender dois domínios de ligação de抗ígenos, cada qual capaz de ligar um polipeptídeo Siglec-9 ou cada qual capaz de ligar-se a um epítopo presente em polipeptídeos Siglec-7 e 9. Em outro aspecto de qualquer das realizações do presente, o anticorpo liga-se a Siglec de forma monovalente e não possui atividade agonista em cada Siglec, tal como Siglec-7 e/ou Siglec-9. Em uma realização, o anticorpo que liga Siglec de forma monovalente é um fragmento de Fab. Em qualquer uma das realizações do presente, o anticorpo que se liga a Siglec de forma monovalente ou bivalente é livre de atividade agonista em Siglec-9. Para uso terapêutico, o anticorpo é preferencialmente um anticorpo não esgotador. Opcionalmente, o anticorpo compreende um domínio Fc capaz de ser ligado pelo receptor de Fc neonatal humano (FcRn), mas que substancialmente não possui ligação, por meio do seu domínio Fc, a um FcγR humano (por exemplo, CD16' e opcionalmente um ou mais ou cada um dentre polipeptídeos CD16A, CD16B, CD32A, CD32B e/ou CD64 humanos).

Opcionalmente, o anticorpo comprehende um domínio Fc de isótipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano que comprehende uma modificação de aminoácidos (por exemplo, uma ou mais substituições) que reduz a afinidade de ligação do anticorpo para um ou mais ou cada um dentre polipeptídeos CD16A, CD16B, CD32A, CD32B e/ou CD64 humanos.

[0049] Em uma realização, o anticorpo comprehende um ou mais (por exemplo, dois) domínios de ligação de antígenos que se ligam a Siglec-9, opcionalmente ainda a Siglec-7. Em realização específica, o anticorpo é um anticorpo tetramérico, opcionalmente com comprimento total, que comprehende dois domínios de ligação de antígenos idênticos (opcionalmente, dois pares de região variável de cadeia leve e pesada) e que liga e neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9, opcionalmente também Siglec-7, comprehende um domínio Fc capaz de ser ligado pelo receptor de Fc neonatal humano (FcRn) e que substancialmente não possui ligação a FcγR humano (por exemplo, CD16; opcionalmente, um ou mais ou cada um dentre polipeptídeos CD16A, CD16B, CD32A, CD32B e/ou CD64 humanos).

[0050] Em qualquer uma das realizações do presente, mediante ligação a Siglec sobre um linfócito humano, o anticorpo monoclonal possui a capacidade de ampliar ou reconstituir a lise de uma célula humana alvo que possui um ligante ácido siálico do Siglec sobre a superfície de células alvo e/ou possui a capacidade de aumentar a ativação de linfócitos (por exemplo, conforme determinado por aumento da expressão de CD107 e/ou CD137 sobre um linfócito), quando a célula alvo entrar em contato com o mencionado linfócito, tal como um linfócito efetor, célula NK ou T CD8+ de indivíduos humanos, tal como célula NK CD56^{dim}. Em uma realização, é fornecido um anticorpo que neutraliza primeiro Siglec expresso por primeiro subconjunto de linfócitos (por exemplo, Siglec-9 expresso em células NK CD56^{dim}), que neutraliza segundo Siglec expresso por segundo subconjunto de linfócitos

(Siglec-7 expresso em células NK CD56^{brilhante}). O primeiro e o segundo subconjunto de linfócitos humanos (por exemplo, células NK, células T CD8+, monócitos, células dendríticas, macrófagos, macrófagos M2 ou imunossupressores) podem, por exemplo, ser caracterizados por diferentes marcadores da superfície celular ou diferentes propriedades funcionais, ou pela capacidade de lisar ou reconhecer (por exemplo, ser ativados por) diferentes células alvo. Em uma realização, o anticorpo reduz (bloqueia) a ligação de Siglec a um de seus ligantes de sialosida (por exemplo, um ligante presente sobre células de tumores).

[0051] Em qualquer uma das realizações do presente, o ligante ácido siálico ou sialosida de Siglec é um ligante natural, tal como um ligante ácido siálico (ligante que compreende ácido siálico) conhecido por ligar-se ao polipeptídeo Siglec ao qual se liga o anticorpo. Ácidos siálicos, uma família de monossacarídeos ácidos com nove carbonos, são tipicamente considerados os ramos terminais de N-glicanos, O-glicanos e glicolipídios. Acredita-se que Sigecls reconheçam muitos aspectos da molécula de ácido siálico, como a ligação de ácido siálico da posição 2, as disposições de ácidos siálicos e sua forma de apresentação. Em qualquer uma das realizações do presente, o ligante de Siglec compreende principalmente derivado de ácido 5-N-acetylneuramínico (Neu5Ac) e pode compreender outros derivados de ácido siálico, tais como derivados de ácido 5-N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Em uma realização, o ligante de Siglec-9 e/ou Siglec-7 é um ácido siálico presente sobre uma glicoproteína (por exemplo, mucina) ou glicolipídio. Em uma realização, o ligante de Siglec-7 compreende um ácido dissíálico α2,8-ligado apresentado sobre gangliosídeos da série b, tais como GD2, GD3 e GT1b. Em uma realização, o ligante de Siglec-7 compreende gangliosídeos dissíálicos alfa2,6-ligados internamente ramificados, tais como DSGb5. Em uma realização, o ligante de Siglec-9 é um ligante que compreende ou está presente

em mucina, tal como MUC1. Em uma realização, o ligante de Siglec-9 é um ligante sialoglicano que contém ácido siálico e sulfato.

[0052] Em um aspecto, um anticorpo liga-se a um determinante comum presente sobre um domínio extracelular de primeiro e segundo Siglec relacionado a CD33 humano. Em um aspecto de qualquer realização do presente, um anticorpo liga-se a um determinante presente em Siglec-9, mas não em Siglec-7. Em um aspecto de qualquer realização do presente, um anticorpo liga-se a um determinante comum presente em Siglec-7 e Siglec-9. Opcionalmente, o determinante ligado por um anticorpo não está presente em um ou mais Sigecls diferentes, tais como um ou mais (ou todos) dentre Sigecls-3, 5, 6, 8, 10, 11 e 12.

[0053] Em qualquer uma das realizações do presente, o anticorpo liga-se a um domínio extracelular do Siglec. Em algumas das realizações do presente, particularmente quando o anticorpo bloquear a interação entre Siglec e um de seus ligantes de ácido siálico, o anticorpo pode ligar-se ao menos parcialmente no domínio de ligação de ácido siálico do Siglec ou perto dele. Em outras realizações do presente, particularmente quando o anticorpo não bloquear a interação entre Siglec e um de seus ligantes de ácido siálico, o anticorpo pode ligar-se fora do domínio de ligação de ácido siálico do Siglec.

[0054] Em qualquer uma das realizações do presente, mediante ligação a Siglec sobre um linfócito humano (por exemplo, célula NK primária), o anticorpo monoclonal possui a capacidade de reconstituir a lise de uma célula humana alvo que possui um ligante ácido siálico do Siglec sobre a superfície da célula alvo, quando a mencionada célula alvo entrar em contato com o mencionado linfócito.

[0055] Em qualquer uma das realizações do presente, o anticorpo anti-Siglec possui KD (por exemplo, para ligação monovalente, conforme determinado de acordo com os métodos descritos nos Exemplos do presente)

de menos de 10^{-8} M, preferencialmente menos de 10^{-9} M, para ligação a um polipeptídeo Siglec (por exemplo, Siglec-7 humano e/ou Siglec-9 humano). Como se acredita que os locais de ligação de Siglec-7 e 9 são geralmente mascarados na superfície celular devido a interações *cis* com ácido siálicos com baixa afinidade em abundante expressão, podem ocorrer interações *trans* com anticorpos que expressam afinidade mais alta que os ligantes que concorrem com *cis*. Em uma realização, o anticorpo anti-Siglec neutralizante é capaz de deslocar a ligação de um ligante de sialosida a Siglec (por exemplo, Siglec-7 e/ou Siglec-9).

[0056] O anticorpo anti-Siglec pode ser um anticorpo ou fragmento de anticorpo humano ou humanizado ou um de seus derivados, que possui quaisquer das propriedades acima, isoladamente ou em qualquer combinação apropriada.

[0057] O anticorpo anti-Siglec pode concorrer pela ligação a um epítopo sobre Siglec-9 ligado por mAb-A, B, C, D, E e/ou F (por exemplo, que concorre pela ligação a um epítopo sobre um polipeptídeo Siglec-9 com um anticorpo que contém as CDRs de cadeia leve e pesada ou regiões variáveis de qualquer um dentre mAb-A, B, C, D, E e/ou F).

[0058] O anticorpo anti-Siglec pode concorrer pela ligação a um epítopo sobre Siglec-7 e/ou Siglec-9 ligado por mAbs-1, 2, 3, 4, 5 e/ou 6 (por exemplo, que concorre pela ligação a um epítopo sobre um polipeptídeo Siglec-7 e/ou Siglec-9 com um anticorpo que contém as CDRs de cadeia leve e pesada ou regiões variáveis de qualquer um dentre mAbs-1, 2, 3, 4, 5 ou 6).

[0059] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-7 que possui mutação no resíduo N82, P83, A84, R85, A86 e/ou V87 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec-7 possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-7 que possui mutação no resíduo N81, D100, H102 e/ou

T103 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec-7 possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-7 que possui mutação no resíduo W88, E89, E90 ou R92 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). As posições de resíduos para mutações referem-se ao polipeptídeo Siglec-7 de SEQ ID N° 1. Opcionalmente, o anticorpo não perde a ligação para um ou mais polipeptídeos Siglec-7 mutantes diferentes da Tabela 3, tais como um ou mais mutantes M6, M8, M15 ou M16 (ou todos).

[0060] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo N78, P79, A80, R81, A82 e/ou V83 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec-9 possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo N77, D96, H98 e/ou T99 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec-9 possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo W84, E85, E86 e/ou R88 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). As posições de resíduos para mutações referem-se ao polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2. Opcionalmente, o anticorpo não perde a ligação para um ou mais polipeptídeos Siglec-9 mutantes diferentes da Tabela 3, tais como um ou mais mutantes M6, M8, M15 ou M16 (ou todos).

[0061] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo S47, H48, G49, W50, I51, Y52, P53 e/ou G54 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). As posições de resíduos para mutações referem-se ao polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2. Opcionalmente, o anticorpo não perde a ligação para um ou mais polipeptídeos Siglec-9 mutantes diferentes da Tabela 3, tais como mutantes 9, 10 e/ou 11 ou um ou mais mutantes M7 ou M8 (ou todos).

[0062] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo P55, H58, E122, G124, S125 e/ou K127 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). As posições de resíduos para mutações referem-se ao polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2. Opcionalmente, o anticorpo não perde a ligação para um ou mais polipeptídeos Siglec-9 mutantes diferentes da Tabela 3, tais como os mutantes 9, 10 e/ou 11.

[0063] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo K131 e/ou H132 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). As posições de resíduos para mutações referem-se ao polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2. Opcionalmente, o anticorpo não perde a ligação para um ou mais polipeptídeos Siglec-9 mutantes diferentes da Tabela 3, tais como mutantes 9, 10 e/ou 11 ou um ou mais mutantes M8 ou M15 (ou todos).

[0064] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec possuem ligação reduzida a um polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo R63, A66, N67, T68, D69, Q70 e/ou D71 (por exemplo, as mutações descritas na Tabela 3). As posições de resíduos para mutações referem-se ao polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2. Opcionalmente, o anticorpo não perde a ligação para um ou mais polipeptídeos Siglec-9 mutantes diferentes da Tabela 3, tais como mutantes 9, 10 e/ou 11 ou um ou mais mutantes M6, M15 ou M16 (ou todos).

[0065] O anticorpo anti-Siglec pode compreender a cadeia leve e pesada CDR1, 2 e 3 ou que liga o mesmo epítopo e/ou concorre pela ligação a um polipeptídeo Siglec-7 e/ou Siglec-9 com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste de:

- a. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 3 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável

de cadeia leve de SEQ ID N° 4;

b. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 5 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 6;

c. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 7 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 8;

d. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 9 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 10;

e. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 11 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 12;

f. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 13 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 14;

g. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 15 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 16;

h. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 17 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região

variável de cadeia leve de SEQ ID N° 18;

i. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 19 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 20;

j. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 21 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 22;

k. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 23 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 24; e

l. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 25 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 26.

[0066] O anticorpo anti-Siglec pode possuir uma cadeia pesada que contém uma, duas ou três CDRs da cadeia pesada de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste de anticorpo mAb-A, B, C, D, E e F; e uma cadeia leve que contém uma, duas ou três CDRs da cadeia leve do anticorpo correspondente selecionado a partir do grupo que consiste de anticorpo mAb-A, B, C, D, E e F.

[0067] O anticorpo anti-Siglec pode compreender: CDR1 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos SYWMH (SEQ ID N° 75); CDR2 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos EINPSNGHTNYNEKFES (SEQ ID N° 78); CDR3 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos GVESYDFDDALDY (SEQ ID N° 80);

CDR1 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos RASQDINNYLN (SEQ ID N° 83); CDR2 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos YTSRLHS (SEQ ID N° 57); CDR3 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos QQGNTLPFT (SEQ ID N° 86); e sequências de cadeia principal de cadeia leve e pesada humanas.

[0068] O anticorpo anti-Siglec pode compreender: CDR1 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos SYWMH (SEQ ID N° 75); CDR2 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos EINPSNGHTNYNEKFKT (SEQ ID N° 90); CDR3 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos GVETYDFDDAMDY (SEQ ID N° 92); CDR1 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos RASQDINNYLN (SEQ ID N° 83); CDR2 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos FTSRLHS (SEQ ID N° 95); CDR3 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos QQGDTFPFT (SEQ ID N° 96); e sequências de cadeia principal de cadeia leve e pesada humanas.

[0069] O anticorpo anti-Siglec pode compreender: CDR1 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos NYEMN (SEQ ID N° 98); CDR2 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos WINTYTGESTYADDFK (SEQ ID N° 101); CDR3 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos DDYGRSYGFAY (SEQ ID N° 103); CDR1 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos RASESVDSYGNFSMH (SEQ ID N° 106); CDR2 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos LASKLES (SEQ ID N° 109); CDR3 de cadeia leve que comprehende a sequência de aminoácidos HQNNEDPPWT (SEQ ID N° 110); e sequências de cadeia principal de cadeia leve e pesada humanas.

[0070] O anticorpo anti-Siglec pode compreender: CDR1 de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos DYSMH (SEQ ID

N° 112); CDR2 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos WIITETGEPTYADDFRG (SEQ ID N° 115); CDR3 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos DFDGY (SEQ ID N° 117); CDR1 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos RASENIYSYLA (SEQ ID N° 119); CDR2 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos NAKTLTE (SEQ ID N° 122); CDR3 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos QHHYGFPWT (SEQ ID N° 123); e sequências de cadeia principal de cadeia leve e pesada humanas.

[0071] O anticorpo anti-Siglec pode compreender: CDR1 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos TFGMH (SEQ ID N° 125); CDR2 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos YISSGSNAIYYADTVKG (SEQ ID N° 128); CDR3 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos PGYGAWFAY (SEQ ID N° 130); CDR1 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos RASSSVSSAYLH (SEQ ID N° 133); CDR2 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID N° 136; CDR3 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos QQYSAYPYT (SEQ ID N° 137); e sequências de cadeia principal de cadeia leve e pesada humanas.

[0072] O anticorpo anti-Siglec pode compreender: CDR1 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos DYSMH (SEQ ID N° 112); CDR2 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos VISTYNGNTNYNQKFKG (SEQ ID N° 139); CDR3 de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos RGYYGSSSWFGY (SEQ ID N° 141); CDR1 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos KASQNVGTDVA (SEQ ID N° 144); CDR2 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos SASYRYS (SEQ ID N° 147; CDR3 de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos QQYNSFPYT (SEQ ID N° 148) e sequências de cadeia principal de cadeia leve e pesada

humanas.

[0073] O anticorpo anti-Siglec pode possuir cadeia leve e/ou pesada que contém uma, duas ou três CDRs da cadeia leve e/ou pesada correspondente de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste de anticorpo mAbs-1, 2, 3, 4, 5 e 6.

[0074] Em um aspecto de qualquer uma das realizações, a ligação a Siglec pode ser especificada como sendo Siglec celular, em que o Siglec é expresso na superfície de uma célula, tal como Siglec celular nativo ou modificado, Siglec expresso por células hospedeiras recombinantes, Siglec expresso por células NK, células T CD8 etc.

[0075] O composto que inibe polipeptídeo NKG2A (agente anti-NKG2A) pode ser caracterizado como composto que aumenta a capacidade de uma célula NK que expressa NKG2A e/ou célula T para causar a morte da célula que expressa HLA-E (por exemplo, célula de tumor que expressa HLA-E). Opcionalmente, o composto que inibe um polipeptídeo NKG2A é um polipeptídeo, opcionalmente um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal), que liga um polipeptídeo NKG2A.

[0076] Em uma realização, o agente anti-NKG2A reduz a atividade inibidora de NKG2A por meio de bloqueio da ligação do seu ligante, HLA-E, ou seja, o agente anti-NKG2A interfere com a ligação de NKG2A por HLA-E. O anticorpo que possui a cadeia pesada de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e a cadeia leve de SEQ ID N° 176 é um exemplo desse anticorpo. Em uma realização, o agente anti-NKG2A reduz a atividade inibidora de NKG2A sem bloqueio da ligação do seu ligante, HLA-E, ou seja, o agente anti-NKG2A é um antagonista não competitivo e não interfere com a ligação de NKG2A por HLA-E. O anticorpo que contém as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de SEQ ID N° 177 e 178 é, respectivamente, um exemplo desse anticorpo.

[0077] Em uma realização, o agente anti-NKG2A liga-se com afinidade significativamente superior a NKG2A que a um ou mais receptores de NKG2 ativadores. Em uma realização, por exemplo, o agente é um anticorpo que se liga com afinidade significativamente superior a NKG2A com relação a NKG2C. Em realização adicional ou alternativa, o agente é um anticorpo que se liga com afinidade significativamente superior a NKG2A com relação a NKG2E. Em realização adicional ou alternativa, o agente é um anticorpo que se liga com afinidade significativamente superior a NKG2A com relação a NKG2H.

[0078] Em uma realização, o agente anti-NKG2A concorre com o anticorpo que possui a região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e a região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 176 ou o anticorpo que contém as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de SEQ ID N° 177 e 178, respectivamente, em ligação a CD94/NKG2A. O agente pode ser, por exemplo, anticorpo anti-NKG2A humano ou humanizado, tal como monalizumab (IPH2201, Innate Pharma).

[0079] Em uma realização, o anticorpo anti-NKG2A é um anticorpo humanizado que contém as CDRs de cadeia pesada de qualquer uma das cadeias pesadas de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e as CDRs de cadeia leve da cadeia leve de SEQ ID N° 176, respectivamente. Em uma realização, o anticorpo anti-NKG2A é um anticorpo humanizado que contém a região variável de cadeia pesada de qualquer uma das cadeias pesadas de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e a região variável de cadeia leve da cadeia leve de SEQ ID N° 176, respectivamente.

[0080] Em um aspecto de qualquer uma das realizações da presente invenção, é fornecida uma proteína (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer das realizações do presente) que liga um polipeptídeo Siglec-9 e que liga adicionalmente um polipeptídeo

NKG2A humano e neutraliza a atividade inibidora do polipeptídeo NKG2A. Exemplos dessas proteínas incluem, por exemplo, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos e triespecíficos).

[0081] A presente invenção também se refere a ácido nucleico que codifica o anticorpo ou fragmento de anticorpo humano ou humanizado que possui qualquer uma das propriedades acima, um vetor que compreende esse ácido nucleico, uma célula que compreende esse vetor e métodos de produção de anticorpos de acordo com a presente invenção. São também fornecidas composições, tais como kits e composições farmaceuticamente aceitáveis, que compreendem essas proteínas, ácidos nucleicos, vetores e/ou células e tipicamente um ou mais ingredientes adicionais que podem ser ingredientes ativos ou ingredientes inativos que promovem a formulação, fornecimento, estabilidade ou outras características da composição (por exemplo, vários veículos). A presente invenção refere-se ainda a diversos métodos novos e úteis que elaboram e utilizam esses anticorpos, ácidos nucleicos, vetores, células, organismos e/ou composições, por exemplo, na modulação de atividades biológicas mediadas por Siglec, por exemplo, no tratamento de doenças relacionadas, notadamente cânceres e doenças infecciosas.

[0082] Estes aspectos são descritos mais completamente no relatório descritivo da presente invenção e aspectos, características e vantagens adicionais serão evidentes a partir dele.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0083] A Figura 1 exibe a ligação de anticorpos anti-Siglec a células NK. MFI Siglec: média da intensidade de fluorescência. Uma fração significativa (cerca de 44%) de células NK expressou Siglec-7 e Siglec-9, o que sugere que uma grande proporção de células NK pode ser inibida por cada um desses receptores (ou ambos), em função dos ligantes de glicano presentes,

por exemplo, sobre células de tumores.

[0084] A Figura 2 exibe resultados representativos de citometria de fluxo para exemplos de anticorpos que se ligam a Siglec-7, mas não Siglec-9 ou Siglec de cynomolgus (painel direito), que se ligam a cada um dentre Siglec-7, Siglec-9 e Siglec de cynomolgus (painel intermediário) e que se ligam a Siglec-9, mas não Siglec-7 ou Siglec de cynomolgus (painel esquerdo).

[0085] A Figura 3 exibe titulação por meio de ligação por citometria de fluxo de anticorpos mAbA, mAbC e mAbD a moDC (painel esquerdo) e moDC tratada com neuramidase (painel direito), acompanhada pelos seus valores EC₅₀ correspondentes. A EC₅₀ foi altamente aprimorada (10 vezes) após tratamento com neuraminidase, o que sugere que Siglec-9 expresso sobre moDCs foi acionado em interação cis com seus ligantes de ácido siálico antes do tratamento com neuraminidase. O nível de fase estável, entretanto, não é modificado, o que sugere que os anticorpos podem ligar todas as conformações de Siglec-9 (ligado e não ligado) sobre a superfície celular e inibe interações cis e sinalização em monoDCs, bem como em outros tipos celulares (por exemplo, monócitos e macrófagos M1 e M2).

[0086] A Figura 4 exibe indução dependente de dosagem de aumento da citotoxicidade de YTS Siglec-9* entre anticorpos reativos a Siglec-7 e 9 (Figura 4B) e entre anticorpos monoespecíficos Siglec-9 (sem ligação a Siglec-7) (Figura 4A).

[0087] A Figura 5 exibe o aumento da citotoxicidade de células NK primárias mediada por anticorpo mAbA, mAbC, mAbD, mAbE e mAbF em dois doadores humanos diferentes (doadores D1 (painel esquerdo) e D2 (painel direito) em um teste de liberação de ⁵¹Cr clássico, utilizando células NK primárias (como células NK novas purificadas de doadores) e células de câncer colorretal HT29.

[0088] A Figura 6 exibe aumento do percentual de células NK

positivas para Siglec-9 que expressam CD137 mediado por diversos anticorpos anti-Siglec-9 e anti-Siglec-7/9 mAbA, mAbB, mAbF, mAb6 e mAb4 em um doador humano, na presença de células de tumores HT29. Os anticorpos anti-Siglec-9 restauraram totalmente a citotoxicidade de células NK humanas primárias que expressam Siglec-9 até o nível observado em células NK humanas primárias negativas para Siglec-9 do mesmo doador.

[0089] A Figura 7 demonstra que os anticorpos mAbA e mAb1 induzem aumento das células NK CD137+ positivas para Siglec-9 (%) (painel intermediário), mas não células NK CD137+ negativas para Siglec-9 (%) (painel direito). O percentual de NK que expressa CD137 na ausência de anticorpos é exibido no painel esquerdo.

[0090] A Figura 8 exibe ligação de proteína Siglec-9-Fc a células de Ramos na presença de anticorpos (painel superior). Cada um dos mAbs anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC e mAbD inibiu a ligação de proteína Siglec-9-Fc às células de Ramos, enquanto mAbE exibiu inibição parcial e mAbF não inibiu a ligação. A ligação de proteína Siglec-9-Fc a células K562 na presença de anticorpos é exibida no painel inferior. Cada um dos mAbs anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC e mAbD inibiu a ligação de proteína Siglec-9-Fc às células de Ramos, enquanto mAbE e mAbF exibiram inibição parcial.

[0091] As Figuras 9 e 10 exibem o teste de bloqueio da interação entre Siglec-7 e 9 e ligantes sialilados por anticorpos anti-Siglec-7/9 utilizando testes ELISA. A Figura 9 demonstra que mAbs 1, 2, 4, 5 e 6 bloquearam a interação de Siglec-7 com Sia2, ao contrário de mAb3. A Figura 10 demonstra que todos os mAbs bloqueiam a interação de Siglec-9 com Sia2, enquanto mAb1, mAb2 e mAb3 exibiram baixa capacidade de inibição da interação de Siglec-9 com Sia1 e, portanto, não bloquearam substancialmente a interação de Sia1.

[0092] As Figuras 11-14 exibem a proteína Siglec-9 humana. A

Figura 11 exibe a estrutura do domínio similar a Ig conjunto V N-terminal de Siglec-9, com os resíduos substituídos em mutante de Siglec-9 M9, M10 e M11 exibidos em tom escuro. A Figura 12 exibe a estrutura do domínio similar a Ig conjunto V N-terminal de Siglec-9, com os resíduos substituídos em mutante de Siglec-9 M6 e M7 exibidos em tom escuro. A Figura 13 exibe a estrutura do domínio similar a Ig conjunto V N-terminal de Siglec-9, com os resíduos substituídos em mutante de Siglec-9 M16 exibidos em tom escuro. A Figura 14 exibe a estrutura do domínio similar a Ig conjunto V N-terminal de Siglec-9, com os resíduos substituídos em mutante de Siglec-9 M8 exibidos em tom escuro. Em cada uma das Figuras 11-14, o local de ligação de ligante ácido siálico é exibido em tom claro.

[0093] A Figura 15 demonstra que anticorpos anti-Siglec (mAbA) induziram aumento de células positivas para CD137 entre células NK Siglec-9+, mas não induziram aumento de células positivas CD137 em células NK Siglec-9- e que anticorpo anti-NKG2A aumentou a citotoxicidade (conforme determinado pelo aumento da expressão de CD137) de células NK Siglec-9- e Siglec-9+ para células alvo de tumores positivos para HLA-E e o aumento da expressão de CD137 foi maior nas células Siglec-9- (negativas), o que sugere que Siglec-9 restringe a citotoxicidade das células NK que expressam NKG2A na presença de bloqueio de NKG2A. A adição de anticorpos anti-Siglec restaurou a expressão/citotoxicidade de CD137 nas células NK que expressam NKG2A.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0094] Definições:

Da forma utilizada na presente invenção, “um” ou “uma” pode indicar um(a) ou mais. Da forma utilizada nas reivindicações, quando utilizadas em conjunto com a expressão “que compreende”, as palavras “um” ou “uma” podem indicar um(a) ou mais de um(a). Da forma utilizada no presente, “outro”

pode indicar pelo menos um segundo ou mais.

[0095] “Que compreende”, quando utilizado, pode ser opcionalmente substituído por “que consiste essencialmente de” ou por “que consiste de”.

[0096] Siglec-7 humano (exibido no número de acesso Genbank NP_055200.1, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência) é um membro da família de Siglec relativa a CD33 (Angata e Varki, *Glycobiology* 10 (4), 431-438 (2000)). Siglec-7 humano compreende 467 aminoácidos, que possuem a sequência de aminoácidos a seguir:

```
mllllllpli wgrervegqk snrkdytslm qssvtvqegm cvhvrcfsy pvdsqtdsdp
vhgywfragn diswkapvat nnpawavqee trdrfhllgd pqtknctlsi rdarmsdagr
yffrmekgni kwnykydqis vnvttalhrp nilipgtles gcfqnltcsv pwaceqgtp
miswmgtsvs plhpsttrss vltlipqpqh hgtsltcqvt lpgagvttnr tiqlnvsypp
qnltvtfqg egtastalgn ssslsvlegq slrlvcavds npparlswtw rsltlypsqp
snplvlelqv hlgdegeftc raqnslgsqh vslnlslqqe ytgkmrpvsg vllgavggag
atalvflsfc vifivvrscr kksarpaadv gdigmkdant irgsasqgnl teswaddnpr
hhglaahssg eereiqyapl sfhkgepqdl sgqeatnney seikipk (SEQ ID N° 1).
```

[0097] Siglec-9 humano (exibido no número de acesso Genbank NP055256.1, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência) é um membro da família de Siglec relativa a CD33 (Angata e Varki, *J. Biol. Chem.* 275 (29), 22127-22135 (2000)). Siglec-9 humano compreende 463 aminoácidos, que possuem a sequência de aminoácidos a seguir:

```
MLLPLLPLW GRERAEGQTS KLLTMQSSVT VQEGLCVHVP CSFSYPSHGW
IYPGPVVHGY
WFREGANTDQ DAPVATNNPA RAVWEETRDR FHLLGDPHTK NCTLSIRDAR
RSDAGRYFFR
MEKGSIKWNY KHHRLSVNVT ALTHRPNILI PGTLESGCPQ NLTCSPWAC
EQGTPPMISW
```

IGTSVSPLDP STTRSSVLTL IPQPQDHGTS LTCQVT FPGA SVTTNKT VHL
NVSYP PQNL T
MTVFQGDGT VSTVLNGSSL SLPEGQSLRL VCAVDAVDSN PPARLSLSWR
GLTLCPSQPS
NPGVLELPWV HLRDAAEFTC RAQNPLGSQQ VYLNVSLQSK ATSGVTQGVV
GGAGATALVF
LSFCVIFVVV RSCRKKSARP AAGVGDTGIE DANAVRGSAS QGPLTEPWAE
DSPPDQPPP A
SARSSVGE GE LQYASLSFQM VKPWDSRGQE ATDTEYSEIK IHR (SEQ ID
N° 2).

[0098] No contexto da presente invenção, “neutralizar a inibição mediada por Siglec da citotoxicidade de células NK”, “neutralizar a inibição mediada por Siglec da citotoxicidade de células T” ou “neutralizar a atividade inibidora de Siglec” indicam um processo no qual Siglec (por exemplo, Siglec-7 e Siglec-9) tem inibida sua capacidade de prejudicar processos intracelulares, gerando reações de linfócitos, tais como liberação de citoquinas e reações citotóxicas. Isso pode ser medido, por exemplo, em um teste de citotoxicidade com base em células T ou NK padrão, no qual é medida a capacidade de um composto terapêutico de estimular a morte de células positivas para ligante ácido siálico por linfócitos positivos para Siglec. Em uma realização, preparações de anticorpos causam aumento de pelo menos 10% da citotoxicidade de um linfócito restrito por Siglec, opcionalmente aumento de pelo menos 40% ou 50% da citotoxicidade de linfócitos ou, opcionalmente, aumento de pelo menos 70% da citotoxicidade de NK, com referência aos testes de citotoxicidade descritos. Em uma realização, preparações de anticorpos causam aumento de pelo menos 10% da liberação de citoquina por um linfócito restrito por Siglec, opcionalmente aumento de pelo menos 40% ou 50% da liberação de citoquinas ou, opcionalmente, aumento de pelo menos

70% da liberação de citoquina, com referência aos testes de citotoxicidade descritos. Em uma realização, uma preparação de anticorpos causa aumento de pelo menos 10% da expressão da superfície celular de um marcador da citotoxicidade (por exemplo, CD107 e/ou CD137) por linfócitos restritos por Siglec, opcionalmente aumento de pelo menos 40% ou 50% ou, opcionalmente, aumento de pelo menos de 70% da expressão da superfície celular de um marcador da citotoxicidade (por exemplo, CD107 e/ou CD137).

[0099] A capacidade de um anticorpo anti-Siglec de “bloquear” a ligação de uma molécula de Siglec a um ligante ácido siálico indica que o anticorpo, em um teste que utiliza moléculas de ácido siálico e Siglec associadas à superfície celular ou solúveis e pode reduzir de forma detectável a ligação de uma molécula de Siglec a uma molécula de ácido siálico em forma dependente de dosagem, em que a molécula de Siglec liga-se de forma detectável à molécula de ácido siálico na ausência do anticorpo.

[00100] NKG2A (OMIM 161555, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência) é um membro do grupo de transcritos NKG2 (Houchins et al (1991), *J. Exp. Med.* 173: 1017-1020). NKG2A é codificado por 7 exons que cobrem 25 kb, exibindo alguma junção diferencial. Em conjunto com CD94, NKG2A forma o receptor inibidor heterodimérico CD94/NKG2A, encontrado sobre a superfície de subconjuntos de células NK, células T α/β, células T γ/δ e células NKT. De forma similar a receptores de KIR inibidores, ele possui ITIM no seu domínio citoplasmático. Da forma utilizada no presente, “NKG2A” indica qualquer variante, derivado ou isoforma do gene NKG2A ou proteína codificada. NKG2A humano compreende 233 aminoácidos em três domínios, com domínio citoplasmático que compreende os resíduos 1-70, uma região transmembrana que compreende os resíduos 71-93 e uma região extracelular que compreende os resíduos 94-233 da sequência a seguir: MDNQGVIYSDLNLPPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQ

GNDKTYHCKDLPSAPEKLIVGILGIICLILMASVVTIVVIPSTLIQRHNNSSLNTRT
QKARHCGHCP

EEWITYNSCYYIGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWI
GVFRNSS

HHPWVTMNGLAFKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIYHCKHKL

(SEQ ID N° 170).

[00101] NKG2C (OMIM 602891, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência) e NKG2E (OMIM 602892, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência) são dois outros membros do grupo de transcritos NKG2 (Gilenke et al (1998), *Immunogenetics* 48: 163-173). Os receptores de CD94/NKG2C e CD94/NKG2E são receptores ativadores encontrados sobre a superfície de subconjuntos de linfócitos tais como células NK e células T.

[00102] HLA-E (OMIM 143010, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência) é uma molécula MHC não clássica expressa sobre a superfície celular e regulada pela ligação de peptídeos, tais como os fragmentos derivados da sequência de sinal de outras moléculas de MHC classe I. Foram também identificadas versões solúveis de HLA-E. Além das suas propriedades de ligação de receptores de células T, HLA-E liga subconjuntos de células matadoras naturais (NK), células T matadoras naturais (NKT) e células T (α/β e γ/δ), por meio de ligação específica a CD94/NKG2A, CD94/NKG2B e CD94/NKG2C (vide, por exemplo, Braud et al (1998), *Nature* 391: 795-799, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência). A expressão na superfície de HLA-E protege células alvo contra lise por clones de células NK, T ou NKT CD94/NKG2A+. Da forma utilizada no presente, “HLA-E” indica qualquer variante, derivado ou isoforma do gene HLA-E ou proteína codificada.

[00103] No contexto da presente invenção, “NKG2A” ou

“linfócito positivo para CD94/NKG2A” designa células da linhagem de linfoides (por exemplo, células NK, NKT e T) que expressam CD94/NKG2A sobre a superfície celular, que pode ser detectado, por exemplo, por meio de citometria de fluxo, utilizando anticorpos que reconhecem especificamente um epítopo combinado sobre CD94 e NKG2A e/ou epítopo sobre NKG2A isoladamente. “Linfócito positivo para NKG2A” também inclui linhagens de células imortais com origem em linfoides (por exemplo, NKL e NK-92).

[00104] No contexto da presente invenção, “reduz a atividade inibidora de NKG2A”, “neutraliza NKG2A” ou “neutraliza a atividade inibidora de NKG2A” designam um processo no qual CD94/NKG2A tem inibida sua capacidade de prejudicar processos intracelulares, gerando reações de linfócitos, tais como liberação de citoquinas e reações citotóxicas. Isso pode ser medido, por exemplo, em um teste de citotoxicidade com base em células T ou NK, no qual é medida a capacidade de um composto terapêutico de estimular a morte de células positivas para HLA-E por linfócitos positivos para CD94/NKG2A. Em uma realização, preparações de anticorpos causam aumento de pelo menos 10% da citotoxicidade de um linfócito restrito por CD94/NKG2A, opcionalmente aumento de pelo menos 40% ou 50% da citotoxicidade de linfócitos, opcionalmente aumento de pelo menos 70% da citotoxicidade de NK, com referência aos testes de citotoxicidade descritos. Caso um anticorpo anti-NKG2A reduza ou bloquee interações de CD94/NKG2A com HLA-E, ele pode aumentar a citotoxicidade de linfócitos restritos por CD94/NKG2A. Isso pode ser avaliado, por exemplo, em um teste de citotoxicidade *in vitro* por quatro horas padrão, utilizando, por exemplo, células NK que expressam CD94/NKG2A e células alvo que expressam HLA-E. Essas células NK não matam eficientemente alvos que expressam HLA-E, pois CD94/NKG2A reconhece HLA-E, o que gera início e propagação de sinalização inibidora que evita citólise mediada por linfócitos. Esse teste da citotoxicidade

in vitro pode ser conduzido por meio de métodos padrão bem conhecidos na técnica, conforme descrito, por exemplo, em Coligan et al, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, Nova Iorque (1992, 1993). A liberação de cromo e/ou outros parâmetros para determinar a capacidade do anticorpo de estimular linfócitos para matar células alvo tais como células P815 e K562 ou células de tumores apropriadas também são descritas em Sivori et al, *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1129-1136; Vitale et al, *J. Exp. Med.* 1998; 187: 2065-2072; Pessino et al, *J. Exp. Med.* 1998; 188: 953-960; Neri et al, *Clin. Diag. Lab. Immun.* 2001; 8: 1131-1135; Pende et al, *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1505-1516, cujas descrições completas são incorporadas ao presente como referência. As células alvo são marcadas com ^{51}Cr antes da adição de células NK e, em seguida, estima-se que a mortalidade seja proporcional à liberação de ^{51}Cr das células para o meio, como resultado da mortalidade. A adição de um anticorpo que evita que CD94/NKG2A ligue-se a HLA-E resulta na prevenção do início e propagação de sinalização inibidora por meio de CD94/NKG2A. A adição desses agentes resulta, portanto, em aumentos da mortalidade mediada por linfócitos das células alvo. Esta etapa identifica, portanto, agentes que evitam a sinalização negativa induzida por CD94/NKG2A, por exemplo, por meio do bloqueio da ligação de ligantes. Em um teste de citotoxicidade da liberação de ^{51}Cr específico, células efetoras NK que expressam CD94/NKG2A podem matar células alvo LCL 721.221 negativas para HLA-E, mas não tão bem quanto células controle LCL 721.221-Cw3 que expressam HLA-E. Por outro lado, células efetoras YTS que não possuem CD94/NKG2A matam eficientemente as duas linhagens celulares. Células efetoras NK, portanto, matam células LCL 721.221-Cw3 HLA-E $^{+}$ com menos eficiência, devido à sinalização inibidora induzida por HLA-E por meio de CD94/NKG2A. Quando células NK forem previamente incubadas com anticorpos anti-CD94/NKG2A bloqueadores de acordo com a presente

invenção nesse teste de citotoxicidade de liberação de ^{51}Cr , células LCL 721.221-Cw3 que expressam HLA-E são mortas com mais eficiência, de forma dependente da concentração de anticorpos. A atividade inibidora (ou seja, potencial amplificador da citotoxicidade) de um anticorpo anti-NKG2A pode também ser determinada em qualquer uma dentre uma série de outras formas, tal como pelo seu efeito sobre cálcio livre intracelular conforme descrito, por exemplo, em Sivori et al, *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1129-1136, cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência. A ativação da citotoxicidade de células NK pode ser determinada, por exemplo, pela medição do aumento da produção de citoquinas (por exemplo, produção de IFN- γ) ou marcadores da citotoxicidade (por exemplo, mobilização de CD107 ou CD137). Em um exemplo de protocolo, a produção de IFN- γ a partir de PBMC é determinada pela superfície celular, manchas intracitoplasmáticas e análise por meio de citometria de fluxo após quatro dias em cultivo. Resumidamente, adiciona-se Brefeldin A (Sigma Aldrich) em concentração final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pelas últimas quatro horas de cultivo. As células são incubadas em seguida com mAb anti-CD3 e anti-CD56 antes da permeabilização (IntraPrep®; Beckman Coulter) e manchas com PE-anti-IFN- γ ou PE-IgG1 (Pharmingen). A produção de GM-CSF e IFN- γ a partir de células NK ativadas policlonais é medida em sobrenadantes utilizando-se ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Mineápolis, MN, IFN- γ : conjunto OptEIA, Pharmingen).

[00105] Sempre que, no presente relatório descritivo, mencionar-se “tratamento de câncer” ou similar com referência a agentes de ligação anti-Siglec (por exemplo, anticorpo), indica-se: (a) método de tratamento de câncer, em que o mencionado método compreende a etapa de administração (para pelo menos um tratamento) de agente de ligação anti-Siglec (preferencialmente em material veículo farmaceuticamente aceitável) a um indivíduo, mamífero, especialmente ser humano, necessitado desse

tratamento, em dose que permita o tratamento de câncer (quantidade terapeuticamente eficaz), pelo menos em dose (quantidade) especificada no presente; (b) uso de um agente de ligação anti-Siglec para o tratamento de câncer ou um agente de ligação anti-Siglec, para uso no mencionado tratamento (especialmente em seres humanos); (c) uso de agente de ligação anti-Siglec para fabricação de preparações farmacêuticas para o tratamento de câncer, método de uso de agentes de ligação anti-Siglec para fabricação de preparações farmacêuticas para o tratamento de câncer, que compreende a mistura de um agente de ligação anti-Siglec com veículo farmaceuticamente aceitável ou preparação farmacêutica que compreende dose eficaz de agente de ligação anti-Siglec que é apropriada para o tratamento de câncer; ou (d) qualquer combinação de (a), (b) e (c), de acordo com o objeto patenteável nos países nos quais o presente pedido for depositado.

[00106] Da forma utilizada no presente, a expressão “domínio de ligação de抗ígenos” designa um domínio que compreende uma estrutura tridimensional capaz de ligar-se de forma imunoespecífica a um epítopo. Em uma realização, portanto, o mencionado domínio pode compreender uma região hipervariável, opcionalmente um domínio VH e/ou VL de uma cadeia de anticorpos, opcionalmente pelo menos um domínio VH. Em outra realização, o domínio de ligação pode compreender pelo menos uma região de determinação da complementaridade (CDR) de uma cadeia de anticorpos. Em outra realização, o domínio de ligação pode compreender um domínio de polipeptídeo de uma construção não de imunoglobulina.

[00107] Os termos “anticorpo” ou “imunoglobulina”, utilizados de forma intercambiável no presente, incluem anticorpos completos e qualquer fragmento de ligação de抗ígenos ou suas cadeias isoladas. Um anticorpo típico compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia

pesada é compreendida por uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável de cadeia leve (V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida por um domínio, CL. Um exemplo de unidade estrutural de imunoglobulina (anticorpo) comprehende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeos, em que cada par possui uma cadeia “leve” (cerca de 25 kDa) e uma cadeia “pesada” (cerca de 50-70 kDa). O terminal N de cada cadeia define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos que é principalmente responsável pelo reconhecimento de抗原s. As expressões cadeia leve variável (V_L) e cadeia pesada variável (V_H) designam essas cadeias leve e pesada, respectivamente. Os domínios constantes de cadeia pesada correspondentes às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados “alfa”, “delta”, “épsilon”, “gama” e “mu”, respectivamente. Vários destes são adicionalmente divididos em subclasses ou isótipos, tais como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e similares. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. IgGs são exemplos de classes de anticorpos empregados no presente, pois são os anticorpos mais comuns na situação fisiológica e são mais facilmente preparados em ambiente de laboratório. Opcionalmente, o anticorpo é anticorpo monoclonal. Exemplos específicos de anticorpos são anticorpos humanizados, quiméricos, humanos ou apropriados para seres humanos de outra forma. “Anticorpos” também inclui qualquer fragmento ou derivado de qualquer um dos anticorpos descritos no presente.

[00108] Anticorpo anti-Siglec com “reação cruzada” é um anticorpo que liga mais de uma molécula de Siglec com especificidade e/ou

afinidade. Anticorpos monoclonais podem, por exemplo, sofrer reação cruzada com Siglec-7 e Siglec-9.

[00109] A expressão “liga-se especificamente a” indica que um anticorpo pode ligar-se preferencialmente em um teste de ligação competitiva ao parceiro de ligação, tal como Siglec-7 e Siglec-9, conforme determinado utilizando-se formas recombinantes das proteínas, seus epítopos ou proteínas nativas presentes sobre a superfície de células alvo isoladas. Testes de ligação competitiva e outros métodos de determinação de ligação específica são adicionalmente descritos abaixo e bem conhecidos na técnica.

[00110] Quando se afirmar que um anticorpo “concorre com” um anticorpo monoclonal específico, indica-se que o anticorpo concorre com o anticorpo monoclonal em um teste de ligação utilizando moléculas Siglec recombinantes ou moléculas Siglec expressas na superfície. Caso um anticorpo de teste reduza a ligação de um anticorpo de referência a um polipeptídeo Siglec ou célula que expressa Siglec em um teste de ligação, por exemplo, afirma-se que o anticorpo “concorre”, respectivamente, com o anticorpo de referência.

[00111] O termo “afinidade”, da forma utilizada no presente, indica a força da ligação de um anticorpo a um epítopo. A afinidade de um anticorpo é fornecida pela constante de dissociação Kd, definida como $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, em que $[Ab-Ag]$ é a concentração molar do complexo de anticorpo e antígeno, $[Ab]$ é a concentração molar do anticorpo não ligado e $[Ag]$ é a concentração molar do anticorpo não ligado. A constante de afinidade K_a é definida por $1/K_d$. Métodos de determinação da afinidade de mAbs podem ser encontrados em Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1988), Coligan et al, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, Nova Iorque (1992, 1993) e Muller, *Meth. Enzymol.* 92: 589-601

(1983) e essas referências são integralmente incorporadas ao presente como referência. Um método padrão bem conhecido na técnica para determinar a afinidade de mAbs é o uso de seleção por ressonância de plasma da superfície (SPR) (tal como por meio de análise com um dispositivo analítico SPR BIACore®).

[00112] Dentro do contexto do presente, “determinante” designa um local de interação ou ligação sobre um polipeptídeo.

[00113] O termo “epítopo” designa um determinante antigênico e é a área ou região sobre um antígeno à qual se liga um anticorpo. Um epítopo de proteína pode compreender resíduos de aminoácidos envolvidos diretamente na ligação, bem como resíduos de aminoácidos que são efetivamente bloqueados pelo peptídeo ou anticorpo de ligação de抗ígenos específico, ou seja, resíduos de aminoácidos dentro da “pegada” do anticorpo. É a forma mais simples ou a menor área estrutural em uma molécula de antígeno de complexo que pode combinar-se, por exemplo, com um anticorpo ou receptor. Os epítopos podem ser lineares ou estruturais/de conformação. A expressão “epítopo linear” é definida como um epítopo composto de resíduos de aminoácidos que são contíguos sobre a sequência linear de aminoácidos (estrutura primária). A expressão “epítopo estrutural ou de conformação” é definida como um epítopo composto de resíduos de aminoácidos que não são todos contíguos e, portanto, representam partes separadas da sequência linear de aminoácidos que são colocadas em proximidade entre si por meio de dobra da molécula (estruturas secundárias, terciárias e/ou quaternárias). O epítopo de conformação é dependente da estrutura tridimensional. A expressão “de conformação” é, portanto, frequentemente utilizada de forma intercambiável com “estrutural”.

[00114] O termo “esgotar” ou “esgotamento”, com relação a células que expressam Siglec (por exemplo, linfócitos que expressam Siglec-7

ou Siglec-9) indica um processo, método ou composto que resulta na morte, eliminação, lise ou indução dessa morte, eliminação ou lise, de forma a prejudicar a quantidade dessas células que expressam Siglec presentes em amostras ou em pacientes. “Não esgotador”, com referência a um processo, método ou composto, indica que o processo, método ou composto não é esgotador.

[00115] O termo “agente” é utilizado no presente para indicar um composto químico, mistura de compostos químicos, macromolécula biológica ou extrato feito de materiais biológicos. A expressão “agente terapêutico” indica um agente que possui atividade biológica.

[00116] Para os propósitos do presente, anticorpo “humano” ou “humanizado” indica um anticorpo no qual a região de cadeia principal constante e variável de uma ou mais imunoglobulinas humanas é fundida com a região de ligação, tal como a CDR, de imunoglobulina animal. Esses anticorpos são projetados para manter a especificidade de ligação do anticorpo não humano do qual são derivadas as regiões de ligação, mas para evitar reação imunológica contra o anticorpo não humano. Esses anticorpos podem ser obtidos a partir de camundongos transgênicos ou outros animais que tenham sido “elaborados” para produzir anticorpos humanos específicos em resposta a desafio antigênico (vide, por exemplo, Green et al (1994), *Nature Genet.* 7: 13; Lonberg et al (1994), *Nature* 368: 856; Taylor et al (1994), *Int. Immun.* 6: 579, cujos ensinamentos completos são incorporados ao presente como referência). Anticorpos totalmente humanos podem também ser construídos por meio de métodos de transfecção genética ou cromossômica, bem como tecnologia de exibição de fagos, todos os quais são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, McCafferty et al (1990), *Nature* 348: 552-553). Anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 5.567.610 e 5.229.275,

que são integralmente incorporadas ao presente como referência).

[00117] “Anticorpo quimérico” é uma molécula de anticorpo na qual (a) a região constante ou uma de suas partes é alterada, substituída ou trocada, de forma que o local de ligação de antígenos (região variável) seja ligado a uma região constante com classe, função efetora e/ou espécie alterada ou uma molécula totalmente diferente que fornece novas propriedades ao anticorpo quimérico, tal como uma enzima, toxina, hormônio, fator de crescimento, droga etc.; ou (b) a região variável ou uma de suas partes é alterada, substituída ou trocada por uma região variável que possui especificidade de antígeno diferente ou alterada.

[00118] A expressão “região hipervariável”, quando utilizada no presente, indica os resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígenos. A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácidos de uma “região de determinação da complementaridade” ou “CDR” (por exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat et al, 1991) e/ou os resíduos de um “circuito hipervariável” (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987; 196: 901-917) ou um sistema similar para determinar aminoácidos essenciais responsáveis pela ligação de antígenos. Tipicamente, a numeração de resíduos de aminoácidos nessa região é realizada por meio do método descrito em Kabat et al, acima. Expressões como “posição de Kabat”, “numeração de resíduos de domínio variável como em Kabat” e “de acordo com Kabat” no presente indicam este sistema de numeração para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve. Utilizando o sistema de numeração de Kabat, a sequência de aminoácidos linear real de um

peptídeo pode conter mais ou menos aminoácidos correspondentes à inserção ou redução de FR ou CDR do domínio variável. Domínio variável de cadeia pesada pode incluir, por exemplo, um único inserto de aminoácido (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de CDR H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b, 82c etc. de acordo com Kabat) após o resíduo FR de cadeia pesada 82. A numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para um dado anticorpo por meio de alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat “padrão”.

[00119] Resíduos de “cadeia principal” ou “FR”, da forma utilizada no presente, indicam a região de um domínio variável de anticorpo exclusiva das regiões definidas como CDRs. Cada cadeia principal de domínio variável de anticorpo pode ser adicionalmente subdividida nas regiões contíguas separadas pelas CDRs (FR1, FR2, FR3 e FR4).

[00120] As expressões “domínio Fc”, “porção Fc” e "região Fc" designam um fragmento C-terminal de uma cadeia pesada de anticorpo, por exemplo, cerca do aminoácido (aa) 230 até cerca de aa 450 de cadeia pesada γ (gama) humana ou sua sequência correspondente em outros tipos de cadeias pesadas de anticorpos (por exemplo, α, δ, ε e μ para anticorpos humanos) ou um de seus alótipos de ocorrência natural. A menos que especificado em contrário, a numeração de aminoácidos de Kabat comumente aceita para imunoglobulinas é utilizada ao longo de todo o presente relatório descritivo (vide Kabat et al (1991), *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5^a ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda MD).

[00121] As expressões “isolado”, “purificado” ou “biologicamente puro” designam material que é substancial ou essencialmente livre de componentes que normalmente o acompanham conforme encontrado no seu estado nativo. A pureza e a homogeneidade são tipicamente determinadas

utilizando-se métodos de química analítica, tais como eletroforese de gel de poliacrilamida ou cromatografia de líquidos de alto desempenho. Uma proteína que é a espécie predominante presente em uma preparação é substancialmente purificada.

[00122] Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo” e “proteína” são utilizados de forma intercambiável no presente para designar um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos aplicam-se a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são imitação química artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como polímeros de aminoácidos de ocorrência natural e polímeros de aminoácidos não de ocorrência natural.

[00123] O termo “recombinante”, quando utilizado com referência, por exemplo, a uma célula, ácido nucleico, proteína ou vetor, indica que a célula, ácido nucleico, proteína ou vetor foi modificada pela introdução de uma proteína ou ácido nucleico heterólogo ou pela alteração de uma proteína ou ácido nucleico nativo, ou que a célula é derivada de uma célula modificada desta forma. Células recombinantes, por exemplo, expressam, portanto, genes que não são encontrados dentro da forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos que, de outra forma, são expressos de forma anormal, subexpressos ou não são expressos.

[00124] Dentro do contexto do presente, o termo anticorpo que “liga” um polipeptídeo ou epítopo designa um anticorpo que liga o mencionado determinante com afinidade e/ou especificidade.

[00125] O termo “identidade” ou “idêntico”, quando utilizado em relação entre as sequências de dois ou mais polipeptídeos, designa o grau de relação de sequências entre polipeptídeos, conforme determinado pela quantidade de coincidências entre conjuntos de dois ou mais resíduos de aminoácidos. “Identidade” mede o percentual de coincidências idênticas entre a

menor dentre duas ou mais sequências com alinhamentos de intervalos (se houver) abordados por um modelo matemático ou programa de computador específico (ou seja, “algoritmos”). A identidade de polipeptídeos relacionados pode ser facilmente calculada por meio de métodos conhecidos. Esses métodos incluem, mas sem limitações, os descritos em *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nova Iorque, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte 1, Griffin, A. M. e Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nova Jérsei, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nova Iorque, 1991; e Carillo et al, *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

[00126] Métodos de determinação da identidade são projetados para fornecer a maior coincidência entre as sequências testadas. Métodos de determinação da identidade são descritos em programas de computador disponíveis ao público. Métodos de programas de computador para determinar a identidade entre duas sequências incluem o pacote de programas GCG, que inclui GAP (Devereux et al, *Nucl. Acid Res.* 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul et al, *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). O programa BLASTX é disponível ao público por meio do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e outras fontes (*BLAST Manual*, Altschul et al, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al, acima). O conhecido algoritmo de Smith Waterman pode também ser utilizado para determinar a identidade.

PRODUÇÃO DE AGENTES TERAPÊUTICOS

[00127] Agentes que inibem Siglec:

Os agentes anti-Siglec úteis para o tratamento de doenças (por exemplo, câncer e doenças infecciosas) ligam uma porção extracelular da

proteína Siglec-9 humana (e, opcionalmente, ligam adicionalmente a proteína Siglec-7 humana, com ou sem ligação de Siglec-12 adicional) e reduzem a atividade inibidora do Siglec humano expresso sobre a superfície de uma célula imune positiva para Siglec. Em uma realização, o agente inibe a capacidade de uma molécula de ácido siálico de causar sinalização inibidora por Siglec em neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, macrófago M2, célula NK e/ou célula T CD8+.

[00128] Em uma realização, o agente anti-Siglec descrito no presente pode ser utilizado para aumentar a citotoxicidade de células NK e/ou neutrófilos em seres humanos ou de doadores humanos em direção a uma célula alvo (por exemplo, célula de câncer) que contém ligantes de Siglec. Células NK e neutrófilos são granulócitos especializados que reconhecem e matam diretamente micro-organismos e células de câncer. Demonstra-se que ácido siálico expresso na superfície de células de tumores reduz a citotoxicidade de células NK para células de tumores. Os anticorpos podem ser utilizados para aumentar a citotoxicidade de células NK, por exemplo, para restaurar o nível de citotoxicidade para substancialmente a observada em células NK ou neutrófilos que não expressam, na sua superfície, o Siglec específico.

[00129] Ácidos siálicos são também altamente expressos em células dendríticas e descreveu-se que eles modulam diversas funções DC, incluindo capacidade de reação a estímulo de TLR. O bloqueio da síntese de ácido siálico reduz o limite de ativação de moDCs para estímulo de TLR e exclusão de Siglec-E aumentou as reações de células dendríticas a diversos ligantes de TLR microbianos. Siglec-9 é o membro ortólogo humano mais próximo de Siglec-E em camundongos, o bloqueio de anticorpos anti-Siglec-9 pode ampliar a ativação de células dendríticas e modular interações de DC-T. A modificação de抗ígenos com ácidos siálicos regula a geração de células T

reguladoras (Treg) específicas de抗ígenos e evita a formação de células T CD4+ e CD8+ efetoras por meio de células dendríticas. A capacidade fagocítica de células dendríticas pode ser também aprimorada por deficiência de ácido 2,6-sialico.

[00130] Siglec-7 e 9 são ambos expressos em macrófagos tipo M1 e M2 e descreveu-se que knockdown de Siglec-9 modula diversos marcadores da expressão na superfície (por exemplo, CCR7 e CD200R), o que sugere modulação das funções de macrófagos por Siglec-9. De fato, diversos mutantes de Siglec-9 (mutação no domínio ITIM) foram transfectados em linhagem de células de macrófagos e demonstrou-se que Siglec-9 aumenta a produção da citoquina anti-inflamatória IL-10. A ligação de Siglec-9 com um ligante solúvel pode também induzir macrófagos a induzir fenótipo similar a macrófago associado a tumor, com maior expressão do ligante de ponto de verificação PD-L1.

[00131] Em uma realização, o agente concorre com uma molécula de ácido siálico na ligação a Siglec, ou seja, o agente bloqueia a interação entre Siglec e um de seus ligantes de ácido siálico.

[00132] Em um aspecto da presente invenção, o agente é um anticorpo selecionado a partir de um anticorpo com comprimento total, fragmento de anticorpo e uma molécula derivada de anticorpo sintético ou semissintético.

[00133] Em um aspecto da presente invenção, o agente é um anticorpo selecionado a partir de um anticorpo totalmente humano, anticorpo humanizado e anticorpo quimérico.

[00134] Em um aspecto da presente invenção, o agente é um fragmento de anticorpo selecionado a partir de anticorpo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM.

[00135] Em um aspecto da presente invenção, o agente é

um fragmento de anticorpo que compreende um domínio constante selecionado a partir de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

[00136] Em um aspecto da presente invenção, o agente é um fragmento de anticorpo selecionado a partir de um fragmento de Fab, fragmento de Fab', fragmento de Fab'-SH, fragmento de F(ab)2, fragmento de F(ab')2, fragmento de Fv, Ig de cadeia pesada (Ig de camelo ou lhama), fragmento de V_{HH}, FV de domínio simples e fragmento de anticorpo de fita simples.

[00137] Em um aspecto da presente invenção, o agente é uma molécula derivada de anticorpo sintético ou semissintético selecionada a partir de scFv, dsFv, minicorpo, diacorpo, triacorpo, corpo capa e IgNAR; e anticorpo multiespecífico.

[00138] Em um aspecto, o anticorpo ou domínio de ligação de抗ígenos liga-se a Siglec-7 e/ou 9 com afinidade de ligação (por exemplo, KD) pelo menos 100 vezes menor que Siglec humano adicional, tal como Siglec-3, 5, 6, 8, 10, 11 e/ou 12. Em um aspecto, o anticorpo ou domínio de ligação de抗ígenos liga-se a Siglec-9, mas não a Siglec-7; em uma realização, o anticorpo liga-se a um polipeptídeo Siglec-9 humano com afinidade de ligação (por exemplo, KD) pelo menos 100 vezes menor que polipeptídeo Siglec-7 humano. Em outro aspecto, o anticorpo liga-se a um polipeptídeo Siglec-9 humano e a polipeptídeo Siglec-7 humano com afinidade de ligação (por exemplo, KD) que difere em não mais de 1 log entre si e as afinidades de ligação para o mencionado Siglec-7 e Siglec-9 são pelo menos 100 vezes menores que Siglec humano adicional, tal como Siglec-3, 5, 6, 8, 10, 11 e/ou 12. Pode-se determinar a afinidade, por exemplo, por meio de Ressonância de Plasma de Superfície, para ligação a polipeptídeos Siglec recombinantes.

[00139] Em um aspecto, o anticorpo encontra-se em forma

purificada ou ao menos parcialmente purificada. Em um aspecto da presente invenção, o anticorpo encontra-se em forma essencialmente isolada.

[00140] Os anticorpos podem ser produzidos por meio de uma série de métodos conhecidos na técnica. Tipicamente, eles são produzidos por meio de imunização de animais não humanos, preferencialmente camundongos, com um imunogene que compreende um polipeptídeo Siglec, preferencialmente polipeptídeo Siglec humano. O polipeptídeo Siglec pode compreender a sequência com comprimento total de polipeptídeo Siglec-9 e/ou Siglec-7 humano ou um de seus fragmentos ou derivados, tipicamente um fragmento imunogênico, ou seja, uma parte do polipeptídeo que compreende um epítopo exposto sobre a superfície de células que expressam um polipeptídeo Siglec. Esses fragmentos contêm tipicamente pelo menos cerca de sete aminoácidos consecutivos da sequência de polipeptídeos madura e, de preferência ainda maior, pelo menos cerca de dez aminoácidos consecutivos. Os fragmentos são tipicamente derivados essencialmente do domínio extracelular do receptor. Em uma realização, o imunogene compreende um polipeptídeo Siglec humano do tipo selvagem em uma membrana de lipídios, tipicamente na superfície de uma célula. Em realização específica, o imunogene compreende células intactas, particularmente células humanas intactas, opcionalmente tratadas ou lisadas. Em outra realização, o polipeptídeo é um polipeptídeo Siglec recombinante.

[00141] A etapa de imunização de mamíferos não humanos com um antígeno pode ser conduzida de qualquer forma bem conhecida na técnica para estimular a produção de anticorpos em camundongos (vide, por exemplo, E. Harlow e D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), cuja descrição completa é incorporada ao presente como referência). O imunogene é suspenso ou dissolvido em tampão, opcionalmente com um adjuvante, tal

como adjuvante de Freund completo ou incompleto. Métodos de determinação da quantidade de imunogene, tipos de tampões e quantidades de adjuvante são bem conhecidos pelos técnicos no assunto e não são limitados de nenhuma forma. Esses parâmetros podem ser diferentes para diferentes imunogenes, mas são facilmente elucidados.

[00142] De forma similar, o local e a frequência de imunização suficientes para estimular a produção de anticorpos também são bem conhecidos na técnica. Em protocolos de imunização típicos, os animais não humanos recebem injeção intraperitoneal com antígeno no dia 1 e novamente cerca de uma semana mais tarde. Isso é seguido por injeções adicionais do antígeno perto do dia 20, opcionalmente com um adjuvante tal como adjuvante de Freund incompleto. As injeções adicionais são realizadas por via intravenosa e podem ser repetidas por vários dias consecutivos. Isso é seguido por uma injeção impulsora no dia 40, por via intravenosa ou intraperitoneal, tipicamente sem adjuvante. Este protocolo resulta na produção de células B produtoras de anticorpos específicos de抗原s após cerca de 40 dias. Outros protocolos podem também ser utilizados, desde que resultem na produção de células B que expressam anticorpos dirigidos ao antígeno utilizado na imunização.

[00143] Em realização alternativa, linfócitos de mamíferos não humanos não imunizados são isolados, cultivados *in vitro* e expostos em seguida ao imunogene em cultivo celular. Os linfócitos são colhidos em seguida e é conduzida a etapa de fusão descrita abaixo.

[00144] Para anticorpos monoclonais, a etapa seguinte é o isolamento de esplenócitos do mamífero não humano imunizado e fusão subsequente desses esplenócitos com células imortalizadas, a fim de formar um hibridoma produtor de anticorpos. O isolamento de esplenócitos a partir de mamíferos não humanos é bem conhecido na técnica e envolve tipicamente a

remoção do baço de mamíferos não humanos anestesiados, seu corte em pequenos pedaços e compressão dos esplenócitos da cápsula esplênica através de uma tela de nylon de um coador celular para um tampão apropriado, de forma a produzir uma suspensão de células isoladas. As células são lavadas, centrifugadas e novamente suspensas em um tampão que lise quaisquer glóbulos vermelhos do sangue. A solução é novamente centrifugada e os linfócitos remanescentes na pelota são finalmente suspensos novamente em tampão novo.

[00145] Após isolamento e presença em suspensão de células isoladas, os linfócitos podem ser fundidos a uma linhagem celular imortal. Esta é tipicamente uma linhagem de células de mieloma de camundongos, embora várias outras linhagens celulares imortais úteis para a criação de hibridomas sejam conhecidas na técnica. Linhagens de mieloma murino incluem, mas sem limitações, as derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis por meio do Centro de Distribuição de Células do Instituto Salk, San Diego, Estados Unidos, e células X63 Ag8653 e SP-2 disponíveis por meio da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos, Rockville, Maryland, Estados Unidos. A fusão é realizada utilizando-se polietileno glicol ou similares. Os hibridomas resultantes são cultivados em seguida em meios de cultivo que contêm uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Caso as células de mieloma parentais não contenham a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPRT ou HGPRT), por exemplo, o meio de cultivo para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

[00146] Hibridomas são tipicamente cultivados sobre uma camada alimentadora de macrófagos. Os macrófagos são preferencialmente de

ninhadas do mamífero não humano utilizado para isolar esplenócitos e tipicamente recebem primer de adjuvante de Freund incompleto ou similar vários dias antes da colocação dos hibridomas em placas. Métodos de fusão são descritos em Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986), cujo relatório descriptivo é incorporado ao presente como referência.

[00147] As células são mantidas em crescimento nos meios de seleção por tempo suficiente para a formação de colônias e produção de anticorpos. Isso normalmente ocorre entre cerca de 7 e cerca de 14 dias.

[00148] As colônias de hibridomas são testadas em seguida para determinar a produção de anticorpos que se ligam especificamente a produtos genéticos de polipeptídeos Siglec. O teste é tipicamente um teste do tipo ELISA colorimétrico, embora possa ser empregado qualquer teste que possa ser adaptado às cavidades nas quais os hibridomas estão crescendo. Outros testes incluem radioimunotestes ou seleção celular ativada por fluorescência. As cavidades positivas para a produção de anticorpos desejada são examinadas para determinar se uma ou mais colônias distintas estão presentes. Caso mais de uma colônia esteja presente, as células podem ser novamente clonadas e cultivadas para garantir que uma única célula tenha gerado a colônia produtora do anticorpo desejado. Tipicamente, os anticorpos serão também testados para determinar a capacidade de ligação a polipeptídeos Siglec, tais como células que expressam Siglec.

[00149] Hibridomas que são confirmados para produzir anticorpos monoclonais podem ser cultivados em quantidades maiores em meio apropriado, tal como DMEM ou RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores de ascite em animais.

[00150] Após crescimento suficiente para produzir o

anticorpo monoclonal desejado, os meios de crescimento que contêm anticorpo monoclonal (ou o fluido de ascite) são separados das células e o anticorpo monoclonal neles presente é purificado. Atinge-se tipicamente purificação por meio de eletroforese de gel, diálise, cromatografia utilizando proteína A ou proteína G-Sepharose ou Ig anticomundongo ligado a um suporte sólido tal como esferas de Sepharose ou agarose (todos descritos, por exemplo, em *Antibody Purification Handbook, Biosciences*, publicação nº 18-1037-46, Edição AC, cuja descrição é incorporada ao presente como referência). O anticorpo ligado sofre tipicamente eluição de colunas de proteína A/proteína G, utilizando tampões de baixo pH (tampões de acetato ou glicina com pH 3,0 ou menos) com neutralização imediata de frações que contêm anticorpos. Essas frações são reunidas, sofrem diálise e são concentradas conforme o necessário.

[00151] Cavidades positivas com uma única colônia aparente são tipicamente clonadas novamente e novamente testadas para garantir que um único anticorpo monoclonal seja detectado e produzido.

[00152] Anticorpos podem ser também produzidos por meio da seleção de bibliotecas combinatórias de imunoglobulinas, conforme descrito, por exemplo, em Ward et al, *Nature*, 341 (1989), pág. 544, cujo relatório descritivo é integralmente incorporado ao presente como referência.

[00153] Anticorpos podem ser titulados sobre Siglecs para determinar a concentração necessária para atingir ligação máxima a um polipeptídeo Siglec. “EC50”, com relação à ligação a um polipeptídeo Siglec (ou célula que o expressa), designa a concentração eficiente de anticorpo anti-Siglec que produz 50% da sua reação máxima ou efeito com relação à ligação a um polipeptídeo Siglec (ou célula que o expressa).

[00154] Após a identificação de anticorpos que são capazes de ligar Siglec e/ou possuem outras propriedades desejadas, eles também serão tipicamente determinados utilizando métodos padrão que incluem os

descritos no presente, pela sua capacidade de ligação a outros polipeptídeos, incluindo outros polipeptídeos Siglec e/ou polipeptídeos não relacionados. Idealmente, os anticorpos ligam-se apenas com afinidade substancial a Siglec, tal como Siglec-7 humano e/ou Siglec-9 humano, e não se ligam em nível significativo a polipeptídeos não relacionados, especialmente polipeptídeos diferentes de Sigecls relativos a CD33 ou Sigecls diferentes dos Sigecls desejados (por exemplo, Siglec-7 e/ou Siglec-9). Apreciar-se-á, entretanto, que, desde que a afinidade para Siglec seja substancialmente maior (por exemplo, 5x, 10x, 50x, 100x, 500x, 1000x, 10.000x ou mais) que para outros Sigecls e/ou outros polipeptídeos não relacionados, os anticorpos são apropriados para uso nos métodos de acordo com o presente.

[00155] Os anticorpos anti-Siglec podem ser preparados como anticorpos não esgotadores, de forma que possuam ligação específica a receptores de Fc humanos reduzida ou substancialmente inexistente. Esses anticorpos podem compreender regiões constantes de diversas cadeias pesadas que conhecidamente não se ligam ou possuem baixa afinidade de ligação a receptores de Fc. Um desses exemplos é uma região constante de IgG4 humano. Alternativamente, fragmentos de anticorpos que não compreendem regiões constantes, tais como fragmentos de Fab ou F(ab')2, podem ser utilizados para evitar a ligação de receptores de Fc. Pode-se determinar a ligação de receptores de Fc de acordo com métodos conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ligação de teste de um anticorpo a proteína receptora de Fc em um teste BIACORE. Além disso, pode-se utilizar qualquer isótipo de anticorpo no qual a porção Fc é modificada para minimizar ou eliminar a ligação a receptores de Fc (vide, por exemplo, WO 03/101485, cujo relatório descritivo é incorporado ao presente como referência). Testes como os testes baseados em células para determinar a ligação de receptores de Fc, por exemplo, são bem conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em WO

03/101485.

[00156] O DNA que codifica um anticorpo que liga um epítopo presente sobre polipeptídeos Siglec é isolado a partir de hibridoma e colocado em um vetor de expressão apropriado para transfecção para um hospedeiro apropriado. O hospedeiro é utilizado em seguida para produção recombinante do anticorpo ou suas variantes, tais como versão humanizada daquele anticorpo monoclonal, fragmentos ativos do anticorpo, anticorpos quiméricos que compreendem a parte de reconhecimento de抗ígenos do anticorpo ou versões que compreendem uma porção detectável.

[00157] O DNA codificador de anticorpos monoclonais pode ser facilmente isolado e sequenciado utilizando-se procedimentos convencionais (empregando-se, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que sejam capazes de ligar-se especificamente a genes codificadores das cadeias leve e pesada de anticorpos murinos). Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfetados em seguida para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Conforme descrito em outros pontos do presente relatório descriptivo, essas sequências de DNA podem ser modificadas para qualquer um dentre um grande número de propósitos, tal como para humanização de anticorpos, produção de fragmentos ou derivados ou para modificar a sequência do anticorpo, por exemplo, no local de ligação de抗ígenos, a fim de otimizar a especificidade de ligação do anticorpo. Expressão recombinante em bactérias de DNA que codificam o anticorpo é bem conhecida na técnica (vide, por exemplo, Skerra et al, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5, pág. 256 (1993); e Plückthun, *Immunol.* 130, pág. 151 (1992)).

[00158] “Determinante comum” designa um determinante ou epítopo que é compartilhado por diversos produtos genéticos dos receptores Siglec inibidores humanos, notadamente dos Siglecs relativos a CD33. Anticorpos podem ligar um determinante comum compartilhado por pelo menos Siglec-7 e Siglec-9. Em uma realização, o determinante comum pode estar opcionalmente ausente em um ou mais, ou em todos os Siglecs relativos a CD33, particularmente Siglecs-3, 5, 6, 8, 10, 11 e 12. Em uma realização, o determinante comum é ausente em Siglecs-3, 5, 6, 8, 10, 11 e 12.

[00159] A identificação de um ou mais anticorpos que se ligam a polipeptídeos Siglec (por exemplo, Siglec-7 e/ou Siglec-9, particularmente de forma substancial ou essencialmente o mesmo epítopo do anticorpo monoclonal mAbsA, B, C, D, E ou F (específico de Siglec-9) ou mAbs1, 2, 3, 4, 5 ou 6 (específico de Siglec-7/9), pode ser facilmente determinado utilizando-se qualquer um dentre uma série de testes de seleção imunológica nos quais pode ser determinada a competição de anticorpos. Muitos desses testes são praticados rotineiramente e bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 5.660.827, que é incorporada ao presente como referência). Compreender-se-á que a determinação real do epítopo ao qual se liga um anticorpo descrito no presente não é necessária, de nenhuma forma, para identificar um anticorpo que se liga o mesmo ou substancialmente ao mesmo epítopo do anticorpo monoclonal descrito no presente.

[00160] Quando os anticorpos de teste a serem examinados forem obtidos de animais fonte diferentes, por exemplo, ou forem mesmo de isótipo Ig diferente, pode ser empregado um teste de competição simples no qual os anticorpos de controle (por exemplo, mAbA, B, C, D, E ou F, ou mAb1, 2, 3, 4, 5 ou 6) e de teste são misturados (ou previamente adsorvidos) e aplicados a uma amostra que contém polipeptídeos Siglec. Protocolos com

base em Western Blot e o uso de análise BIACORE são apropriados para uso nesses estudos de competição.

[00161] Em certas realizações, os anticorpos controle (por exemplo, mAbA, B, C, D, E ou F, ou mAb1, 2, 3, 4, 5 ou 6) são previamente misturados com quantidades variáveis dos anticorpos de teste (por exemplo, cerca de 1:10 ou cerca de 1:100) por um período de tempo antes da aplicação à amostra de antígeno Siglec. Em outras realizações, o controle e quantidades variáveis de anticorpos de teste podem ser simplesmente misturados durante a exposição à amostra de antígeno Siglec. Desde que se possa diferenciar anticorpos livres de ligados (utilizando-se, por exemplo, métodos de lavagem ou separação para eliminar anticorpos não ligados) e mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos anticorpos de teste (utilizando-se, por exemplo, anticorpos secundários específicos de espécies ou específicos de isótipos ou por meio de marcação específica de mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 com marca detectável), pode-se determinar se os anticorpos de teste reduzem a ligação de mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aos抗ígenos, o que indica que o anticorpo de teste concorre pela ligação e/ou reconhece um local de ligação comum em um Siglec como mAb1, mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. A ligação dos anticorpos controle (marcados) na ausência de anticorpo totalmente irrelevante pode servir de alto valor controle. O baixo valor controle pode ser obtido por meio de incubação dos anticorpos marcados (mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) com anticorpos não marcados exatamente do mesmo tipo (mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6), em que ocorrerá competição que reduzirá a ligação dos anticorpos marcados. Em um teste, redução significativa da capacidade de reação de anticorpos marcados na presença de anticorpo de teste indica anticorpo de teste que reconhece substancialmente a mesma região em um Siglec e que apresenta “reação cruzada” ou concorre com o anticorpo marcado (mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6). Qualquer anticorpo

de teste que reduz a ligação de mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 a antígenos Siglec em pelo menos cerca de 50%, tal como pelo menos cerca de 60% ou, de maior preferência, pelo menos cerca de 80% ou 90% (por exemplo, cerca de 65-100%), em qualquer razão de mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6:anticorpo de teste de cerca de 1:10 a cerca de 1:100, é considerado anticorpo que concorre com mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 correspondente. Preferencialmente, esse anticorpo de teste reduzirá a ligação do mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 correspondente ao antígeno de Siglec em pelo menos cerca de 90% (por exemplo, cerca de 95%).

[00162] A competição pode ser também determinada, por exemplo, por meio de um teste de citometria de fluxo. Nesse teste, células que possuem um ou mais dados polipeptídeos Siglec podem ser incubadas em primeiro lugar com mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, por exemplo, e, em seguida, com o anticorpo de teste marcado com fluorocromo ou biotina. Afirma-se que o anticorpo concorre com mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 se a ligação obtida mediante incubação prévia com quantidade de saturação de mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 é de cerca de 80%, preferencialmente cerca de 50%, cerca de 40% ou menos (por exemplo, cerca de 30%, 20% ou 10%) da ligação (conforme medido por meio de fluorescência) obtida pelo anticorpo sem incubação prévia com o mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 correspondente. Alternativamente, afirma-se que o anticorpo concorre com mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 se a ligação obtida com um anticorpo mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 marcado correspondente (por fluorocromo ou biotina) sobre células previamente incubadas com quantidade saturadora de anticorpo de teste for de cerca de 80%, preferencialmente cerca de 50%, cerca de 40% ou menos (por exemplo, cerca de 30%, 20% ou 10%) da ligação obtida sem incubação prévia com o anticorpo de teste.

[00163] Pode-se também empregar um teste de competição

simples no qual um anticorpo de teste é previamente adsorvido e aplicado sob concentração de saturação a uma superfície sobre a qual um antígeno Siglec é immobilizado. A superfície no teste de competição simples é preferencialmente um chip BIACORE (ou outro meio apropriado para análise de ressonância de plasma da superfície). O anticorpo controle (por exemplo, mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) é então colocado em contato com a superfície em concentração de saturação de Siglec e é medida a ligação de superfície e Siglec do anticorpo controle. Essa ligação do anticorpo controle é comparada com a ligação do anticorpo controle à superfície que contém Siglec na ausência de anticorpo de teste. Em um teste, redução significativa da ligação da superfície que contém Siglec pelo anticorpo controle na presença de anticorpo de teste indica que o anticorpo de teste concorre pela ligação e, portanto, pode reconhecer a mesma região em um Siglec do anticorpo controle, de forma que o anticorpo de teste apresente “reação cruzada” com o anticorpo controle. Qualquer anticorpo de teste que reduza a ligação de anticorpo controle (tal como mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) a um antígeno Siglec em pelo menos cerca de 30% ou mais, preferencialmente cerca de 40%, pode ser considerado anticorpo que concorre pela ligação a Siglec como controle (por exemplo, mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 correspondente). Preferencialmente, esse anticorpo de teste reduzirá a ligação do anticorpo controle (por exemplo, mAbA, B, C, D, E, F, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) ao antígeno Siglec em pelo menos cerca de 50% (por exemplo, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70% ou mais). Apreciar-se-á que a ordem de anticorpos controle e de teste pode ser invertida: ou seja, o anticorpo controle pode ser ligado em primeiro lugar à superfície e o anticorpo de teste é colocado em contato com a superfície em seguida, em um teste de competição. Preferencialmente, o anticorpo que possui afinidade mais alta para o antígeno Siglec é ligado em primeiro lugar à superfície, pois se esperará que a redução

da ligação observada para o segundo anticorpo (considerando que os anticorpos apresentem reação cruzada) será de maior magnitude. Exemplos adicionais desses testes são fornecidos, por exemplo, em Saunal (1995), *J. Immunol. Methods* 183: 33-41, cuja descrição é incorporada ao presente como referência.

[00164] A determinação se um anticorpo liga-se dentro de uma região de epítopo pode ser conduzida de formas conhecidas pelos técnicos no assunto. Como exemplo desses métodos de mapeamento/caracterização, pode-se determinar uma região de epítopo para um anticorpo anti-Siglec pela “pegada” do epítopo, utilizando-se modificação química das aminas/carboxilas expostas na proteína Siglec. Um exemplo específico desse método de pegada é o uso de HXMS (substituição de hidrogênio-deutério detectada por meio de espectrometria de massa), em que ocorre a substituição de hidrogênio/deutério de prótons de amida de proteína ligante e receptor, ligação e retrosubstituição e os grupos amida da cadeia principal que participam da ligação de proteínas são protegidos contra retrosubstituição e, portanto, permanecerão deuterados. Regiões relevantes podem ser identificadas neste ponto por meio de proteólise péptica, rápida separação por cromatografia de líquidos de alto desempenho de micro-orifícios e/ou espectrometria de massa de ionização por eletropulverização. Vide, por exemplo, Ehring, H., *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2), págs. 252-259 (1999), Engen, J. R. e Smith, D. L. (2001), *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Outro exemplo de método de identificação de epítopos apropriado é o mapeamento de epítopos por ressonância magnética nuclear (NMR), em que são tipicamente comparadas a posição dos sinais em espectros NMR bidimensionais do antígeno livre e do antígeno em complexo com o peptídeo de ligação de抗ígenos, tal como anticorpo. O antígeno é tipicamente marcado isotopicamente de forma seletiva com ^{15}N , de forma que apenas sinais

correspondentes ao antígeno e nenhum sinal do peptídeo de ligação de antígenos sejam observados no espectro NMR. Sinais de antígenos originários de aminoácidos envolvidos na interação com o peptídeo de ligação de antígenos tipicamente alterarão posições no espectro do complexo em comparação com o espectro do antígeno livre e os aminoácidos envolvidos na ligação podem ser identificados desta forma. Vide, por exemplo, *Ernst Chering Res. Found. Workshop*, 2004; (44): 149-67; Huang et al, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1), págs. 61-67 (1998); e Saito e Patterson, *Methods*, junho de 1996; 9 (3): 516-24.

[00165] Pode-se também realizar mapeamento/caracterização de epítopos utilizando-se métodos de espectrometria de massa. Vide, por exemplo, Downard, *J. Mass Spectrom.*, abril de 2000; 35 (4): 493-503 e Kiselar e Downard, *Anal. Chem.*, 1º de maio de 1999; 71 (9): 1792-1801. Métodos de digestão da protease podem também ser úteis no contexto de mapeamento e identificação de epítopos. Sequências/regiões relevantes/determinantes antigênicos podem ser determinadas por meio de digestão de protease, utilizando-se, por exemplo, tripsina em razão de cerca de 1:50 para Siglec ou digestão o/n sob pH 7-8, seguida por análise de espectrometria de massa (MS) para identificação de peptídeos. Os peptídeos protegidos contra divisão de tripsina pelo ligante anti-Siglec podem ser identificados em seguida por meio de comparação de amostras submetidas a digestão de tripsina e amostras incubadas com anticorpos e submetidas em seguida a digestão, por exemplo, por tripsina (de forma a revelar a pegada para o ligante). Outras enzimas como quimotripsina, pepsina etc. podem ser também ou alternativamente utilizadas em métodos de caracterização de epítopos similares. Além disso, digestão enzimática pode fornecer um método rápido de análise se uma potencial sequência determinante antigênica encontra-se dentro de uma região do polipeptídeo

Siglec que não tem a superfície exposta e, consequentemente, muito provavelmente não é relevante em termos de imunogenicidade/antigenicidade.

[00166] Mutagênese dirigida a local é outro método útil para elucidação de epítopos de ligação. Em “varredura de alanina”, por exemplo, cada resíduo dentro de um segmento de proteína é substituído por um resíduo de alanina e as consequências da afinidade de ligação são medidas. Caso a mutação gere redução significativa da afinidade de ligação, ela é mais provavelmente envolvida na ligação. Anticorpos monoclonais específicos para epítopos estruturais (ou seja, anticorpos que não ligam a proteína desdoblada) podem ser utilizados para verificar que a substituição de alanina não influencia a dobra geral da proteína. Vide, por exemplo, Clackson e Wells, *Science* 1995; 267: 383–386; e Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93: 1-6.

[00167] Pode-se também utilizar microscopia eletrônica para “pegadas” de epítopos. Wang et al, *Nature* 1992; 355: 275-278, por exemplo, utilizaram aplicação coordenada de microscopia crioeletrônica, reconstrução de imagens tridimensionais e cristalografia de raio X para determinar a pegada física de um fragmento de Fab sobre a superfície de capsídeo de vírus mosaico do feijão fradinho nativo.

[00168] Outras formas de teste “livre de marcas” para avaliação de epítopos incluem ressonância de plasma da superfície (SPR, BIACORE) e espectroscopia de interferência refletométrica (RiFS). Vide, por exemplo, Fägerstam et al, *Journal of Molecular Recognition* 1990; 3: 208-14; Nice et al, *J. Chromatogr.* 1993; 646: 159–168; Leipert et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37: 3308–3311; Kröger et al, *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17: 937-944.

[00169] Dever-se-á também observar que um anticorpo que liga o mesmo ou substancialmente o mesmo epítopo de um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser identificado em um ou mais dentre

os exemplos de testes de competição descritos no presente.

[00170] Testes de bloqueio cruzado podem ser também utilizados para avaliar se um anticorpo de teste afeta a ligação do ligante ácido siálico natural ou não natural para Siglec humano (por exemplo, Siglec-7 e/ou Siglec-9). Para determinar se uma preparação de anticorpo anti-Siglec humanizado reduz ou bloqueia as interações de Siglec-7 com ácido siálico, pode ser realizado o teste a seguir. Faixa de dosagem de Fab Siglec-9 anti-humano é coincubada por 30 minutos à temperatura ambiente com Siglec-Fc humano (por exemplo, Siglec-7 Fc e/ou Siglec-9 Fc) em dose fixa e adiciona-se em seguida ligante de ácido siálico que expressa linhagens celulares por uma hora. Após lavagem das células por duas vezes em tampão de manchas, anticorpos secundários de fragmentos Fc de IgG anticamundongos de cabra acoplados a PE diluídos em tampão de manchas são adicionados às células e placas são incubadas por 30 minutos adicionais a 4 °C. As células são lavadas por duas vezes e analisadas em um citômetro de fluxo Accury C6 equipado com um leitor de placas HTFC. Na ausência de anticorpos de teste, Siglec-Fc liga-se às células. Na presença de preparação de anticorpos previamente incubada com Siglec-Fc (por exemplo, Siglec-7 Fc e/ou Siglec-9 Fc) que bloqueia a ligação de Siglec a ácido siálico, existe ligação reduzida de Siglec-Fc às células. Apreciar-se-á, entretanto, que a reconstituição da atividade lítica de células NK para células alvo que expressam ligante ácido siálico pode ser determinada diretamente, sem necessidade de determinar o bloqueio da interação Siglec-ligante ácido siálico.

[00171] Opcionalmente, anticorpos podem ser especificados como sendo anticorpos diferentes de qualquer um ou mais dos anticorpos E10-286 (BD Biosciences Corp.), clone 191240, QA79 descrito na Patente Europeia n° 1238282B1 (Moretta et al, Universita degli Studi di Genova) ou Z176 indicado em Falco et al (1999), *J. Exp. Med.* 190: 793-801 ou derivados do

acima, por exemplo, que compreendem a região de ligação de antígenos ou CDRs de cadeia leve e/ou pesada, no todo ou em parte. Opcionalmente, anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser especificados como sendo anticorpos diferentes de um ou mais dentre os anticorpos 3A11, 1H9 e 2B4 descritos no pedido PCT n° PCT/EP2015/070550, depositado em 9 de setembro de 2015 (Innate Pharma). Em outras realizações, os anticorpos mencionados acima podem, dependendo da natureza do anticorpo, ser modificados de forma a possuir as características dos anticorpos de acordo com a presente invenção.

[00172] São fornecidos no presente anticorpos que ligam o domínio extracelular, tal como o domínio conjunto V N-terminal ou o domínio 1 ou 2 tipo C2 similar a Ig de Siglec-9 humano, tais como anticorpos que ligam os epítopos exibidos nos Exemplos do presente.

[00173] Em um aspecto, os anticorpos ligam substancialmente o mesmo epítopo do anticorpo mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F. Em uma realização, os anticorpos ligam-se a um epítopo de Siglec-9 e/ou Siglec-7 que se sobrepõe ao menos parcialmente ou inclui pelo menos um resíduo no epítopo ligado pelo anticorpo mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F. Os resíduos ligados pelo anticorpo podem ser especificados como presentes sobre a superfície do polipeptídeo Siglec-9 e/ou Siglec-7, tal como em um polipeptídeo Siglec-9 ou Siglec-7 expresso sobre a superfície de uma célula. Os resíduos de aminoácidos sobre Siglec-9 e/ou Siglec-7 ligados pelo anticorpo podem ser selecionados, por exemplo, a partir do grupo que consiste dos resíduos relacionados na Tabela 3.

[00174] A ligação de anticorpo anti-Siglec a células transfectadas com mutantes Siglec-9 pode ser medida e comparada com a capacidade de anticorpo anti-Siglec de ligar polipeptídeo Siglec-9 do tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID N° 2). Para anticorpos que ligam

adicionalmente Siglec-7, a ligação de anticorpo anti-Siglec pode ser conduzida, alternativa ou adicionalmente, utilizando-se células transfectadas com mutantes Siglec-7 (por exemplo, da Tabela 3) e comparada com a capacidade de anticorpo anti-Siglec de ligar polipeptídeo Siglec-7 do tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID N° 1). A redução da ligação entre anticorpo anti-Siglec e polipeptídeo Siglec-9 e/ou Siglec-7 mutante (por exemplo, Siglec-9 ou Siglec-7 mutante da Tabela 3) indica que existe redução da afinidade de ligação (por exemplo, conforme medido por meio de métodos conhecidos tais como teste FACS de células que expressam um mutante específico, ou por meio de teste Biacore® (SPR) de ligação a polipeptídeos mutantes) e/ou redução da capacidade de ligação total do anticorpo anti-Siglec (por exemplo, conforme evidenciado por redução de Bmax em plotagem da concentração de anticorpos anti-Siglec em comparação com a concentração de polipeptídeos). Redução significativa da ligação indica que o resíduo que sofreu mutação é diretamente envolvido na ligação ao anticorpo anti-Siglec ou encontra-se em boa proximidade da proteína de ligação quando o anticorpo anti-Siglec for ligado a Siglec-9.

[00175] Em algumas realizações, redução significativa da ligação indica que a capacidade e/ou afinidade de ligação entre um anticorpo anti-Siglec e um polipeptídeo Siglec-9 mutante é reduzida em mais de 40%, mais de 50%, mais de 55%, mais de 60%, mais de 65%, mais de 70%, mais de 75%, mais de 80%, mais de 85%, mais de 90% ou mais de 95% com relação à ligação entre o anticorpo e polipeptídeo Siglec-9 do tipo selvagem. Em certas realizações, a ligação é reduzida abaixo de limites detectáveis. Em algumas realizações, redução significativa da ligação é evidenciada quando a ligação de anticorpo anti-Siglec a um polipeptídeo Siglec-9 mutante for de menos de 50% (por exemplo, menos de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% ou 10%) da ligação observada entre o anticorpo anti-Siglec e um polipeptídeo Siglec-9 do

tipo selvagem.

[00176] Em algumas realizações, são fornecidos anticorpos anti-Siglec que exibem ligação significativamente menor para um polipeptídeo Siglec-9 e/ou Siglec-7 mutante no qual um resíduo em um segmento que compreende um resíduo de aminoácido ligado por anticorpo mAb1, 2, 3, A, B, C, D, E ou F é substituído por um aminoácido diferente. Em uma realização, o mutante é um mutante selecionado a partir de mutantes M6, M8, M9, M10, M11, M15 e M16 da Tabela 3, em comparação com a ligação a um polipeptídeo Siglec do tipo selvagem (por exemplo, o polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2). Em uma realização, o mutante é um mutante selecionado a partir de mutantes M6, M8, M9, M10, M11, M15 e M16 da Tabela 3, em comparação com a ligação a um polipeptídeo Siglec-7 do tipo selvagem (por exemplo, o polipeptídeo de SEQ ID N° 1).

[00177] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um, dois, três, quatro, cinco ou seis dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de N78, P79, A80, R81, A82 e/ou V83 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00178] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um, dois, três ou quatro dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de N77, D96, H98 e/ou T99 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00179] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um, dois, três ou quatro dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de W84, E85, E86 e/ou R88 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00180] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete ou oito dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de

S47, H48, G49, W50, I51, Y52, P53 e/ou G54 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00181] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um ou dois dos resíduos K131 e/ou H132 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00182] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de R63, A66, N67, T68, D69, Q70 e/ou D71 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00183] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-9 humano que compreende um, dois, três, quatro, cinco ou seis dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de P55, H58, E122, G124, S125 e/ou K127 (com referência a SEQ ID N° 2).

[00184] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-7 humano que compreende um, dois, três, quatro, cinco ou seis dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de N82, P83, A84, R85, A86 e/ou V87 (com referência a SEQ ID N° 1).

[00185] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-7 humano que compreende um, dois, três ou quatro dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de N81, D100, H102 e/ou T103 (com referência a SEQ ID N° 1).

[00186] Em um aspecto, os anticorpos anti-Siglec ligam um epítopo sobre Siglec-7 humano que compreende um, dois, três ou quatro dos resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de W88, E89, E90 e R92 (com referência a SEQ ID N° 1).

[00187] Após a obtenção de compostos de ligação de抗ígenos que possuem a ligação desejada para Siglec, pode-se determinar a sua capacidade de inibir Siglec (por exemplo, Siglec-7 e/ou Siglec-9). Caso um anticorpo anti-Siglec reduza ou bloqueeie a ativação de Siglec induzida por um

ligante ácido siálico (por exemplo, presente em uma célula), por exemplo, ele pode aumentar a citotoxicidade de linfócitos restritos por Siglec. Isso pode ser avaliado por um teste de citotoxicidade típico, cujos exemplos são descritos abaixo.

[00188] A capacidade de um anticorpo de reduzir a sinalização mediada por Siglec pode ser testada em um teste de citotoxicidade *in vitro* por quatro horas padrão, utilizando-se, por exemplo, células NK que expressam Siglec-7 ou Siglec-9 e células alvo que expressam um ligante ácido siálico do Siglec correspondente. Essas células NK não matam eficientemente alvos que expressam o ligante ácido siálico porque Siglec-7 ou 9 reconhece o ligante ácido siálico, causando início e propagação de sinalização inibidora que evita a citólise mediada por linfócitos. Esse teste pode ser conduzido de acordo com os métodos dos Exemplos do presente; vide, por exemplo, o Exemplo 8, que utiliza células NK primárias como células NK novas purificadas de doadores e incubadas por uma noite a 37 °C antes do uso. Esse teste de citotoxicidade *in vitro* pode ser conduzido por meio de métodos padrão bem conhecidos na técnica, conforme descrito, por exemplo, em Coligan et al, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, Nova Iorque (1992, 1993). As células alvo são marcadas com ⁵¹Cr antes da adição de células NK e, em seguida, a mortalidade é estimada como proporcional à liberação de ⁵¹Cr das células para o meio, como resultado da mortalidade. A adição de anticorpos que evitam a ligação de Siglec-7 e/ou 9 ao ligante ácido siálico resulta na prevenção do início e da propagação de sinalização inibidora por meio de Siglec. A adição desses agentes resulta, portanto, em aumentos da mortalidade mediada por linfócitos das células alvo. Desta forma, esta etapa identifica agentes que evitam a sinalização negativa induzida por Siglec-7 ou 9, por exemplo, bloqueando a ligação de ligantes. Em um teste de citotoxicidade por liberação de ⁵¹Cr específico, células efetoras NK

que expressam Siglec-7 ou 9 podem matar células alvo negativas para ligante ácido siálico (por exemplo, células tratadas com sialidase), mas não tão bem células controle que expressam ligante ácido siálico. Desta forma, células efetoras NK matam células positivas para ligantes de ácido siálico com menos eficiência devido à sinalização inibidora induzida por ácido siálico por meio do Siglec específico. Quando as células NK forem previamente incubadas com anticorpos anti-Siglec bloqueadores nesse teste de citotoxicidade por liberação de ^{51}Cr , células que expressam ligante ácido siálico são mortas com mais eficiência, de forma dependente da concentração de anticorpos. O teste pode ser conduzido separadamente para cada Siglec, tal como Siglec-7 e Siglec-9.

[00189] A atividade inibidora (ou seja, potencial de aumento da citotoxicidade) de anticorpos pode também ser determinada em qualquer uma dentre uma série de outras formas, tal como pelo seu efeito sobre cálcio livre intracelular, conforme descrito, por exemplo, em Sivori et al, *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1129-1136, cuja descrição é incorporada ao presente como referência, ou pelo efeito sobre marcadores da ativação da citotoxicidade de células NK, tais como a expressão de marcador da desgranulação CD107 ou CD137. A atividade de células NK, T ou NKT pode ser também determinada utilizando-se quaisquer testes da citotoxicidade com base celular, tais como a medição de qualquer outro parâmetro para determinar a capacidade do anticorpo de estimular células NK para matar células alvo tais como células P815 e K562 ou células de tumores apropriadas, conforme descrito em Sivori et al, *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1129-1136; Vitale et al, *J. Exp. Med.* 1998; 187: 2065-2072; Pessino et al, *J. Exp. Med.* 1998; 188: 953-960; Neri et al, *Clin. Diag. Lab. Immun.* 2001; 8: 1131-1135; Pende et al, *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1505-1516, cujas descrições completas são incorporadas ao presente como referência.

[00190] Em uma realização, preparações de anticorpos

causam aumento de pelo menos 10% da citotoxicidade de linfócitos restritos por Siglec, preferencialmente aumento de pelo menos 40% ou 50% da citotoxicidade de NK ou, de maior preferência, aumento de pelo menos 70% da citotoxicidade de NK.

[00191] A atividade de linfócitos citotóxicos pode também ser abordada utilizando-se um teste de liberação de citoquinas, em que as células NK são incubadas com o anticorpo para estimular a produção de citoquinas das células NK (por exemplo, produção de IFN- γ e TNF- α). Em um exemplo de protocolo, a produção de IFN- γ a partir de PBMC é determinada por meio de manchas intracitoplasmáticas e da superfície celular e análise por meio de citometria de fluxo após quatro dias em cultivo. Resumidamente, adiciona-se Brefeldin A (Sigma Aldrich) em concentração final de 5 μ g/ml pelas últimas quatro horas de cultivo. As células são incubadas em seguida com mAb anti-CD3 e anti-CD56 antes da permeabilização (IntraPrep®; Beckman Coulter) e manchas com PE-anti-IFN- γ ou PE-IgG1 (Pharmingen). A produção de GM-CSF e IFN- γ a partir de células NK ativadas policlonais é medida em sobrenadantes utilizando-se ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Mineápolis MN, IFN- γ : conjunto OptEIA, Pharmingen).

[00192] Fragmentos e derivados de anticorpos (que são englobados pelo termo “anticorpo” ou “anticorpos”, da forma utilizada no presente pedido, a menos que indicado em contrário ou claramente contradito pelo contexto) podem ser produzidos por meio de métodos conhecidos na técnica. “Fragmentos” compreendem uma parte do anticorpo intacto, geralmente o local de ligação de抗ígenos ou região variável. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2 e Fv; diacorpos; qualquer fragmento de anticorpo que seja um polipeptídeo que possui estrutura primária que consiste de uma sequência ininterrupta de resíduos de aminoácidos contíguos (indicada no presente “fragmento de

anticorpo de fita simples” ou “polipeptídeo de fita simples”), incluindo, sem limitações, (1) moléculas Fv de fita simples, (2) polipeptídeos de fita simples que contêm apenas um domínio variável de cadeia leve ou um de seus fragmentos que contém as três CDRs do domínio variável de cadeia leve, sem uma porção de cadeia pesada associada e (3) polipeptídeos de fita simples que contêm apenas uma região variável de cadeia pesada ou um de seus fragmentos que contêm as três CDRs da região variável de cadeia pesada, sem uma porção de cadeia leve associada; e anticorpos multiespecíficos (tais como biespecíficos) formados a partir de fragmentos de anticorpos. São incluídos, entre outros, um nanocorpo, anticorpo de domínio, anticorpo de domínio simples ou “dAb”.

[00193] Em certas realizações, o DNA de um hibridoma produtor de anticorpos pode ser modificado antes da inserção em um vetor de expressão, por exemplo, substituindo-se a sequência de codificação para domínios constantes de cadeia leve e pesada humana no lugar das sequências não humanas homólogas (por exemplo, Morrison et al, *PNAS* pág. 6851 (1984)), ou por meio de ligação covalente à sequência de codificação de imunoglobulina da sequência de codificação para um polipeptídeo não de imunoglobulina, no todo ou em parte. Desta forma, são preparados anticorpos “quiméricos” ou “híbridos” que possuem a especificidade de ligação do anticorpo original. Tipicamente, esses polipeptídeos não de imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo.

[00194] Opcionalmente, o anticorpo é humanizado. Formas “humanizadas” de anticorpos são imunoglobulinas quiméricas específicas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 ou outras subsequências de ligação de抗ígenos de anticorpos) que contêm sequência mínima derivada da imunoglobulina murina. Em sua maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo

receptor) nas quais resíduos de uma região de determinação da complementaridade (CDR) do paciente são substituídos por resíduos de uma CDR do anticorpo original (anticorpo doador), mantendo-se ao mesmo tempo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas do anticorpo original.

[00195] Em alguns casos, resíduos de cadeia principal Fv da imunoglobulina humana podem ser substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem nas sequências de cadeia principal ou CDR importadas. Essas modificações são realizadas para refinar e otimizar ainda mais o desempenho do anticorpo. De forma geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às do anticorpo original e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado idealmente também compreenderá pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones et al, *Nature* 321 págs. 522 (1986); Reichmann et al, *Nature*, 332, págs. 323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2, pág. 593 (1992); Verhoeven et al, *Science*, 239, pág. 1534; e Patente Norte-Americana nº 4.816.567, cujas descrições completas são incorporadas ao presente como referência). Métodos de humanização dos anticorpos são bem conhecidos na técnica.

[00196] A seleção de domínios variáveis humanos, leve e pesado, a serem utilizados na produção dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. Segundo o chamado método de “melhor adequação”, a sequência do domínio variável de um anticorpo é selecionada contra toda a biblioteca de sequências de domínios variáveis

humanos conhecidas A sequência humana mais próxima de camundongo é então aceita como cadeia principal humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al, *J. Immunol.* 151, págs. 2296 (1993); Chothia e Lesk, *J. Mol.* 196, 1987, pág. 901). Outro método utiliza uma cadeia principal específica da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeia leve ou pesada. A mesma cadeia principal pode ser utilizada para diversos anticorpos humanizados diferentes (Carter et al, *PNAS* 89, pág. 4285 (1992); Presta et al, *J. Immunol.*, 151, pág. 2623 (1993)).

[00197] É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para receptores de Siglec e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método, anticorpos humanizados são preparados por meio de um processo de análise das sequências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das sequências parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e familiares para os técnicos no assunto. São disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas tridimensionais prováveis de possíveis sequências de imunoglobulina selecionadas. A inspeção destas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da possível sequência de imunoglobulina, ou seja, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da possível imunoglobulina de ligar o seu antígeno. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências importada e de consenso, de forma que seja atingida a característica desejada do anticorpo, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo. Geralmente, os resíduos de CDR são direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de抗ígenos.

[00198] Outro método de preparação de anticorpos

monoclonais “humanizados” é o uso de XenoMouse (Abgenix, Fremont CA) como o camundongo utilizado para imunização. XenoMouse é um hospedeiro murino segundo o qual teve seus genes de imunoglobulina substituídos por genes de imunoglobulina humana funcionais. Os anticorpos produzidos por esse camundongo ou em hibridomas preparados a partir das células B desse camundongo, portanto, já são humanizados. O XenoMouse é descrito na Patente Norte-Americana n° 6.162.963, que é incorporada integralmente ao presente como referência.

[00199] Anticorpos humanos podem também ser produzidos de acordo com diversas outras técnicas, tais como o uso, para imunização, de outros animais transgênicos que tenham sido elaborados para expressar um repertório de anticorpos humanos (Jakobovitz et al, *Nature* 362 (1993) 255), ou por meio da seleção de repertórios de anticorpos utilizando-se métodos de exibição de fagos. Essas técnicas são conhecidas pelos técnicos no assunto e podem ser implementadas a partir de anticorpos monoclonais, conforme descrito no presente pedido de patente.

[00200] Em uma realização, os anticorpos anti-Siglec podem ser preparados de forma que não possuam ligação específica substancial para receptores de Fc humanos, tais como qualquer um ou mais dentre CD16A, CD16B, CD32A, CD32B e/ou CD64. Esses anticorpos podem compreender regiões constantes de diversas cadeias pesadas que conhecidamente não possuem ou possuem baixa ligação a receptores de Fc. Alternativamente, fragmentos de anticorpos que não compreendem (ou compreendem partes de) regiões constantes, tais como fragmentos de F(ab')2, podem ser utilizados para evitar a ligação de receptores de Fc. Pode-se determinar a ligação de receptores de Fc de acordo com métodos conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ligação de teste de um anticorpo a proteína receptora de Fc em teste BIACORE. Além disso, geralmente, pode-se utilizar qualquer isótipo de IgG de

anticorpo no qual a porção Fc é modificada (por exemplo, por meio da introdução de 1, 2, 3, 4, 5 ou mais substituições de aminoácidos) para minimizar ou eliminar a ligação a receptores de Fc (vide, por exemplo, WO 03/101485, cujo relatório descritivo é incorporado ao presente como referência). Testes como os testes baseados em células para determinar a ligação de receptores de Fc são bem conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em WO 03/101485.

[00201] Em uma realização, o anticorpo pode compreender uma ou mais mutações específicas na região Fc que resultam em anticorpos “silenciosos para Fc” que possuem interação mínima com células efetoras. Funções efetoras silenciadas podem ser obtidas por meio de mutação na região Fc dos anticorpos e foram descritas na técnica: mutação N297A, as mutações LALA (Strohl, W., 2009, *Curr. Opin. Biotechnol.* vol. 20 (6): 685-691); e D265A (Baudino et al, 2008, *J. Immunol.* 181: 6664-69); vide também Heusser et al, WO 2012/065960, cujo relatório descritivo é incorporado ao presente como referência. Em uma realização, um anticorpo compreende uma, duas, três ou mais substituições de aminoácidos na região de articulação. Em uma realização, o anticorpo é IgG1 ou IgG2 e compreende uma, duas ou três substituições nos resíduos 233-236, opcionalmente 233-238 (numeração de EU). Em uma realização, o anticorpo é IgG4 e compreende uma, duas ou três substituições nos resíduos 327, 330 e/ou 331 (numeração de EU). Exemplos de anticorpos IgG1 de Fc silenciosos são o mutante LALA que compreende mutação L234A e L235A na sequência de aminoácidos Fc de IgG1. Outro exemplo de mutação silenciosa para Fc é mutação no resíduo D265 ou em D265 e P329, por exemplo, conforme utilizado em anticorpo IgG1 como mutação DAPA (D265A, P329A) (US 6.737.056). Outro anticorpo IgG1 silencioso compreende uma mutação no resíduo N297 (por exemplo, mutação N297A, N297S), que resulta em anticorpos aglicosilados/não glicosilados.

Outras mutações silenciosas incluem: substituições nos resíduos L234 e G237 (L234A/G237A); substituições nos resíduos S228, L235 e R409 (S228P/L235E/R409K,T,M,L); substituições nos resíduos H268, V309, A330 e A331 (H268Q/V309L/A330S/A331S); substituições nos resíduos C220, C226, C229 e P238 (C220S/C226S/C229S/P238S); substituições nos resíduos C226, C229, E233, L234 e L235 (C226S/C229S/E233P/L234V/L235A; substituições nos resíduos K322, L235 e L235 (K322A/L234A/L235A); substituições nos resíduos L234, L235 e P331 (L234F/L235E/P331S); substituições nos resíduos 234, 235 e 297; substituições nos resíduos E318, K320 e K322 (L235E/E318A/K320A/K322A); substituições nos resíduos (V234A, G237A, P238S); substituições nos resíduos 243 e 264; substituições nos resíduos 297 e 299; substituições tais como os resíduos 233, 234, 235, 237 e 238 definidos pelo sistema de numeração EU compreendem uma sequência selecionada a partir de PAAAP, PAAAS e SAAAS (vide WO 2011/066501).

[00202] Em uma realização, o anticorpo pode compreender uma ou mais mutações específicas na região Fc que resultam em aumento da estabilidade de um anticorpo de acordo com a presente invenção, por exemplo, que compreende diversos resíduos de aminoácidos aromáticos e/ou que possui alta hidrofobicidade. Esse anticorpo pode compreender, por exemplo, um domínio Fc com origem em IgG1 humano e compreende uma mutação no(s) resíduo(s) de Kabat 234, 235, 237, 330 e/ou 331. Um exemplo desse domínio Fc compreende substituições nos resíduos de Kabat L234, L235 e P331 (por exemplo, L234A/L235E/P331S ou L234F/L235E/P331S). Outro exemplo desse domínio Fc compreende substituições nos resíduos de Kabat L234, L235, G237 e P331 (por exemplo, L234A/L235E/G237A/P331S). Outro exemplo desse domínio Fc compreende substituições nos resíduos de Kabat L234, L235, G237, A330 e P331 (por exemplo, L234A/L235E/G237A/A330S/P331S). Em uma realização, o anticorpo compreende um domínio Fc, opcionalmente de

isótipo de IgG1 humano, que compreende: substituição L234X₁, substituição L235X₂ e substituição P331X₃, em que X₁ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de leucina, X₂ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de leucina e X₃ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina; opcionalmente, em que X₁ é alanina ou fenilalanina ou uma de suas substituições conservadoras; opcionalmente, em que X₂ é ácido glutâmico ou uma de suas substituições conservadoras; opcionalmente, em que X₃ é serina ou uma de suas substituições conservadoras. Em outra realização, o anticorpo compreende um domínio Fc, opcionalmente de isótipo de IgG1 humano, que compreende: substituição L234X₁, substituição L235X₂, substituição G237X₄ e substituição P331X₄, em que X₁ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de leucina, X₂ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de leucina, X₃ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de glicina e X₄ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina; opcionalmente, em que X₁ é alanina ou fenilalanina ou uma de suas substituições conservadoras; opcionalmente, em que X₂ é ácido glutâmico ou uma de suas substituições conservadoras; opcionalmente, X₃ é alanina ou uma de suas substituições conservadoras; e, opcionalmente, X₄ é serina ou uma de suas substituições conservadoras. Em outra realização, o anticorpo compreende um domínio Fc, opcionalmente de isótipo de IgG1 humano, que compreende: substituição L234X₁, substituição L235X₂, substituição G237X₄, substituição G330X₄ e substituição P331X₅, em que X₁ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de leucina, X₂ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de leucina, X₃ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de glicina, X₄ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de alanina e X₅ é qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina; opcionalmente, em que X₁ é alanina ou fenilalanina ou uma de suas substituições conservadoras; opcionalmente, em que X₂ é ácido glutâmico ou uma de suas substituições conservadoras; opcionalmente, X₃ é alanina ou uma de suas substituições conservadoras; e, opcionalmente, X₄ é serina ou uma de suas substituições conservadoras.

conservadoras; opcionalmente, X₄ é serina ou uma de suas substituições conservadoras; e, opcionalmente, X₅ é serina ou uma de suas substituições conservadoras. Na notação abreviada utilizada no presente, o formato é: resíduo do tipo selvagem: posição no polipeptídeo: resíduo mutante, em que as posições de resíduos são indicadas de acordo com a numeração de EU de acordo com Kabat.

[00203] Em uma realização, um anticorpo comprehende uma região constante de cadeia pesada que comprehende a sequênciade aminoácidos abaixo ou uma sequênciade aminoácidos pelo menos 90%, 95% ou 99% idêntica, mas que retém os resíduos de aminoácidos nas posições de Kabat 234, 235 e 331 (sublinhados):

```

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVIEWSNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID Nº 166).

```

[00204] Em uma realização, um anticorpo comprehende uma região constante de cadeia pesada que comprehende a sequênciade aminoácidos abaixo ou uma sequênciade aminoácidos pelo menos 90%, 95% ou 99% idêntica, mas que retém os resíduos de aminoácidos nas posições de Kabat 234, 235 e 331 (sublinhados):

```

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS

```

SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPE**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**A**IEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID Nº 167).

[00205] Em uma realização, um anticorpo comprehende uma região constante de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos abaixo ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 95% ou 99% idêntica, mas que retém os resíduos de aminoácidos nas posições de Kabat 234, 235, 237, 330 e 331 (sublinhados):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPE**A****E**APS**G**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**S****S**IEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID Nº 168).

[00206] Em uma realização, um anticorpo comprehende uma região constante de cadeia pesada que comprehende a sequência de aminoácidos abaixo ou uma sequência pelo menos 90%, 95% ou 99% idêntica, mas que retém os resíduos de aminoácidos nas posições de Kabat 234, 235, 237 e 331 (sublinhados):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPNAVQLQSSGLYSLSSVVTPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID Nº 169).

[00207] Anticorpos silenciosos para Fc resultam em pouca ou nenhuma atividade de ADCC, o que significa que um anticorpo silencioso para Fc exibe atividade de ADCC que é de menos de 50% de lise celular específica. Preferencialmente, anticorpos substancialmente não possuem atividade de ADCC; o anticorpo silencioso para Fc, por exemplo, exibe atividade de ADCC (lise celular específica) que é de menos de 5% ou menos de 1%. Anticorpos silenciosos para Fc podem também resultar em falta de retícula mediada por FcγR de Siglec-9 e/ou Siglec-7 na superfície celular (por exemplo, de uma célula NK, célula T, monócito, célula dendrítica ou macrófago).

[00208] Em uma realização, o anticorpo possui uma substituição em uma região constante de cadeia pesada em qualquer um, dois, três, quatro, cinco ou mais resíduos selecionados a partir do grupo que consiste de: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330, 331 e 409 (a numeração de resíduos na região constante de cadeia pesada é de acordo com a numeração de UE de acordo com Kabat). Em uma realização, o anticorpo comprehende substituição nos resíduos 234, 235 e 322. Em uma realização, o anticorpo

possui substituição nos resíduos 234, 235 e 331. Em uma realização, o anticorpo possui substituição nos resíduos 234, 235, 237 e 331. Em uma realização, o anticorpo possui substituição nos resíduos 234, 235, 237, 330 e 331. Em uma realização, o domínio Fc é do subtipo IgG1 humano. Resíduos de aminoácidos são indicados de acordo com numeração EU de acordo com Kabat.

[00209] Sequências de CDR de anticorpos:

A sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia leve e pesada de anticorpos mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E e F é exibida na Tabela B. Em realização específica, é fornecido um anticorpo que liga essencialmente o mesmo epítopo ou determinante como anticorpos monoclonais mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F; opcionalmente, o anticorpo compreende a região hipervariável de anticorpo mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F. Em qualquer uma das realizações do presente, o anticorpo mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F pode ser caracterizado pelas sequências de aminoácidos e/ou sequências de ácidos nucleicos que o codificam. Em uma realização, o anticorpo monoclonal compreende VH e/ou VL ou a porção Fab ou F(ab')₂ de mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F. É também fornecido um anticorpo monoclonal que compreende a região variável de cadeia pesada de mAb1. Segundo uma realização, o anticorpo monoclonal compreende as três CDRs da região variável de cadeia pesada de mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F. É também fornecido um anticorpo monoclonal que compreende adicionalmente a região variável de cadeia leve do mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F correspondente ou uma, duas ou três das CDRs da região variável de cadeia leve do mAb1, 2, 3, 4, 5, 6, A, B, C, D, E ou F correspondente. Opcionalmente, qualquer uma ou mais das mencionadas CDRs de cadeia leve ou pesada pode conter uma, duas, três, quatro, cinco ou mais modificações de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou exclusões). É

opcionalmente fornecido um anticorpo no qual qualquer uma das regiões variáveis de cadeia leve e/ou pesada que compreende, no todo ou em parte, uma região de ligação de抗ígenos de anticorpo mAb1 é fundida a uma região constante de imunoglobulina do tipo IgG humana, opcionalmente uma região constante humana, opcionalmente um isótipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano, que compreende ainda opcionalmente uma substituição de aminoácidos para reduzir a função efetora (ligação a receptores de Fc_y humanos).

[00210] Um exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAb1 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-1 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAb1 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-1 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAb1 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-1 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAb1 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-1 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAb1 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-1 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses

aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAb1 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-1 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-1

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAb1	Kabat	27	GGFAWN	30	YIGYGGSTSYNPSLNS	32	GDYLFAY
	Chotia	28	GYSITGGF		YGG	33	DYLFA
	IMGT	29	GYSITGGFA	31	IGYGGST	34	ARGDYLFAY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAb1	Kabat	35	KASQDVNTAVA	38	SASYRYT	39	QQHYSTPRT
	Chotia	36	SQDVNTA		SAS	40	HYSTPR
	IMGT	37	QDVNTA		SAS	39	QQHYSTPRT

[00211] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAb3 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-3 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAb3 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-3 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAb3 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-3 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8,

9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAb3 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-3 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAb3 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-3 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAb3 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-3 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-3

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAb3	Kabat	27	GGFAWN	30	YIGYGGSTSYNPSLNS	32	GDYLFAY
	Chotia	28	GYSITGGF		YGG	33	DYLFA
	IMGT	29	GYSITGGFA	31	IGYGGST	34	ARGDYLFAY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
		41	RASGNIHNLYLA	44	NAKTLAD	45	QHFWSTPRT
		42	SGNIHNY		NAK	46	FWSTPR
	IMGT	43	GNIHNY		NAK	45	QHFWSTPRT

[00212] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAb4 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-4 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais

desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAb4 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-4 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAb4 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-4 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAb4 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-4 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAb4 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-4 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAb4 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-4 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-4

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAb4	Kabat	47	SYDMS	50	HIGSGGGNIYYPDTVKKG	52	LIFTTGFYGMDY
	Chotia	48	GFAFSSY		SGGG	53	IFTTGFYGMD
	IMGT	49	GFAFSSYD	51	IGSGGGNI	54	ARLIFTTGFYGMDY
mAb	Definição	LCDR1		LCDR2		LCDR3	

	de CDR	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAb4	Kabat	55	RASQDISSYLN	58	YTSRLHS	59	QQGNALPWT
	Chotia	56	SQDISSY		YTS	60	GNALPW
	IMGT	57	QDISSY		YTS	59	QQGNALPWT

[00213] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAb5 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-5 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAb5 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-5 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAb5 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-5 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAb5 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-5 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAb5 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-5 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAb5 que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-5 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais

desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-5

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAb5	Kabat	61	DYNMN	64	NIDPYYGATSYNQRFKG	66	GDSLFA
	Chotia	62	GYSFSDY		PYYG	67	DSLFA
	IMGT	63	GYSFSDYN	65	IDPYYGAT	68	ARGDSLFA
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
		69	KASQNVGTNVA	72	SASSRYS	73	QQYITYPYT
	Chotia	70	SQNVGTN		SAS	74	YITYPY
	IMGT	71	QNVGTN		SAS	73	QQYITYPYT

[00214] Outro exemplo de anticorpo comprehende: uma região

HCDR1 de mAbA que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-7 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAbA que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-7 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAbA que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-7 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAbA que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-7 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região

LCDR2 de mAbA que comprehende uma sequênciade aminoácidos conforme descrito na Tabela A-7 ou uma sequênciade pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAbA que comprehende uma sequênciade aminoácidos conforme descrito na Tabela A-7 ou uma sequênciade pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-7

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbA	Kabat	75	SYWMH	78	EINPSNGHTNYNEKFES	80	GVESYDFDDALDY
	Chotia	76	YFTFTSY		PSNG	81	VESYDFDDALD
	IMGT	77	YFTFTSYW	79	INPSNGHT	82	ANGVESYDFDDALDY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
		83	RASQDINNY LN	58	YTSRLHS	86	QQGNTLPFT
	Kabat	84	SQDINNY		YTS	87	GNTLPF
	IMGT	85	QDINNY		YTS	86	QQGNTLPFT

[00215] Outro exemplo de anticorpo comprehende: uma região HCDR1 de mAbB que comprehende uma sequênciade aminoácidos conforme descrito na Tabela A-8 ou uma sequênciade pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAbB que comprehende uma sequênciade aminoácidos conforme descrito na Tabela A-8 ou uma sequênciade pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAbB que comprehende uma sequênciade aminoácidos conforme

descrito na Tabela A-8 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAbB que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-8 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAbB que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-8 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAbB que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-8 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-8

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbB	Kabat	75	SYWMH	90	EINPSNGHTNYNEKFKT	92	GVETYDFDDAMDY
	Chotia	88	VYTFTSY		PSNG	93	VETYDFDDAMD
	IMGT	89	VYTFTSYW	91	INPSNGHT	94	ANGVETYDFDDA MDY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbB	Kabat	83	RASQDINNYLN	95	FTSRLHS	96	QQGDTFPFT
	Chotia	84	SQDINNY		YTS	97	GDTFPF
	IMGT	85	QDINNY		FTS	96	QQGDTFPFT

[00216] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAbC que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-9 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de

seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAbC que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-9 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAbC que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-9 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAbC que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-9 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAbC que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-9 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR3 de mAbC que comprehende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-9 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-9

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbC	Kabat	98	NYEMN	101	WINTYTGESTYADDFK	103	DDYGRSYGFAY
	Chotia	99	GYTFTNY		TYTG	104	DYGRSYGFA
	IMGT	100	GYTFTNYE	102	INTYTGES	105	VRDDYGRSYGFAY

mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbC	Kabat	106	RASESVDSYGN SFMH	109	LASKLES	110	HQNNEDPPWT
	Chotia	107	SESVDSYGNNSF		LAS	111	NNEDPPW
	IMGT	108	ESVDSYGNNSF		LAS	110	HQNNEDPPWT

[00217] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAbD que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-10 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAbD que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-10 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAbD que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-10 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAbD que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-10 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAbD que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-10 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAbD que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-10 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7,

8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-10

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbD	Kabat	112	DYSMH	115	WIITETGEPTYADDFRG	117	DFDGY
	Chotia	113	GYTFTDY		TETG		FDG
	IMGT	114	GYTFTDYS	116	IITETGEP	118	ARDFDGY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
	Kabat	119	RASENIYSYLA	122	NAKTLTE	123	QHHYGFPWT
	Chotia	120	SENIYSY		NAK	124	HYGFPW
	IMGT	121	ENIYSY		NAK	123	QHHYGFPWT

[00218] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAbE que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-11 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAbE que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-11 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR3 de mAbE que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-11 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAbE que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-11 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma

desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAbE que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-11 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAbE que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-11 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-11

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbE	Kabat	125	TFGMH	128	YISSGSNAYYADTVKG	130	PGYGAWFAY
	Chotia	126	GFTFSTF		SGSN	131	GYGAWFA
	IMGT	127	GFTFSTFG	129	ISSGSNAI	132	ASPGYGAWFAY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbE	Kabat	133	RASSSVSSAYLH	136	STS NLAS	137	QQYSAYPYT
	Chotia	134	SSSVSSAY		STS	138	YSAYPY
	IMGT	135	SSVSSAY		STS	137	QQYSAYPYT

[00219] Outro exemplo de anticorpo compreende: uma região HCDR1 de mAbF que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-12 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região HCDR2 de mAbF que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-12 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma

região HCDR3 de mAbF que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-12 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR1 de mAbF que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-12 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; uma região LCDR2 de mAbF que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-12 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e uma região LCDR3 de mAbF que compreende uma sequência de aminoácidos conforme descrito na Tabela A-12 ou uma sequência de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos, opcionalmente em que um ou mais desses aminoácidos podem ser excluídos ou substituídos por um aminoácido diferente.

TABELA A-12

mAb	Definição de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbF	Kabat	112	DYSMH	139	VISTYNGNTNYNQKFKG	141	RGYYGSSSWFGY
	Chotia	113	GYTFTDY		TYNG	142	GYYGSSSWFG
	IMGT	114	GYTFTDYS	140	ISTYNGNT	143	ARRGYYGSSSWFGY
mAb	Definição de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência	SEQ ID N°	Sequência
mAbF	Kabat	144	KASQNVGTDVA	147	SASYRYS	148	QQYNSFPYT
	Chotia	145	SQNVGTD		SAS	149	YNSFPY
	IMGT	146	QNVGTD		SAS	148	QQYNSFPYT

qualquer uma das sequências HCDR1, 2 e 3 e LCDR1, 2 e 3 pode ser opcionalmente especificada como todas (ou cada uma independentemente) sendo as do sistema de numeração de Kabat (conforme indicado na Tabela A-1 a A-12 para cada CDR), as do sistema de numeração de Chotia (conforme indicado na Tabela A-1 a A-12 para cada CDR), as do sistema de numeração IMGT (conforme indicado na Tabela A-1 a A-12 para cada CDR) ou qualquer outro sistema de numeração apropriado.

[00221] Em outro aspecto, qualquer uma das CDRs 1, 2 e 3 das cadeias leve e pesada de mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE, mAbF, mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 ou mAb6 pode ser caracterizada por uma sequência com pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 de seus aminoácidos contíguos e/ou contendo uma sequência de aminoácidos que compartilha pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade de sequências com a CDR específica ou o conjunto de CDRs relacionado no SEQ ID N° correspondente.

[00222] Em qualquer dos anticorpos, tais como mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE, mAbF, mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 ou mAb6, a região variável especificada e as sequências de CDR podem compreender modificações de sequências, tais como uma substituição (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais modificações de sequências). Em uma realização, CDRs 1, 2 e/ou 3 das cadeias leve e pesada compreendem uma, duas, três ou mais substituições de aminoácidos, em que o resíduo substituído é um resíduo presente em uma sequência de origem humana. Em uma realização, a substituição é uma modificação conservadora. Modificação de sequências conservadora indica uma modificação de aminoácidos que não altera nem afeta significativamente as características de ligação do anticorpo que contém a sequência de aminoácidos. Essas modificações conservadoras incluem substituições, adições e exclusões de aminoácidos. Podem ser introduzidas

modificações em anticorpos de acordo com a presente invenção por meio de métodos padrão conhecidos na técnica, tais como mutagênese dirigida a local e mutagênese mediada por PCR. Substituições de aminoácidos conservadoras são tipicamente aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que possui cadeia lateral com propriedades físico-químicas similares. Sequências de CDR e região variável especificadas podem compreender uma, duas, três, quatro ou mais inserções, exclusões ou substituições de aminoácidos. Quando forem realizadas substituições, substituições preferidas serão modificações conservadoras. Famílias de resíduos de aminoácidos que possuem cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (tais como lisina, arginina e histidina), cadeias laterais ácidas (tais como ácido aspártico e ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (tais como glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína e triptofano), cadeias laterais não polares (tais como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina e metionina), cadeias laterais beta ramificadas (tais como treonina, valina e isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (tais como tirosina, fenilalanina, triptofano e histidina). Um ou mais resíduos de aminoácidos dentro das regiões CDR de anticorpos de acordo com a presente invenção podem, portanto, ser substituídos por outros resíduos de aminoácidos da mesma família de cadeia lateral e o anticorpo alterado pode ser testado para determinar a função retida (ou seja, as propriedades definidas no presente), utilizando os testes descritos no presente.

[00223] As sequências das CDRs, de acordo com os sistemas de definições IMGT, Kabat e Chothia, são resumidas nas Tabelas A-1 a A-12. As sequências das regiões variáveis dos anticorpos de acordo com a presente invenção são relacionadas na Tabela B abaixo. Em qualquer uma das realizações do presente, sequência VL ou VH pode ser especificada ou

numerada de forma a compreender adicionalmente ou não um peptídeo de sinal ou qualquer de suas partes.

[00224] Em uma realização, os anticorpos são fragmentos de anticorpos que retêm suas propriedades funcionais e/ou de ligação.

TABELA B

	SEQ ID N°	Sequência de Aminoácidos
mAb1 VH	3	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQF PGNTLEWMGYIGYGGSTSYPNSLNSRISITRDTSKNHFFLQF NSVTTDDSATYYCARGDYL FAYWGQGTLTVSA
mAb1 VL	4	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPG QSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDL AVYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIK
mAb2 VH	5	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQF PGNTLEWMGYIGYGGSTSYPNSLNSRISITRDTSKNHFFLQF NSVTTEDSATYYCARGDYL FAYWGQGTLTVSA
mAb2 VL	6	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPG QSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDL AVYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIK
mAb3 VH	7	EVQLLETGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQFP GNTLEWMGYIGYGGSTSYPNSLNSRISITRDTSKNHFFLQFN SVTTEDSATYYCARGDYL FAYWGQGTLTVSA
mAb3 VL	8	DILMTQSPASLSASVGETVSITCRASGNIHNYLAWYLQRQGK SPQLLVNAKTLADGVPSRFSGTGSGTQFSLKINSLQPEDFG SYYCQHFWSTPRTFGGGTKLEIK
mAb4 VH	9	DVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFASFSSYDMSWVRQS PEKRLIEWIAHIGSGGGNIYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MRSLKSEDTAMYCARLIFTTGFYGMWDYWGQGTSVTVSS
mAb4 VL	10	DIQMTQTSSLASLGDRV TISCRASQDISSYLNWYQQKPDG TIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQDDIATY FCQQGNALPWTFGGGTKLEIK
mAb5 VH	11	EIQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFSDYNMNWVKQSN GKSLEWIGNIDPYYGATSYNQRFKKGATLTVDKSSSTAYMQ LKSLTSEDSA VYYCARGDSLFA YWGQGTLTVSA
mAb5 VL	12	DIVMTQSQE FMSTSLGDRV SVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKALLYSASSRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSE DLAEYFCQQYITYPYTFGGGT KLEIK
mAb6 VH	13	EIQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFSDYNMNWVKQSN GKSLEWIGNIDPYYGATSYNQRFKKGATLTVDKSSSTAYMQ LKSLTSEDSA VYYCARGDSLFA YWGQGTLTVSA
mAb6 VL	14	DIVMTQSQE FMSTSLGDRV SVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKALLYSASSRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSE DLAEYFCQQYITYPYTFGGGT KLEIK
mAbA VH	15	QVQLQQPGAEVLKPGSPVKLSCKASFYFTFTSYWMHWVRQR PGQGLEWIGEINPSNGHTNYNEKFESKATLTVDRSSSTAYM QLSSLTSEDSA VFYCANGVESYDFDDALDYWGQGTSVTVSS
mAbA VL	16	DIQMTQTSSLASLGDRV TISCRASQDIINNYLNWYQQKPD GTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIAT YFCQQQGNTLPFTFGGGTKLEIK

	SEQ ID Nº	Sequência de Aminoácidos
mAbB VH	17	QVQLQQPGAEVLKPGASVKLSCKASVYTFTSYWMHWVKQR PGQGLEWIGEINPSNGHTNYNEKFKTKAKLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCANGVETYDFDDAMDYWGQQGTSVTVS S
mAbB VL	18	DIQMTQTTSSLASALGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPD GTVKLIIYFTSRLHSGVPGRSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGDTFPFTFGGGTKEIK
mAbC VH	19	QIQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYTFTNYEMNWVKEAP GKGLKWMGWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLETSASTVYLQ INNLKDEDVATYFCVRDDYGRSYGFAYWGQQGTLTVSA
mAbC VL	20	NIVLTQSPASLTVSLGQRANISCRASESVD SYGNSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLASKLESGVPARFSGSGSRDFTLTIDPVET DDAATYYCHQNNEDPPWTFGGGTKEIK
mAbD VH	21	QIQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAP GKGLKWMGWIIETGEPTYADDFRGRFAFSLETSANTAYLQI NNLKNEDTATYFCARDFDGYWGQQGTTLVSS
mAbD VL	22	DILMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKRGK SPQFLVYNAKTLTEGVPSRFRGSGSGTQFSLKINSLQPEDFG TYYCQHHYGFPTFGGGTKEIK
mAbE VH	23	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSTFGMHWRQA PEKGLEWVAYISSGSNAYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQ MTSLRSEDTAMYCASPGYGAWFAYWGQQGTLTVSA
mAbE VL	24	ENVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSSVSSAYLHWYQQKS GASPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTYSLTISSSVEAED AATYYCQQYSAYPYTFGGGTKEIK
mAbF VH	25	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFDYSMHWVKQS HAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYM ELARLTSEDSAIYYCARRGYYGSSSWFGYWGQQGTLTVSA
mAbF VL	26	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTDVAWYQQKP GQSPEALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGADFTLTISNVQSED LAEYFCQQYNSFPYTFGGGTKEIK

[00225] Inibição de NKG2A:

Pode-se atingir neutralização da atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano por meio de inibição da ativação mediada por HLA-E de NKG2A em células T e/ou NK. Exemplos de agentes que neutralizam a atividade inibidora de polipeptídeo NKG2A humano inclui anticorpos que ligam HLA-E e inibem a interação entre NKG2A e HLA-E. Alternativamente, anticorpos podem ligar uma porção extracelular de receptor CD94/NKG2A humano e reduzir a atividade inibidora de receptor de CD94/NKG2A humano expresso sobre a superfície de linfócitos positivos para CD94/NKG2A. Em uma realização, o agente de ligação de NKG2A concorre com HLA-E na ligação a CD94/NKG2A, ou seja, o agente bloqueia a interação entre CD94/NKG2A e

seu ligante HLA-E. Em outra realização, o agente não concorre com HLA-E na ligação a CD94/NKG2A; ou seja, o agente é capaz de ligar CD94/NKG2A simultaneamente com HLA-E. Esse anticorpo pode ligar um epítopo combinado sobre CD94 e NKG2A e/ou epítopo sobre NKG2A isoladamente.

[00226] Em um aspecto, o agente anti-NKG2A é um anticorpo selecionado a partir de um anticorpo totalmente humano, anticorpo humanizado e anticorpo químico. Em um aspecto, o agente compreende um domínio constante derivado de um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano. Em um aspecto, o agente é um fragmento de anticorpo selecionado a partir de anticorpo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. Em um aspecto, o agente é um fragmento de anticorpo selecionado a partir de um fragmento de Fab, fragmento de Fab', fragmento de Fab'-SH, fragmento de F(ab)2, fragmento de F(ab')2, fragmento de Fv, Ig de cadeia pesada (Ig de camelo ou lhama), fragmento de V_{HH}, FV de domínio simples e fragmento de anticorpo de fita simples. Em um aspecto, o agente é uma molécula derivada de anticorpo sintético ou semissintético selecionada a partir de scFv, dsFv, minicorpo, diacorpo, triacorpo, corpo capa e IgNAR; e anticorpo multiespecífico.

[00227] Opcionalmente, os anticorpos anti-NKG2A não demonstram ligação específica substancial a receptores de Fc humanos, tais como CD16. Esses anticorpos podem compreender regiões constantes de diversas cadeias pesadas que conhecidamente não possuem ou possuem baixa ligação a receptores de Fc humanos. Um desses exemplos é uma região constante de IgG4 humano. Em uma realização, o anticorpo IgG4 compreende uma modificação para evitar a formação de meios anticorpos (substituição de braço Fab) *in vivo*; o anticorpo compreende, por exemplo, uma cadeia pesada IgG4 que compreende mutação de serina para prolina no resíduo 241, correspondente à posição 228 de acordo com o índice EU (Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed., NIH, Bethesda ML,

1991). Esses anticorpos IgG4 modificados permanecerão intactos *in vivo* e manterão ligação bivalente (alta afinidade) a NKG2A, ao contrário de IgG4 nativo, que sofrerá substituição de braço Fab *in vivo*, de forma que eles se liguem a NKG2A em forma monovalente que pode alterar a afinidade de ligação. Alternativamente, fragmentos de anticorpos que não compreendem regiões constantes, tais como fragmentos de Fab ou F(ab')2, podem ser utilizados para evitar a ligação de receptores de Fc. Pode-se determinar a ligação de receptor de Fc de acordo com métodos conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ligação de teste de um anticorpo a proteína receptora de Fc em teste BIACORE. Além disso, pode-se utilizar qualquer tipo de anticorpo humano (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) no qual a porção Fc é modificada para minimizar ou eliminar a ligação a receptores de Fc (vide, por exemplo, WO 03/101485, cujo relatório descritivo é incorporado ao presente como referência). Testes como os baseados em células para determinar a ligação de receptor de Fc, por exemplo, são bem conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em WO 03/101485.

[00228] A presente invenção refere-se, portanto, a anticorpos ou outros agentes que se ligam a NKG2A. Em um aspecto, o anticorpo liga-se a NKG2A com KD pelo menos 100 vezes menor que nenhum NKG2C e/ou NKG2E humano.

[00229] Em um aspecto da presente invenção, o agente reduz a inibição mediada por CD94/NKG2A de um linfócito que expressa CD94/NKG2A por meio de interferência com a sinalização de CD94/NKG2A, por exemplo, por meio de interferência com a ligação de HLA-E por NKG2A, evitando ou induzindo alterações de conformação no receptor de CD94/NKG2A e/ou afetando a dimerização e/ou a formação de conjunto do receptor de CD94/NKG2A.

[00230] Em um aspecto, o agente liga-se a uma porção

extracelular de NKG2A com KD pelo menos 100 vezes inferior a NKG2C. Em um aspecto preferido adicional, o agente liga-se a uma porção extracelular de NKG2A com KD pelo menos 150, 200, 300, 400 ou 10.000 vezes inferior a NKG2C. Em outro aspecto da presente invenção, o agente liga-se a uma porção extracelular de NKG2A com KD pelo menos 100 vezes inferior às moléculas NKG2C, NKG2E e/ou NKG2H. Em um aspecto preferido adicional, o agente liga-se a uma porção extracelular de NKG2A com KD pelo menos 150, 200, 300, 400 ou 10.000 vezes inferior às moléculas NKG2C, NKG2C e/ou NKG2H. Isso pode ser medido, por exemplo, em experimentos BiaCore, nos quais a capacidade de agentes de ligar a porção extracelular de CD94/NKG2A imobilizada (por exemplo, purificada a partir de células que expressam CD94/NKG2 ou produzida em um biossistema) é medida e comparada com a ligação de agentes a CD94/NKG2C e/ou outras variantes de CD94/NKG2 produzidas de forma similar no mesmo teste. Alternativamente, a ligação de agentes a células que naturalmente expressam ou sobre-expressam (por exemplo, após transfecção transitória ou estável) CD94/NKG2A pode ser medida e comparada com a ligação de células que expressam CD94/NKG2C e/ou outras variantes de CD94/NKG2. Anticorpos anti-NKG2A podem opcionalmente ligar NKG2B, que é uma variante de união de NKG2A que forma um receptor inibidor em conjunto com CD94. Em uma realização, a afinidade pode ser medida utilizando-se os métodos descritos na Patente Norte-Americana nº 8.206.709, determinando-se, por exemplo, a ligação à proteína de fusão NKG2A-CD94-Fc covalentemente imobilizada pela Biacore conforme exibido no Exemplo 8 da Patente Norte-Americana nº 8.206.709, cujo relatório descriptivo é incorporado ao presente como referência.

[00231] O anticorpo anti-NKG2A pode ser um anticorpo humanizado, que compreende, por exemplo, cadeia principal receptora de VH humano de uma sequência receptora humana selecionada, por exemplo, a

partir de VH1_18, VH5_a, VH5_51, VH1_f e VH1_46 e um segmento J JH6 ou outras sequências de cadeia principal VH de linha de germens humanas conhecidas na técnica. A sequência receptora humana de região VL pode ser, por exemplo, VKI_O2/JK4.

[00232] Em uma realização, o anticorpo é um anticorpo humanizado com base no anticorpo Z270. Cadeias VH de Z270 humanizadas diferentes são exibidas em SEQ ID N° 171-175 (resíduos de domínio de região variável sublinhados). HumZ270VH6 (SEQ ID N° 171) é baseado em VH5_51; humZ270VH1 (SEQ ID N° 172) é baseado em VH1_18; humZ270VH5 (SEQ ID N° 173) é baseado em VH5_a; humZ270VH7 (SEQ ID N° 174) é baseado em VH1_f; e humZ270VH8 (SEQ ID N° 175) é baseado em VH1_46; todos com segmento J JH6. Cada um desses anticorpos retém ligação de alta afinidade a NKG2A, com baixa probabilidade de reação imunológica de hospedeiro contra o anticorpo, pois os seis resíduos de aminoácidos com terminal C da CDR-H2 de Kabat de cada uma das construções humanizadas são idênticos à cadeia principal receptora humana. Utilizando-se o programa de alinhamento VectorNTI, foram obtidas as identidades de sequências entre humZ270VH1 e humZ270VH5, 6, 7 e 8 a seguir: 78,2% (VH1 x VH5), 79,0% (VH1 x VH6), 88,7% (VH1 x VH7) e 96,0% (VH1 x VH8).

[00233] Em um aspecto, o agente compreende (i) uma região variável de cadeia pesada de qualquer um dentre SEQ ID N° 177-181 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% idêntica e (ii) uma região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 182 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% idêntica. Em um aspecto, o agente compreende (i) uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% idêntica e (ii) uma cadeia leve

que comprehende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 176 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% idêntica. O anticorpo que possui a cadeia pesada de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e uma cadeia leve de SEQ ID N° 176 neutraliza a atividade inibidora de NKG2A, mas não liga substancialmente os receptores de ativação NKG2C, NKGE ou NKG2H. Este anticorpo concorre adicionalmente com HLA-E pela ligação a NKG2A sobre a superfície de uma célula. Em um aspecto, o agente comprehende sequências HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 derivadas da cadeia pesada que possui a sequência de aminoácidos de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175. Em um aspecto da presente invenção, o agente comprehende sequências LCDR1, LCDR2 e/ou LCDR3 derivadas da cadeia leve que possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 176.

CADEIAS PESADAS

[00234] VH6:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWRQMPGKGLEWMGR
IDPYDSETHYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDF
DVGTLYWFFDVWGQQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTC
NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK (SEQ ID N° 171).

[00235] VH1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMG
RIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGY
DFDVGTLYWFFDVWGQQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKY

TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID N° 172).

[00236] VH5:

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKSGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGR
IDPYDSETHYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDF
DVGTLYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTC
 NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID N° 173).

[00237] VH7:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGR
DPYDSETHYAEKFQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYDFD
VGTLYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTCN
 VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLT
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID N° 174).

[00238] VH8:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMG
RIDPYDSETHYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGY

DFDVGTLWFFDWGQGTTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTKY
TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK (SEQ ID N° 175).

[00239] Cadeia leve:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTL
AEGVPSRFSGGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPRTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID N° 176).

REGIÕES VARIÁVEIS DE CADEIA PESADA

[00240] VH6:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGR
IDPYDSETHYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDF
DVGTLWFFDWGQGTTVVS (SEQ ID N° 177).

[00241] VH1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMG
RIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGY
DFDVGTLWFFDWGQGTTVVS (SEQ ID N° 178).

[00242] VH5:

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGR
IDPYDSETHYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDF
DVGTLWFFDWGQGTTVVS (SEQ ID N° 179).

[00243] VH7:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGR

DPYDSETHYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYDFD
VGTLYWFFDVWGQGTTVTVS (SEQ ID N° 180).

[00244] VH8:

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMG
RIDPYDSETHYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGY
DFDVGTLYWFFDVWGQGTTVTVS (SEQ ID N° 181).

[00245] Região variável de cadeia leve:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTL
AEGVPSRFSGS

GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGT PRTFGGGTKVEIK (SEQ ID N° 182).

[00246] Em um aspecto, o anticorpo anti-NKG2A é um anticorpo que comprehende CDR-H1 correspondente aos resíduos 31-35 de SEQ ID N° 171-175, CDR-H2 correspondente aos resíduos 50-60 (opcionalmente, 50-66 quando incluir aminoácidos de origem humana) de SEQ ID N° 171-175 e CDR-H3 correspondente aos resíduos 99-114 (95-102 segundo Kabat) de SEQ ID N° 171-175. Em uma realização, a CDR-H2 correspondente aos resíduos 50-66 de SEQ ID N° 171-175. Opcionalmente, a CDR pode compreender uma, duas, três, quatro ou mais substituições de aminoácidos.

[00247] Em um aspecto, o anticorpo anti-NKG2A é um anticorpo que comprehende CDR-L1 correspondente aos resíduos 24-34 de SEQ ID N° 176, a CDR-L2 correspondente aos resíduos 50-56 de SEQ ID N° 176 e CDR-L3 correspondente aos resíduos 89-97 de SEQ ID N° 176. Opcionalmente, a CDR pode compreender uma, duas, três, quatro ou mais substituições de aminoácidos.

[00248] Em um aspecto, o anticorpo anti-NKG2A é um anticorpo que comprehende CDR-H1 correspondente aos resíduos 31-35 de

SEQ ID N° 171-175, a CDR-H2 correspondente aos resíduos 50-56 (opcionalmente, 50-66) de SEQ ID N° 171-175 e CDR-H3 correspondente aos resíduos 99-114 (95-102 segundo Kabat) de SEQ ID N° 171-175, a CDR-L1 correspondente aos resíduos 24-34 de SEQ ID N° 176, a CDR-L2 correspondente aos resíduos 50-56 de SEQ ID N° 176 e CDR-L3 correspondente aos resíduos 89-97 de SEQ ID N° 176.

[00249] Em um aspecto, o agente compreende sequências HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 derivadas de VH que possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 183. Em um aspecto da presente invenção, o agente compreende sequências LCDR1, LCDR2 e/ou LCDR3 derivadas de VL que possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 184. Em um aspecto, o agente compreende sequências HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 derivadas de VH que possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 183 e sequências LCDR1, LCDR2 e/ou LCDR3 derivadas de VL que possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 184. O anticorpo que possui a cadeia pesada de SEQ ID N° 183 e uma cadeia leve de SEQ ID N° 184 neutraliza a atividade inibidora de NKG2A e também liga os receptores ativadores NKG2C, NKG2E ou NKG2H. O anticorpo não concorre com HLA-E pela ligação a NKG2A sobre a superfície celular (ou seja, é um antagonista não competitivo de NKG2A).

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQSPEKRLEWVAEIS
SGGSYTYYPDTVTGRFTISRDNAKNTLYLEISSLRSEDTAMYCTRHGDYPRF
FDVWGAGTTTVSS (SEQ ID N° 183)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSSSSVSYIYWYQQKPRSSPKPWIYLSNL
ASGVPAR

FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGNPYTFGGGTKEIK (SEQ ID N° 184).

[00250] Em um aspecto, o agente compreende os resíduos de aminoácidos 31-35, 50-60, 62, 64, 66 e 99-108 do domínio pesado variável

(V_H) (SEQ ID N° 183) e os resíduos de aminoácidos 24-33, 49-55 e 88-96 do domínio leve variável (V_L) (SEQ ID N° 184), opcionalmente com uma, duas, três, quatro ou mais substituições de aminoácidos.

[00251] Em um aspecto, o agente é um anticorpo totalmente humano que foi levantado contra o epítopo CD94/NKG2A ao qual se liga qualquer um dos anticorpos mencionados acima.

[00252] Em um aspecto, o agente é o anticorpo anti-NKG2A que possui a região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 178 e a região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 182 ou um anticorpo que possui a cadeia pesada de SEQ ID N° 172 e a cadeia leve de SEQ ID N° 176. O agente pode ser, por exemplo, monalizumab (Innate Pharma S. A., Medimmune e AstraZeneca).

[00253] Apreciar-se-á que, embora possam ser utilizados os anticorpos mencionados acima, outros anticorpos podem reconhecer e ser levantados contra qualquer parte do polipeptídeo NKG2A, desde que o anticorpo cause a neutralização da atividade inibidora de NKG2A. Qualquer fragmento de NKG2A, preferencial mas não exclusivamente NKG2A humano, ou qualquer combinação de fragmentos de NKG2A, por exemplo, pode ser utilizado como imunogêne para levantar anticorpos e os anticorpos podem reconhecer epítópos em qualquer local no polipeptídeo NKG2A, desde que possam fazê-lo em células NK que expressam NKG2A conforme descrito no presente. Opcionalmente, o epítopo é o epítopo especificamente reconhecido pelo anticorpo que possui a cadeia pesada de qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e a cadeia leve de SEQ ID N° 176.

[00254] Em um aspecto, o agente concorre com anticorpo humZ270 descrito na Patente Norte-Americana n° 8.206.709 (cujo relatório descriptivo é incorporado ao presente como referência) na ligação à parte extracelular de receptor CD94/NKG2A humano. A ligação competitiva pode ser

medida, por exemplo, em experimentos BiaCore, nos quais a capacidade dos agentes é medida por meio de ligação da parte extracelular de receptor CD94/NKG2A imobilizado (por exemplo, purificado a partir de células que expressam CD94/NKG2 ou produzidas em um biossistema) saturado com humZ270. Alternativamente, é medida a ligação de agentes a células que expressam naturalmente ou sobre-expressam (por exemplo, após transfecção estável ou transitória) receptor CD94/NKG2A e que foram previamente incubadas com doses saturadas de Z270. Em uma realização, pode-se medir a ligação competitiva utilizando-se os métodos descritos na Patente Norte-Americana nº 8.206.709, por exemplo, determinando-se a ligação a células Ba/F3-CD94-NKG2A por meio de citometria de fluxo, conforme exibido no Exemplo 15 da Patente Norte-Americana nº 8.206.709, cujo relatório descriptivo é incorporado ao presente como referência.

[00255] Formulações de anticorpos:

Pode-se incorporar um anticorpo em uma formulação farmacêutica que o compreende em concentração de 1 mg/ml a 500 mg/ml, em que a mencionada formulação possui pH de 2,0 a 10,0. A formulação pode compreender adicionalmente um sistema tampão, conservante(s), agente(s) de tonicidade, agente(s) quelante(s), estabilizantes e tensoativos. Em uma realização, a formulação farmacêutica é uma formulação aquosa, ou seja, uma formulação que compreende água. Essa formulação é tipicamente uma solução ou suspensão. Em realização adicional, a formulação farmacêutica é uma solução aquosa. A expressão “formulação aquosa” é definida como formulação que compreende pelo menos 50% p/p de água. De forma similar, a expressão “solução aquosa” é definida como solução que compreende pelo menos 50% p/p de água e a expressão “suspenção aquosa” é definida como suspensão que compreende pelo menos 50% p/p de água.

[00256] Em outra realização, a formulação farmacêutica é

uma formulação seca por congelamento, à qual o médico ou o paciente adiciona solventes e/ou diluentes antes do uso.

[00257] Em outra realização, a formulação farmacêutica é uma formulação seca (por exemplo, seca por congelamento ou seca por pulverização) pronta para uso sem dissolução anterior.

[00258] Em um aspecto adicional, a formulação farmacêutica compreende uma solução aquosa desse anticorpo e um tampão, em que o anticorpo está presente em concentração de 1 mg/ml ou acima e a mencionada formulação possui pH de cerca de 2,0 a cerca de 10,0.

[00259] Em outra realização, o pH da formulação encontra-se na faixa selecionada a partir da lista que consiste de cerca de 2,0 a cerca de 10,0, cerca de 3,0 a cerca de 9,0, cerca de 4,0 a cerca de 8,5, cerca de 5,0 a cerca de 8,0 e cerca de 5,5 a cerca de 7,5.

[00260] Em realização adicional, o tampão é selecionado a partir do grupo que consiste de acetato de sódio, carbonato de sódio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, di-hidrogênio fosfato de sódio, hidrogênio fosfato dissódico, fosfato de sódio e tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou suas misturas. Cada um desses tampões específicos constitui uma realização alternativa da presente invenção.

[00261] Em realização adicional, a formulação compreende adicionalmente um conservante farmaceuticamente aceitável. Em realização adicional, a formulação compreende adicionalmente um agente isotônico. Em realização adicional, a formulação também compreende um agente quelante. Em realização adicional da presente invenção, a formulação compreende adicionalmente um estabilizante. Em realização adicional, a formulação compreende adicionalmente um tensoativo. Por conveniência, faz-se referência a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edição, 1995.

[00262] É possível que outros ingredientes possam estar presentes na formulação farmacêutica de peptídeos de acordo com a presente invenção. Esses ingredientes adicionais podem incluir agentes umectantes, emulsificantes, antioxidantes, agentes de volume, modificadores da tonicidade, agentes quelantes, íons metálicos, veículos oleaginosos, proteínas (por exemplo, albumina de soro humano, gelatina ou proteínas) e um zwitterión (por exemplo, aminoácido tal como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Naturalmente, esses ingredientes adicionais não deverão prejudicar a estabilidade geral da formulação farmacêutica de acordo com a presente invenção.

[00263] Composições farmacêuticas que contêm um anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser administradas a pacientes necessitados desse tratamento em diversos locais, tais como locais tópicos, por exemplo pele e locais das mucosas, em locais que evitam absorção, tais como administração em artérias, veias, no coração e em locais que envolvem absorção, tais como administração na pele, sob a pele, em músculos ou no abdômen. A administração de composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção pode ser realizada por meio de diversas vias de administração, tais como subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, lingual, sublingual, bucal, na boca, oral, no estômago e intestino, nasal, pulmonar, tal como por meio dos bronquíolos e alvéolos ou uma de suas combinações, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, retal, ocular, tal como por meio da conjuntiva, uretal e parenteral a pacientes necessitados desse tratamento.

[00264] Formulações de anticorpos apropriadas podem ser também determinadas por meio de exame de experiências com outros anticorpos monoclonais terapêuticos já desenvolvidos. Demonstrou-se que diversos anticorpos monoclonais são eficientes em situações clínicas, tais

como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab) Xolair (Omalizumab), Bexxar (Tositumomab), Campath (Alemtuzumab), Zevalin, Oncolym e formulações similares, que podem ser utilizados com os anticorpos de acordo com a presente invenção. Anticorpos monoclonais podem ser fornecidos, por exemplo, em concentração de 10 mg/ml em ampolas descartáveis de 100 mg (10 ml) ou 500 mg (50 ml), formuladas para administração IV em 9,0 mg/ml de cloreto de sódio, 7,35 mg/ml de di-hidrato citrato de sódio, 0,7 mg/ml de polissorbato 80 e água estéril para injeção. O pH é ajustado em 6,5. Em outra realização, o anticorpo é fornecido em formulação que compreende cerca de 20 mM de citrato de Na e cerca de 150 mM de NaCl, sob pH de cerca de 6,0.

[00265] São também fornecidos kits que incluem uma composição farmacêutica que contém um anticorpo anti-NKG2A e um anticorpo anti-Siglec-9 (opcionalmente, anti-Siglec-7 adicional) e um veículo farmaceuticamente aceitável, em quantidade terapeuticamente eficaz adaptada para uso nos métodos acima. Os kits podem também incluir opcionalmente instruções, por exemplo, que compreendem cronogramas de administração, para permitir que um praticante da medicina (por exemplo, um médico, enfermeiro ou paciente) administre a composição nele contida para administrar a composição a um paciente portador de câncer (por exemplo, tumor sólido). O kit pode também incluir uma seringa.

[00266] Opcionalmente, os kits incluem diversos pacotes das composições farmacêuticas de dose única, cada qual contendo quantidade eficaz do anticorpo anti-NKG2A e/ou anti-Siglec-9 para administração isolada de acordo com os métodos fornecidos acima. Instrumentos ou dispositivos necessários para administração da(s) composição(ões) farmacêutica(s) podem ser também incluídos nos kits. O kit pode, por exemplo, fornecer uma ou mais seringas previamente preenchidas que contêm uma quantidade do anticorpo anti-NKG2A e anti-Siglec-9.

[00267] Em uma realização, a presente invenção fornece um kit de tratamento de câncer em pacientes humanos, em que o kit compreende:

- a. uma dose de anticorpo anti-Siglec-9 que compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de uma cadeia pesada de qualquer um dentre mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE, mAbF, mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 ou mAb6 e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de uma cadeia leve do mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE, mAbF, mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 ou mAb6 correspondente;
- b. uma dose de anticorpo NKG2A; e
- c. opcionalmente, instruções de uso do anticorpo anti-NKG2A e anticorpo anti-Siglec-9 em qualquer um dos métodos descritos no presente.

[00268] Em uma realização, a presente invenção fornece um kit de tratamento de câncer em pacientes humanos, em que o kit compreende:

- a. uma dose de anticorpo anti-NKG2A que compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de uma cadeia pesada que contém a sequência descrita no presente e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de uma cadeia leve que contém a sequência descrita no presente;
- b. uma dose de anticorpo Siglec-9; e
- c. opcionalmente, instruções de uso do anticorpo anti-NKG2A e anticorpo anti-Siglec-9 em qualquer um dos métodos descritos no presente.

[00269] Diagnóstico e tratamento de malignidades:

São também fornecidos métodos de tratamento de indivíduos, notadamente pacientes humanos, por meio da inibição de Siglec-9 e NKG2A (utilizando, por exemplo, um anticorpo anti-Siglec e um anticorpo anti-NKG2A conforme descrito no presente). Em uma realização, a presente invenção fornece o uso de um anticorpo ou fragmento de anticorpo conforme descrito no presente na preparação de uma composição farmacêutica para administração a pacientes humanos. Tipicamente, o paciente sofre ou encontra-se em risco

de câncer ou doenças infecciosas, tais como doenças virais ou bacterianas.

[00270] Em um aspecto, por exemplo, a presente invenção fornece um método de potencialização da atividade da célula imune restrita por Siglec-7 e/ou 9 em indivíduos (por exemplo, portadores de câncer ou doenças infecciosas) em pacientes dele necessitados, que compreende a etapa de administração ao mencionado indivíduo de (i) um anticorpo anti-Siglec-7 e/ou 9 neutralizante e (ii) um anticorpo neutralizante de NKG2A. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo anti-Siglec-7 e/ou 9 humano ou humanizado, que reduz ou evita ativação mediada por ácido siálico dos receptores de Siglec-7 e/ou Siglec-9. Em uma realização, é benéfico o método dirigido ao aumento da atividade desses linfócitos em pacientes portadores de doenças nas quais o aumento da atividade de linfócitos (por exemplo, célula T CD8+ e/ou NK), que envolve, afeta ou é causado por células susceptíveis a lise por células T CD8+ ou NK ou que é causado ou caracterizado por atividade de células T CD8+ ou NK insuficiente, tal como câncer ou doença infecciosa. Em um aspecto, por exemplo, a presente invenção fornece um método de ampliação da atividade (por exemplo, ativação celular, atividade ou imunidade antitumores, produção de citoquinas e proliferação) de células imunes restritas por Siglec-7 e/ou 9, tais como célula NK (por exemplo, célula CD56^{brilhante}), célula T, monócito, célula dendrítica, macrófago (por exemplo, macrófago M2 ou imunossupressor) em pacientes dele necessitados, que compreende a etapa de administração de anticorpos anti-Siglec-7 e/ou 9 neutralizantes de acordo com a presente invenção ao mencionado paciente.

[00271] Em uma realização, os anticorpos de acordo com a presente invenção são utilizados no tratamento de tumores caracterizados pela expressão da enzima ST3GAL6 e/ou ST3GAL1 (ou, por exemplo, alto nível de atividade das enzimas ST3GAL6 e/ou ST3GAL1), opcionalmente sobre-expressão da enzima ST3GAL6 (em comparação com a expressão, por

exemplo, em tecido saudável em indivíduos saudáveis).

[00272] Mais especificamente, os métodos e composições de acordo com o presente são utilizados para o tratamento de uma série de cânceres e outras doenças proliferativas. Como esses métodos operam aumentando a reação imunológica por meio do bloqueio de receptores inibidores sobre linfócitos, eles são aplicáveis a uma variedade de cânceres muito grande. Em uma realização, pacientes humanos tratados com anticorpo anti-Siglec de acordo com a presente invenção são portadores de câncer do fígado, câncer dos ossos, câncer pancreático, câncer da pele, câncer da cabeça ou do pescoço (por exemplo, carcinoma das células escamosas da cabeça e do pescoço), câncer de mama, câncer do pulmão, câncer do pulmão não de células pequenas (NSCLC), câncer da próstata resistente à castração (CRPC), melanoma, câncer do útero, câncer do cólon, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer dos testículos, câncer do útero, carcinoma dos tubos falopianos, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, linfoma não de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireoide, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, câncer da bexiga, câncer do rim ou ureter, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), linfoma do SNC primário, angiogênese de tumores, tumor do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, adenoma da pituitária, sarcoma de Kaposi, câncer epidermoide, câncer das células escamosas, cânceres induzidos pelo ambiente, incluindo os induzidos por amianto, malignidades hematológicas, incluindo, por exemplo, mieloma múltiplo, linfoma de células B, linfoma de Hodgkin/linfoma das células B mediastinais primárias, linfomas não de Hodgkins, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crônica, leucemia

linfoide crônica, linfoma folicular, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de Burkitt, linfoma das células grandes imunoblástico, linfoma linfoblástico B precursor, linfoma das células manto, leucemia linfoblástica aguda, micose fungoide, linfoma de células grandes anaplástico, linfoma de células T, linfoma linfoblástico T precursor e quaisquer combinações dos mencionados cânceres. A presente invenção também se aplica ao tratamento de cânceres metastáticos. Os pacientes podem ser testados ou selecionados para determinar um ou mais dos atributos clínicos descritos acima antes, durante ou depois do tratamento.

[00273] O tratamento com base em anticorpo anti-Siglec pode ser também utilizado para tratar ou prevenir doenças infecciosas, incluindo preferencialmente quaisquer infecções causadas por infecção por vírus, bactérias, protozoários, mofos ou fungos. Esses organismos infecciosos virais incluem, mas sem limitações, hepatite do tipo A, hepatite do tipo B, hepatite do tipo C, gripe, varicela, adenovírus, herpes simplex do tipo I (HSV-1), herpes simplex do tipo 2 (HSV-2), peste bovina, rinovírus, ecovírus, rotavírus, vírus sincitial respiratório, vírus papiloma, citomegalovírus, equinovírus, arbovírus, huntavírus, vírus de Coxsackie, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus da rubéola, vírus da pólio e vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 ou tipo 2 (HIV-1 ou HIV-2). As bactérias constituem outra classe preferida de organismos infecciosos, que incluem, mas sem limitações, os seguintes: Estafilococos; Esteptococos, incluindo *S. pyogenes*; Enterococos; Bacilos, incluindo *Bacillus anthracis* e Lactobacilos; Listeria; *Corynebacterium diphtheriae*; Gardnerella, incluindo *G. vaginalis*; Nocardia; Streptomyces; *Thermoactinomyces vulgaris*; Treponerna; Camlyobacter, Pseudomonas, incluindo *P. aeruginosa*; Legionella; Neisseria, incluindo *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*; Flavobacterium, incluindo *F. meningosepticum* e *F. odoratum*; Brucella; Bordetella, incluindo *B. pertussis* e *B. bronchiseptica*; Escherichia,

incluindo *E. coli*, Klebsiella; Enterobacter, Serratia, incluindo *S. marcescens* e *S. liquefaciens*; Edwardsiella; Proteus, incluindo *P. mirabilis* e *P. vulgaris*; Streptobacilos; Rickettsiaceae, incluindo *R. fickettsii*, Chlamydia, incluindo *C. psittaci* e *C. trachomatis*; Micobactérias, incluindo *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fumatum*, *M. laprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* e *M. leprae*; e Nocardia. Protozoários podem incluir, mas sem limitações, leishmania, kokzidioa e trypanosoma. Parasitas incluem, mas sem limitações, chlamydia e rickettsia.

[00274] As composições de anticorpos podem ser utilizadas para o tratamento de indivíduos, independentemente do resíduo presente na posição 100 em Siglec-9 (referência a SEQ ID N° 2) ou na posição 104 em Siglec-7 (referência a SEQ ID N° 1) nos alelos expressos pelos indivíduos. Siglec-9 que possui lisina na posição 100 (por exemplo, SEQ ID N° 2) representa cerca de 49% da população, enquanto Siglec-9 que possui ácido glutâmico na posição 100 (por exemplo, SEQ ID N° 160) representa cerca de 36% da população. Em uma realização, as composições de anticorpos são utilizadas para tratar indivíduos que possuem lisina na posição 100 em Siglec-9 (referência a SEQ ID N° 2) e indivíduos que possuem ácido glutâmico na posição 100 em Siglec-9. Em uma realização, o mesmo regime de administração é utilizado para tratar indivíduos cujas células (por exemplo, células NK, neutrófilos etc.) expressam lisina na posição 100 em Siglec-9 (referência a SEQ ID N° 2) e indivíduos cujas células expressam ácido glutâmico na posição 100 em Siglec-9. Em uma realização, o regime de administração compreende o mesmo modo de administração, a mesma dosagem e a mesma frequência de administração, independentemente do alelo específico de Siglec-7 e/ou 9 expresso em indivíduos.

[00275] As composições de anticorpos podem ser utilizadas em tratamentos combinados com um ou mais agentes terapêuticos adicionais

diferentes, incluindo agentes normalmente utilizados para o propósito terapêutico específico para o qual o anticorpo está sendo administrado. O agente terapêutico adicional será normalmente administrado em quantidades e regimes de tratamento tipicamente utilizados para aquele agente em monoterapia para a doença específica ou condição sendo tratada. Esses agentes terapêuticos incluem, mas sem limitações, agentes anticâncer e agentes quimioterapêuticos.

[00276] Nos métodos de tratamento, o agente anti-Siglec-9 e o agente neutralizante de NKG2A podem ser administrados separadamente, em conjunto, sequencialmente ou em coquetel. Em algumas realizações, o composto de ligação de抗ígenos é administrado antes da administração do agente neutralizante de NKG2A. O agente anti-Siglec-9 pode ser administrado, por exemplo, cerca de 0 a 30 dias antes da administração do agente neutralizante de NKG2A. Em algumas realizações, um agente anti-Siglec-9 é administrado em cerca de 30 minutos a cerca de 2 semanas, cerca de 30 minutos a cerca de uma semana, cerca de uma hora a cerca de 2 horas, cerca de 2 horas a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 6 horas, cerca de 6 horas a cerca de 8 horas, cerca de 8 horas a um dia ou cerca de 1 a 5 dias antes da administração do agente neutralizante de NKG2A. Em algumas realizações, um agente anti-Siglec-9 é administrado simultaneamente com a administração dos agentes terapêuticos. Em algumas realizações, um agente anti-Siglec-9 é administrado após a administração do agente neutralizante de NKG2A. O agente anti-Siglec-9 pode ser administrado, por exemplo, cerca de 0 a 30 dias após a administração do agente neutralizante de NKG2A. Em algumas realizações, um agente anti-Siglec-9 é administrado em cerca de 30 minutos a cerca de 2 semanas, cerca de 30 minutos a cerca de uma semana, cerca de uma hora a cerca de 2 horas, cerca de 2 horas a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 6 horas, cerca de 6 horas a cerca de 8 horas,

cerca de 8 horas a um dia ou cerca de 1 a 5 dias após a administração do agente neutralizante de NKG2A.

[00277] Em outros aspectos, são fornecidos métodos de identificação de células T e/ou células NK Siglec-7+ e/ou Siglec-9+, tais como células T CD8, células NK CD56^{brilhante}, células NK CD56^{dim}, opcionalmente em cada caso em que as células são células que expressam NKG2A. Pode-se utilizar a determinação da coexpressão de Siglec-7 e/ou Siglec-9 em células T e/ou células NK em métodos de diagnóstico ou prognóstico. Amostras biológicas podem, por exemplo, ser obtidas de indivíduos (por exemplo, de amostra de sangue, tecido de câncer ou adjacente a câncer obtido de pacientes com câncer) e analisadas para determinar a presença de células T e/ou NK Siglec-7 e/ou Siglec-9+. A expressão de Siglec-9 nessas células pode, por exemplo, ser utilizada para identificar indivíduos portadores de células T e/ou NK, tais como células T e/ou NK que se infiltram em tumores, opcionalmente células que expressam NKG2A, que são inibidas por polipeptídeos Siglec-9. A expressão de Siglec-7 e Siglec-9 nessas células pode, por exemplo, ser utilizada para identificar indivíduos portadores de células T e/ou NK, tais como células T e/ou NK que se infiltram em tumores e que são inibidas por polipeptídeos Siglec e polipeptídeos NKG2A. O método pode ser útil, por exemplo, como prognóstico da reação a tratamento com um agente que neutralize Siglec-9 e um agente que neutralize NKG2A. A expressão de Siglec-9 (e, opcionalmente, NKG2A adicional) nessas células pode indicar indivíduos apropriados para tratamento com anticorpos de acordo com a presente invenção.

[00278] Em certos aspectos, é fornecido um método de potencialização e/ou modulação da atividade de linfócitos (por exemplo, células NK e células T CD8+) em pacientes dele necessitados, tal como um método de potencialização da atividade de células NK por meio da modulação de células

NK CD56^{dim} (o principal subconjunto citotóxico) e, opcionalmente, células NK CD56^{brilhante} (a maior parte das células NK em nódulos linfáticos e amídalas e que, mediante ativação, reage principalmente com a produção de citoquinas), em que esse método compreende a administração ao paciente de quantidade eficaz de agente anti-Siglec-9 e agente neutralizante de NKG2A conforme descrito no presente. Em uma realização, o paciente é um paciente que sofre de câncer. O paciente pode, por exemplo, sofrer de câncer hematopoiético, tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, mieloma múltiplo ou linfoma não de Hodgkin. Alternativamente, o paciente pode sofrer, por exemplo, de tumor sólido, tal como câncer colorretal, câncer da cabeça e do pescoço, câncer renal, câncer do ovário, câncer do pulmão, câncer de mama ou melanoma maligno. Em outra realização, o paciente é um paciente que sofre de doença infecciosa.

[00279] Em certos aspectos opcionais, o indivíduo pode ser identificado para tratamento com um agente neutralizante de NKG2A e agente neutralizante de Siglec-9 (opcionalmente também Siglec-7) por meio da determinação, em amostras de tumores do indivíduo, da presença (por exemplo, tecido de tumor e/ou tecido adjacente a tumor) de HLA-E, opcionalmente determinando-se ainda a presença de um ligante de Siglec-9 (e, opcionalmente, também Siglec-7).

[00280] Em certos aspectos opcionais, o indivíduo pode ser identificado para tratamento com um agente neutralizante de NKG2A e agente neutralizante de Siglec-9 (opcionalmente também Siglec-7) por meio da determinação, em amostras de tumores do indivíduo (por exemplo, tecido de tumor e/ou tecido adjacente a tumor), da presença de Siglec-9 (por exemplo, em células dendríticas derivadas de mieloide e/ou em neutrófilos no ambiente de tumor). Em certos aspectos opcionais, o indivíduo pode ser identificado para tratamento com um agente neutralizante de NKG2A e agente neutralizante de

Siglec-7 e Siglec-9, por meio da determinação, em amostras de tumores do indivíduo (por exemplo, tecido de tumor e/ou tecido adjacente a tumor), da presença de Siglec-7 (por exemplo, em células dendríticas derivadas de mieloide e/ou em neutrófilos, por exemplo, no ambiente de tumor).

[00281] Em certos aspectos opcionais, o indivíduo pode ser identificado para tratamento com um agente neutralizante de NKG2A e agente neutralizante de Siglec-9 (opcionalmente também Siglec-7) por meio da determinação, em amostras de tumores do indivíduo (por exemplo, tecido de tumor e/ou tecido adjacente a tumor), da presença de HLA-E (por exemplo, em células de tumor) e, opcionalmente, também Siglec-9 e/ou Siglec-7 (por exemplo, em células dendríticas derivadas de mieloide e/ou em neutrófilos, por exemplo, no ambiente de tumor).

[00282] Em uma realização de qualquer um dos usos terapêuticos ou métodos de prevenção ou tratamento de câncer de acordo com o presente, o tratamento ou prevenção de câncer em indivíduos compreende:

a. determinação da situação de polipeptídeo Siglec-7 e/ou Siglec-9 de células imunes (por exemplo, células dendríticas derivadas de mieloide, neutrófilos, células NK e células T) em tecido de tumor ou tecido adjacente a tumor do indivíduo portador de câncer; e

b. mediante determinação de que polipeptídeos Siglec-7 e/ou Siglec-9 são expressos por células (por exemplo, sobre a sua superfície) em tecido de tumor ou tecido adjacente a tumor do indivíduo, administração ao indivíduo de um agente que neutralize a atividade inibidora de um polipeptídeo NKG2A humano e um agente que inibe um polipeptídeo Siglec-9 (e, opcionalmente, também Siglec-7) humano.

[00283] Em uma realização, a determinação de que uma amostra biológica (por exemplo, uma amostra que compreende células de tumor, tecido de tumor e/ou tecido adjacente a tumor) expressa

proeminente polipeptídeo HLA-E (conforme determinado pela determinação de polipeptídeos ou ácidos nucleicos HLA-E) indica que o indivíduo é portador de câncer que pode ser tratado com um agente que inibe NKG2A em combinação com um agente que inibe polipeptídeo Siglec-9 humano (e, opcionalmente, também Siglec-7).

[00284] Em uma realização de qualquer um dos usos terapêuticos ou métodos de prevenção ou tratamento de câncer de acordo com o presente, o tratamento ou prevenção de câncer em indivíduos compreende:

a. determinação da situação de polipeptídeo HLA-E de células malignas no indivíduo portador de câncer; e

b. mediante determinação de que polipeptídeos HLA-E são expressos por células malignas (tais como células de tumor) (por exemplo, sobre a sua superfície), administração ao indivíduo de um agente que neutralize a atividade inibidora de um polipeptídeo NKG2A humano e um agente que inibe um polipeptídeo Siglec-9 (e, opcionalmente, também Siglec-7) humano.

[00285] Em uma realização de acordo com qualquer dos métodos, a determinação da situação de polipeptídeo HLA-E ou determinação do nível de expressão na etapa (a) compreende a determinação do nível de expressão de um ácido nucleico HLA-E ou polipeptídeo de células malignas em amostras biológicas e comparação do nível com um nível de referência (por exemplo, valor, manchas fracas ou fortes na superfície celular etc.). O nível de referência pode, por exemplo, corresponder a indivíduos saudáveis, indivíduos que não obtêm ou obtêm pouco benefício clínico do tratamento com anticorpo neutralizante de NKG2A (opcionalmente em combinação com um agente que inibe polipeptídeo Siglec-9 humano) ou a indivíduos que obtêm benefício clínico substancial do tratamento com anticorpo neutralizante de NKG2A (opcionalmente em combinação com um agente que inibe um polipeptídeo

Siglec-9 humano). A determinação de que uma amostra biológica expressa polipeptídeo ou ácido nucleico HLA-E em nível mais alto (por exemplo, valor alto, forte mancha na superfície, nível que corresponde ao de um indivíduo que obtém benefício clínico substancial de tratamento com um anticorpo neutralizante de NKG2A, nível que é mais alto que o correspondente a um indivíduo que obtém pouco ou nenhum benefício clínico do tratamento com um anticorpo neutralizante de NKG2A etc.) indica que o indivíduo possui câncer que pode ser tratado com anticorpo anti-NKG2A em combinação com um agente que inibe polipeptídeo Siglec-9 humano, por exemplo, de acordo com os métodos de tratamento descritos no presente.

[00286] Em uma realização, é fornecido um método de identificação de indivíduos portadores de câncer para quem é apropriado o tratamento com um agente anti-NKG2A, em que o método compreende:

- a. determinação da situação do polipeptídeo NKG2A e Siglec-9 de linfócitos infiltrados em tumores (por exemplo, células NK) do indivíduo; e
- b. em que a determinação de que polipeptídeos Siglec-9 e NKG2A são expressos sobre a superfície de uma proporção significativa de linfócitos infiltrados em tumores (por exemplo, células NK) do indivíduo, opcionalmente TILs de um subconjunto previamente definido (por exemplo, células NK, células T CD8), indica que o tratamento com um agente que neutraliza a atividade inibidora de um polipeptídeo NKG2A humano e um agente que inibe um polipeptídeo Siglec-9 humano é apropriado para o indivíduo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

[00287] Subconjunto de células NK humanas que coexpressa Siglec-7 e Siglec-9.

[00288] Dentre os Siglecs relativos a CD33, Siglec-7

(CD328) e Siglec-9 (CD329) compartilham a propriedade de ligação a ácidos siálicos, incluindo glicanos sobre-expressos por células de câncer, e acredita-se que eles funcionem como receptores inibidores nas células imunes nas quais são expressos. Para pesquisar a expressão de Siglecs sobre linfócitos, a distribuição de Siglec-7 e Siglec-9 foi estudada em células NK humanas.

[00289] A expressão de Siglec-7 e Siglec-9 em células NK foi determinada por meio de citometria de fluxo sobre células NK novas purificadas de doadores humanos. A população de NK foi determinada como células CD3- CD56+ (anti-CD3 Pacific blue - BD Pharmingen n° 558124; anti-CD56-PE-Vio770 - Milteny n° 130 100 676). Foram utilizados anticorpo anti-Siglec-7 (clone 194211 - IgG1 APC - R&D Systems n° FAB11381A), anticorpo anti-Siglec-9 (clone 191240 – IgG2A PE - R&D Systems n° FAB1139P) e controles de isótipos IgG1 APC e IgG2A APC. Células NK foram incubadas por 30 minutos com 50 µl de mistura Ab de manchas, lavadas por duas vezes com tampão de manchas e a fluorescência foi revelada com Canto II (HTS).

[00290] Os resultados são exibidos na Figura 1. É exibido um resultado representativo. MFI: média da intensidade de fluorescência. Uma fração significativa (cerca de 44%) de células NK expressou Siglec-7 e Siglec-9, o que sugere que uma grande proporção de células NK pode ser inibida por cada um desses receptores (ou ambos), em função dos ligantes de glicano presentes, por exemplo, sobre células de tumores.

EXEMPLO 2

[00291] Geração de anticorpos anti-Siglec:

Para obter anticorpos anti-Siglec-7 e Siglec-9 humanos, camundongos Balb/c foram imunizados com uma proteína recombinante de domínio extracelular Fc Siglec-7 humana e Fc Siglec-9 humana. Foram realizadas duas imunizações diferentes.

[00292] Em primeira imunização com proteínas Fc Siglec-7

e Fc Siglec-9, camundongos receberam duas injeções de uma emulsão de 30 µg de cada proteína e Adjuvante de Freund Completo, por via intraperitoneal. Os camundongos receberam em seguida amplificação com 7,5 µg de cada proteína, por via intravenosa. Foram realizadas duas fusões diferentes (fusão 1 e 2). Células do baço imunes foram fundidas três dias após o enriquecimento com células B imortalizadas X63.Ag8.653 e cultivadas na presença de células do baço irradiadas. Hibridomas foram colocados em placas em meio que contém metilcelulose semissólido e clones em crescimento foram retirados utilizando-se um aparelho Clonepix 2 (Molecular Devices).

[00293] Conduziu-se segunda imunização, novamente com proteínas Fc Siglec-7 e Fc Siglec-9. Os camundongos receberam três injeções de uma emulsão de 30 µg de cada proteína e Adjuvante de Freund Completo, por via intraperitoneal. Os camundongos receberam em seguida amplificação com 5 µg de cada proteína, por via intravenosa. Foram realizadas três fusões diferentes (fusão 3, 4 e 5). Células do baço imunes foram fundidas três dias após o enriquecimento com células B imortalizadas X63.Ag8.653 e cultivadas na presença de células do baço irradiadas. Hibridomas foram colocados em placas em meio em P96. Proteínas Fc Siglec-7 e Fc Siglec-9 utilizadas nesta imunização (e nos Exemplos a seguir) foram produzidas em células CHO. A proteína Fc Siglec-7 continha a sequência de aminoácidos a seguir:

QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMCVHVRCSFSYPVDSQTDSDPVHGYWFRA
GNDISWKAPVATNNPAWAVQEETRDRFHLLGDPQTKNCTLISRMSDAG
RYFFRMEKGNIKWNYKYDQLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCFQNLTCVPW
ACEQGTPPMISWMGTSVSPLHPSTTRSSVLTLIPQPQHHGTSLTCQVTPGA
GVTTNRITQLNVSYPPQNLTVFQGEGTASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCA
VDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQPSNPLVLELQVHLGDEGEFTCRAQNSLGS
QHVSLNLSLQQEYTGKMRPVSGVLLGAVGGGGSSPKSCDKHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEH

NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL S
 LSPGK (SEQ ID N° 164).

[00294] A proteína Fc Siglec-9 continha a sequência de aminoácidos a seguir:

QTSKLLTMQSSVTQEGLCVHVPCFSYPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANT
 DQDAPVATNNPARAVWEETRDRFHLLGDPHTKNCTL SIRDARRSDAGRYFF R
 MEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQNLTCSPWACEQ
 GTPPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNK
 TVHLNVSYPPQNLMTVFQGDGTVSTVLNGNGSSLPEGQSLRLVCAVDAVD
 SNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPWVHLRDAEFTCRAQNPLGSQ
 QVYLNVSLQSKATSGVTQGGGGSSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLS PGK (SEQ ID
 N° 165).

[00295] Seleção primária: o sobrenadante (SN) de clones em crescimento das duas imunizações foi testado em um teste primário por meio de citometria de fluxo utilizando linhagens de células CHO que expressam huSiglec-7, huSiglec-9 e cynoSiglec. CHO que expressa HuSiglec-7 e cynoSiglec foi manchada com 0,5 µM e 0,05 µM de CFSE, respectivamente. Para seleção de citometria de fluxo, todas as células foram misturadas igualmente e a presença de anticorpos de reação em sobrenadantes foi revelada por anticorpo policlonal (pAb) anticamundongos de cabra marcado Alexa Flúor 647.

[00296] Resultados: 20, 19 e mais de 80 anticorpos foram

selecionados nas fusões correspondentes que se ligam a Siglec-7 e/ou Siglec-9 humanos e/ou Siglec-cyno na fusão 1, 2 e 3/4/5, respectivamente. Diferentes anticorpos anti-Siglec-7, Siglec-9 e Siglec-Cyno reativos e anticorpos anti-Siglec-9 (que não ligaram Siglec-7) das três fusões diferentes foram clonados e produzidos como anticorpos IgG1 humanos quiméricos com uma mutação N297Q de cadeia pesada (numeração EU de Kabat) que resulta em falta de glicosilação N-ligada e ligação reduzida a receptores de Fc_y.

[00297] A Figura 2 exibe resultados representativos de citometria de fluxo para exemplos de anticorpos que se ligam a Siglec-7, mas não Siglec-9 ou Siglec de cynomolgus (paineiro direito), que se ligam a cada um dentre Siglec-7, Siglec-9 e Siglec de cynomolgus (paineiro intermediário) e que se ligam a Siglec-9, mas não Siglec-7 ou Siglec de cynomolgus (paineiro esquerdo).

TABELA 1

[00298] Sequências de Siglec:

Nome	Sequência de referência NCBI	Sequência (AA)
Siglec-7 humano	NM_014385.3; NP_055200.1	QKSNRKDYSLTMQSSVTQEGMCVHVRCSFSYPV DSQTDSDPVHGYWFRAGNDISWKAPVATNNPAW AVQEETRDRFHLLGDPQTKNCTL SIRDARMSDAGR YFFRMEKGNIKWNYKYDQLSVNVNTALTHRPNLIPG TLESGCFQNLTCSCPWACEQGTTPPMISWMGTSVS PLHPSTTRSSVLTLIPQPQPHHGTSLTCQVTLPGAGV TTNRTIQLNVSYPPQNLTVFVQGEGETASTALGNS SSL SVLEGQSLRLVCADVDSNPPARLSWTWRSLTY PSQPSNPLVLELQVHLGDEGEFTCRAQNSLGSQH VSLNLSLQQEYTGKMRPVSGVLLGAVGGAGATAL VFLSFCVIFIVVRSCRKKSARPAADVGDIGMDANTI RG SASQGNLTESWADDNPRHHGLAAHSSGEEREI QYAPLSFHKGEQPDLSGQEATNNEYSEIKIPK (SEQ ID N° 150)
Siglec-9 humano	NM_014441.2; NP_055256.1	QTSKLLTMQSSVTQEGLCVHVPCSFYPSHGWIY PGPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWE ETRDRFHLLGDPHTKNCTL SIRDARRSDAGRYFFR MEKGSIKWNYKHHRLSVNVNTALTHRPNLIPGTLES GCPQNLTCSCPWACEQGTTPPMISWIGTSVSPLDP STTRSSVLTLIPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNK TVHLNVSYPPQNLMTVFQGDGTVSTVLNGNGSSL LPEGQSLRLVCADVDSNPPARLSWRGLTLCP SQPSNPGVLELPWVHLRDAAEFTCRAQNPLGSQQ VYLNVSLQSKATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCV

Nome	Sequência de referência NCBI	Sequência (AA)
		IFVVVRSCRKKSARPAAGVGDTGIEDANAVRGASASQGPLTEPWAEDSPPDQPPPASARSSVGEHELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (SEQ ID N° 151)
Siglec-3 humano	NM_001772.3; NP_001763.3	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISGDSPVATNKLDQEVEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTGIFPGDGSGKQETRAGVVAHGAGAGTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGASPKHQKKSKLHGPTETSSCSGAAPTVEMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID N° 152)
Siglec-5 humano	NM_003830.3	EKPVYELQVQKS梧TVQEGLCVLVPCSFSYPWRSWYSSPPLYVYWF RDGEIPYYAEVVA TNNPD RRVKPE TQGRFRLLGDVQKKNC SLSIGDARMEDTGSYFFRVERGRDVKYSYQQNKLNEVTALIEKPDIH FLEPLES GRPTRLSCSLPGSCEAGPPLTF SWTGNALSP LDPE TTRSELTLP RPEDHGTNLTCQMKRQGAQVTTER TVQLNVSYAPQTITIFRN GIALEILQNTSYLPVLEGQ ALRLLCDAPS NPPAHL SWFQGSPALNATPISNTGIL ELRRVRSAEEGGFTCRAQHPLGFLQIFLNL SVYSLP QLLGPSCSWEAEGLHCRC SFRARPAPSLCWRLEE KPLEGNSSQGSFKVN SSSAGPWANSS LILHGG LSS DLKVSKCAWI YGSQSGSVLLLQGRSNL GTGVPA ALGGAGVM ALLCICLCLIFFLIVKARRKQAAGRPEK MDDED PIMGTITSGSRKKPWP DSGDQASPPGDA PPLEEQKELHYASLSFSEMKSREPKDQEAPSTTEY SEIKTSK (SEQ ID N° 153)
Siglec-6 humano	NM_198845.4	QERRFQLEGPESLTVQEGLCVLVP CRLPTTLPASY YGYGYWFLEGADVPVATNDPDEEVQEETRGRFHL LWDP RRKNC SLSIRDARRD NAAYFFRLKSKWMK YGYTSSKLSVRVMA LTHRPNISIPGTLES GHPSNLT CSV PWVCEQGTPPIFSWMSAAPTSLGPRTTQSSV LTITPRPQDHSTNLTCQVTFPGAGVTMERTIQLNVS SFKILQNTSSLPVLEGQALRLLCADC GNPPAHL SW FQGF PALNATPISNTGVLELPQVGSAEEGDFTCRA QHPLGSLQISLSLFVHWKPEGRAGGV LGAVWGASI TTLVFLCVCFCIFRVKTRRKKAAPVQNTDDVN PVM VSGSRGHQHQF QTGIVSDHPAEGP ISEDEQELHY AVLHFHKVQPQEPKVTDTEYSEIKIHK (SEQ ID N° 154)
Siglec-8 humano	NM_014442.2	MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFS YPQDGWTSDPVHGYWF RAGDRPYQDAPVATNN PDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRD KGSYFFRLERGSMKWSYKSQLNYKTQQLSVFVTAL THR DILILGTLES GH SRLNLTCSVPWACKQGT PPMI SWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTC QVTLPGTGVT TSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA TASTALNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLS WTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTC RAQNAQGSQHISLSLQNEG TGT SRPV SQVTLAA

Nome	Sequência de referência NCBI	Sequência (AA)
		VGGAGATALAFLSFCIIFIIVRSCKKSARPAAGVGD TGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPA VAPSSGEEGELHYATLSFHVKVPQDPQGQEATDS EYSEIKIHKRETAETQACLRNHNPSKEVRG (SEQ ID N° 155)
Siglec-10 humano	NM_033130.4	MDGRFWIRVQESVMVPEGLCISVPCSFSYPRQDW TGSTPAYGYWFKAFTETTKGAPVATNHQSREVERM STRGRFQLTGDPAKGNCNSLIRDAQMDESQYFF RVERGSYVRYNFNMNDGFFLKVTALTQKPDVYIPET LEPGQPVTVICVFNWAFEECPPPSFSWTGAALSSQ GTKPTTSHFSVLSFTPQDHNTDLTCHVDFSRKG VSVQRTVRLRVAYAPRDLVISIRDNTPALEPQPQG NVPYLEAQKGQFLRLCAADSQPPATLSWVLQNR VLSSHPWGPRPLGLELPGVKAGDSGRYTCRAEN RLGSQQQRALDLSVQYPHENLRVMVSQANRTVLEN LNGNTSLPVLEGQSQLCLVCVTHSSPPARLSWTQR GQVLSPSQPSDPGVLELPRVQVEHEGEFTCHARH PLGSQHQVSLSLSVHYSRKLLGPSCSWEAEGLHCS CSSQASPAPSRLWWLGEELLEGNSQDSFEVTPS SAGPWANSSLSLHGGLSSGLRLRCEAWN VHGAQ SGSILQLPDKKGLISTAFSNGAFLGIGITALLFLCLALI IMKILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGP LAQKRNQKATPNSPRTPPLPGAPSPESKKNQKKQ YQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFGV RPRPEARMPKGQTADYAEVKFQ (SEQ ID N° 156)
Siglec-11 humano	NM_052884.2	NKDPSYSLQVQRQVPVPEGLCVIVSCNLSPRDG WDESTAAYGYWFKGRTSPKTGAPVATNNQSREVERM MSTRDRFQLTGDPGKGSCSLIRDAQREDEAWYF FRVERGSRVRHSFLSNAFFLKVTALTQKPDVYIPET LEPGQPVTVICVFNWAFKKCPAPSFSWTGAALSPR RTRPSTSHFSVLSFTPSPQDHNTDLTCHVDFSRKG VSAQRTVRLRVAYAPKDLIIISHDNTSALELQGNVI YLEVQKGQFLRLCAADSQPPATLSWVLQDRVLSS SHPWGPRTLGLELRGVRAGDSGRYTCRAENRLGS QQQALDLSVQYPHENLRVMVSQANRTVLENLGNG TSLPVLEGQSQLRLVCVTHSSPPARLSWTRWGQTV GPSQPSDGVLELPPIQMEHEGEFTCHAQHPLGS QHVSLSLSVHYPQPLLGPSCSWEAEGLHCS ASPAPSLRWLGEELLEGNSQGSFEVTPSSAGP WANSSLHGGLSSGLRLRCKAWN VHGAQSGSVF QLLPGKLEHGGGLGLGAALGAGVAALLAFCSCLVV FRVKICRKEARAKRAAAEQDVPSTLGPISQGHQHEC SAGSSQDHPPPAGATYTPGKGEELHYASLSFQ GLRLWEPADQEAPSTTEYSEIKIHTGQPLRGPGFG LQLEREMSGMVPK (SEQ ID N° 157)
Siglec-12 humano	NM_053003.3	KEQKDYLLTMQKSVTVQEGLCVSVLCFSYSPQNG WTASDPVHGWFAGDHVSRNIPVATNNPARAVQ EETRDRFHLLGDPQNKDCTLSIRDTRSDAGTYVF CVERGNMKWNYKYDQLSVNVTASQDLLSRYRLEV PESVTQEGLCVSVPCSVLYPHYNWTASSPVYGS WFKEGADIPWDIPVATNTPSGKVQEDTHGRFLLLG DPQTNNCSLSIRDARKGDGKYYFQVERGSRKWN YIYDKLSVHVTALTHMPTFSIPGTLESGHPRNLTC VPWACEQGTPPTITWMGASVSSLPTITRSSMLSLI PQPQDHGTSLTCQVTLPAGVTMTRAVRLNISYPP

Nome	Sequência de referência NCBI	Sequência (AA)
		QNLTMTVFQGDGTASTTLRNGSALSVLEGQSLHLV CAVDSNPPARLSWTWGSLTLSPSQSSNLGVLELP RVHVKDEGEFTCRAQNPLGSQHSLSLSLQNEYTG KMRPISGVTLGAFGGAGATALVFLYFCIIFVVVRSC RKKSARPAVGVDGTGMEDANAVRGASASQGPLIES PADDSPPHAPPALATPSPEEGEIQYASLSFHKAR PQYPQEQAIGYEYSEINIPK (SEQ ID N° 158)
Siglec de Cynomolgus	XM_005590087.1	QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCSFSYPW YGWISSDPVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARA VREDTRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARSSDAGTY FFRVETGKTKWNYKYAPLSVHVTALTHRPNILIPGT LESGCPRNLTCVPWACEQGTAPMISWMGTSVSP LDPSTTRSSVLTLPQPQDHGTSLTQVTFPGASVT TNKTIHLNVSYPPQNLMTVFQGNDTVSIVLGNSS VSVPEGPSLRLVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLCPS QPSNPGVLELPVHRLDEEEFTCRAQNLLGSQQV SLNVLQSKATSGLTQGAVGAGATALVFLSFCVIFV VVP (SEQ ID N° 159)
Alelo K100E/ A315E de Siglec-9 humano		QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFYPSHGWIY PGPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWE ETRDRFHLLGDPHTENCTLSIRDARRSDAGRYFFR MEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLES GCPQNLTCVPWACEQGTTPPMISWIGTTSVPLDP STTRSSVLTLPQPQDHGTSLTQVTFPGASVTTNK TVHLNVSYPPQNLMTVFQGDTVSTVLGNSSLS LPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPS SQPSNPGVLELPVHRLDEAEFTCRAQNPLGSQQV VYLNVLQSKATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCV IFVVVRSCRKKSARPAAGVGDTGIEDANAVRGASAS QGPLTEPWAEDSPPDQPPPASARSSVGEHELQYA SLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (SEQ ID N° 160)
Domínio similar a Ig conjunto V N-terminal de Siglec-9		MEWSWVFLFFLSVTGVHSGKIPNPLLGLDSTQT SKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFYPSHGWIYP PVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWEET RDRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRME KGSIKWNYKHHRLSVNVTATSGVTQGVVGGAGA TALVFLSFCVIFVVVRSCRKKSARPAAGVGDTGIED ANAVRGASASQGPLTEPWAEDSPPDQPPPASARSS VGEHELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEI KIHR (SEQ ID N° 161)
Domínio 1 do tipo C2 similar a Ig de Siglec-9 humano		MEWSWVFLFFLSVTGVHSGKIPNPLLGLDSTLT HRPNILIPGTLESGCPQNLTCVPWACEQGTTPMI SWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLPQPQDHGTSLTQ VTFPGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLMTVFQGDGT VATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVVRSCR KKSARPAAGVGDTGIEDANAVRGASASQGPLTEP AEDSPPDQPPPASARSSVGEHELQYASLSFQMVK PWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (SEQ ID N° 162)
Domínio 2 do tip C2 similar a Ig de Siglec-9 humano		MEWSWVFLFFLSVTGVHSGKIPNPLLGLDST VLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSL SWRGLTLCPSQPSNPGVLELPVHRLDAEFTCR AQNPLGSQQVYLNVLQSKATSGVTQGVVGGAGA TALVFLSFCVIFVVVRSCRKKSARPAAGVGDTGIED

Nome	Sequência de referência NCBI	Sequência (AA)
		ANAVRG SASQGPLTEPWAEDSPPDQPPPASARSS VGEGEL QYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEI KIHR (SEQ ID N° 163)

EXEMPLO 3

[00299] Ligação a Siglecs relativos a CD33:

Siglecs relativos a CD33 que compartilham similaridade de sequências com Siglec-7 e 9 são geralmente divididos em dois grupos, um primeiro subconjunto composto de Siglec-1, 2, 4 e 15 e o grupo relativo a CD33 de Siglecs que inclui Siglec-3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 e 16. Como outros Siglecs relativos a CD33 possuem funções biológicas diferentes e/ou não se acredita que sejam envolvidos em acompanhamento de tumores, os anticorpos foram adicionalmente selecionados para determinar se é possível obter anticorpos Siglec-7/9 reativos que não se ligam a outros Siglecs relativos a CD33.

[00300] Foram geradas células que expressam Siglec-3, 5, 6, 8, 10, 11 e 12 e um subconjunto representativo dos anticorpos Siglec-7/9 reativos foi testado por meio de citometria de fluxo para ligação às células. Sequências de aminoácidos e referências Genbank para diferentes Siglecs utilizados no presente são exibidos na Tabela 1 acima.

[00301] Resumidamente, foram utilizadas linhagens de células CHO que expressam HuSiglec (que expressaram um dos Siglecs). Para seleção por citometria de fluxo, os anticorpos foram incubados por uma hora com cada linhagem de células CHO que expressam HuSiglec (linhagem de células CHO HuSiglec-3, linhagem de células CHO HuSiglec-5, linhagem de células CHO HuSiglec-6, linhagem de células CHO HuSiglec-8, linhagem de células CHO HuSiglec-10, linhagem de células CHO HuSiglec-11 e linhagem de células CHO HuSiglec-12), lavados por duas vezes em tampão de manchas, revelados por anticorpo policlonal anticamundongos de cabra (pAb) marcado com PE, lavado por duas vezes com tampão de manchas e manchas foram obtidas em um

citômetro HTFC e analisadas utilizando-se o software FlowJo.

[00302] Os resultados demonstraram que nenhum dos anticorpos anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE e mAbF ligou-se a nenhum dos Siglecs-3, 5, 6, 7, 8, 10, 11 ou 12.

[00303] Os resultados demonstraram que alguns anticorpos Siglec-7/9 reativos podem ser capazes de também ligar-se a Siglec-12 ou Siglec-6 além de Siglec-7 e 9. mAb1, mAb2 e mAb3 ligaram-se a Siglec-12 além de Siglec-7 e 9, enquanto mAb3, mAb4, mAb5 e mAb6 não se ligaram a Siglec-12. Nenhum dos exemplos de anticorpos mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 ou mAb6 ligou-se a nenhum dos Siglecs-3, 5, 6, 8, 10 ou 11.

EXEMPLO 4

[00304] Titulação de anticorpos para ligação a Siglecs:

A ligação de anticorpos sobre Siglec-7 humano, Siglec-9 humano e Siglec-9 de cynomolgus foi testada por meio de experimentos de titulação por citometria de fluxo sobre células de CHO transfetadas com Siglec-7 humano e Siglec-9 humano e Siglec-9 de cynomolgus. As células foram incubadas por uma hora em Tampão de Manchas (SB) com anticorpos primários a 20 µg/ml e uma série de diluição de 1:5. Elas foram lavadas por três vezes com SB, incubadas em seguida por 30 minutos com PE de IgG anti-humano F(ab')² de cabra (Fc) (Beckman Coulter n° IM05510) e lavadas por duas vezes com SB. A fluorescência foi revelada com citômetro HTFC Intellicyt.

[00305] Concluiu-se que seis anticorpos exibidos abaixo das cinco fusões nas duas imunizações possuem afinidade de ligação comparável para Siglec-7 humano e Siglec-9 humano conforme expresso por células e, adicionalmente, para Siglec de cynomolgus. Os valores EC₅₀ (µg/ml) para ligação para cada anticorpo são exibidos abaixo.

		mAb1	mAb2	mAb3	mAb4	mAb5	mAb6
EC ₅₀	Siglec-7	0,21	0,17	0,22	0,17	0,22	0,33

		mAb1	mAb2	mAb3	mAb4	mAb5	mAb6
(μ g/ml)	Siglec-9	0,11	0,08	0,23	0,28	0,26	0,31
	Siglec-Cyno	0,67	0,53	0,85	0,17	0,14	0,17

EXEMPLO 5

[00306] Afinidade de ligação de Siglec-9 por meio de Ressonância de Plasma de Superfície (SPR).

[00307] Reagentes e procedimento geral Biacore® T100:

Foram realizadas medições de SPR em um aparelho Biacore® T200 (Biacore® GE Healthcare) a 25 °C. Em todos os experimentos Biacore®, HBS-EP+ (Biacore® GE Healthcare) e 10 mM de NaOH serviram de tampão de condução e tampão de regeneração, respectivamente. Sensogramas foram analisados com software de avaliação Biacore® T200. Proteínas multiméricas Siglec-9 e 7 humanas foram clonadas, produzidas e purificadas em Innate Pharma.

[00308] Imobilização de Proteína A:

Proteínas foram covalentemente imobilizadas em grupos carboxila na camada de dextrano em um Chip Sensor CM5. A superfície do chip foi ativada com EDC/NHS cloridrato de (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiamida e N-hidroxissuccinimida (Biacore®, GE Healthcare). As proteínas foram diluídas a 10 μ g/ml em tampão de acoplamento (10 mM de acetato, pH 4,2 e 5,0) e injetadas até atingir-se o nível de imobilização apropriado (ou seja, 600 a 2000 RU). A desativação dos grupos ativados remanescentes foi realizada utilizando-se 100 mM de etanolamina sob pH 8 (Biacore®, GE Healthcare).

[00309] Estudo de afinidade:

O estudo de afinidade foi conduzido de acordo com um protocolo cinético padrão recomendado pelo fabricante (assistente cinético Biacore® GE Healthcare). Diluições em série de fragmentos de Fab de anticorpo anti-Siglec-

9 e 7/9 que variam de 600 nM a 0,975 nM foram sequencialmente injetadas sobre as proteínas Fc Siglec-7 e Fc Siglec-9 imobilizadas e mantidas em dissociação por dez minutos antes da regeneração. Os conjuntos de sensogramas completos foram instalados utilizando-se o modelo de ligação cinética 1:1. Afinidades monovalentes e constantes de velocidade de associação e dissociação cinética são exibidas na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2

Ligação de Fab sobre proteína Siglec-9 Fc		
FAB	KD (nM) (ligação 1:1)	Koff ($^{10-3}$) 1/S
Fab.A (Fab de mAbA)	0,04	0,025
Fab.B (Fab de mAbB)	0,37	0,31
Fab.C (Fab de mAbC)	0,55	0,43
Fab.D (Fab de mAbD)	4,12	0,11
Fab.E (Fab de mAbE)	1	1,9
Fab.F (Fab de mAbF)	1	0,46
Fab1 (Fab de mAb1)	0,4	0,16
Fab2(Fab de mAb2)	0,8	0,17
Ligação de Fab sobre proteína Fc de Siglec-7		
Fab	KD (nM) (ligação 1:1)	Koff ($^{10-3}$) 1/S
Fab1	0,06	0,04
Fab2	0,07	0,04

EXEMPLO 6

[00310] Titulação sobre células dendríticas derivadas de monócitos.

[00311] Geração de células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs):

Células dendríticas derivadas de monócitos foram geradas a partir de células mononucleares do sangue periférico. PBMCs foram isoladas de camadas leucoplaquetárias, obtidas de doadores saudáveis. Monócitos foram purificados utilizando-se o Kit de Isolamento de Monócitos II (Miltenyi Biotec) e

diferenciados em moDC por um total de seis dias em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 10% de FBS desativado (GIBCO), Glutamina (GIBCO), MEM NEAA (GIBCO), piruvato de sódio (GIBCO), IL-4 (20 ng/ml) (Peprotech) e GM-CSF (400 ng/ml) (Miltenyi Biotec). Células foram cultivadas em um incubador de CO₂ umedecido a 37 °C e as citoquinas foram renovadas no dia 4.

[00312] moDC foram dessialiladas por duas horas com 25 mU de neuraminidase (Roche Diagnostics). A dessialilação foi controlada antes e depois do tratamento com neuraminidase: células moDCs foram incubadas por uma hora em Tampão de Manchas (SB) com Fc Siglec-7 de camundongo (IPH) e proteína recombinante Fc Siglec-9 de camundongo (IPH) a 10 µg/ml, lavadas por duas vezes com SB, incubadas por 30 minutos com PE anti-IgG de camundongo F(ab')2 de cabra (Fc) (Jackson ImmunoResearch), lavadas por duas vezes com SB e a fluorescência foi revelada com Canto II (HTS).

[00313] Titulações:

A ligação sobre moDCs e moDCs tratadas com neuraminidase foi testada em um experimento de titulação por meio de citometria de fluxo. As células foram incubadas por uma hora em Tampão de Manchas (SB) com anticorpos primários a 10 µg/ml e uma série de diluição de 1:10. Elas foram lavadas por duas vezes com SB, incubadas em seguida por 30 minutos com PE anti-IgG humano F(ab')2 de cabra (Fc) (Jackson ImmunoResearch) e lavadas por duas vezes com SB. A fluorescência foi revelada com citômetro HTFC Intellicyt.

[00314] Resultados:

A EC₅₀ foi altamente aprimorada (10 vezes) após tratamento com neuraminidase, o que sugere que Siglec-9 expresso sobre moDCs foi acionado em interação cis com seus ligantes de ácido siálico antes do tratamento com neuraminidase. O nível de fase estável, entretanto, não é modificado, o que

sugere que os anticorpos com alta afinidade podem ligar todas as conformações de Siglec-9 (ligado e não ligado) sobre a superfície celular e inibir interações cis e sinalização em monoDCs, bem como em outros tipos celulares (por exemplo, células NK, células T CD8, monócitos e macrófagos M1 e M2). Os resultados são exibidos na Figura 3 para anticorpos mAbA, mAbC e mAbD em moDC representativos (painele esquerdo) e moDC tratada com neuramidase (painele direito), acompanhados pelos seus valores EC₅₀ correspondentes.

EXEMPLO 7

[00315] Avaliação da capacidade de anticorpos de neutralizar a atividade de Siglec em células NK:

Anticorpos anti-Siglec-7/9 testados na primeira e na segunda imunização foram testados para bloqueio da atividade de Siglec em um teste de ativação de células NK utilizando células NK primárias (células NK novas purificadas de doadores humanos, incubadas por uma noite a 37 °C antes do uso). O aumento da expressão de CD137 em 24 horas é correlacionado à ativação de diversos linfócitos que incluem células NK (Kohrt et al (2011), *Blood* 117 (8): 2423-2432). O efeito de anticorpo anti-Siglec-7/9 e dessialilação de células alvo sobre a ativação de células NK foi determinado por meio de análise da expressão de CD137 sobre células NK por meio de citometria de fluxo. Cada um dos mAbs anti-Siglec-7/9 mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 e mAb6 induziu aumento da expressão de CD137 após 24 horas.

[00316] Os efeitos de anticorpos anti-Siglec-7/9 foram estudados em seguida por meio de testes de citotoxicidade (^{Cr}⁵¹) com linhagem de células efetoras Siglec-9* YTS (a linhagem de células NK humana YTS transfetada com Siglec-9 humano) como efetora e linhagem de células de Ramos como alvo. Este teste mede a citotoxicidade da linhagem de células Siglec-9* YTS por meio de quantificação direta da lise de células alvo

carregadas com ^{51}Cr . Resumidamente, as células alvo são marcadas em primeiro lugar com isótopo ^{51}Cr radioativo e coincubadas em seguida por quatro horas a 37 °C com células efetoras. Durante esse período, células alvo que são sensíveis a células YTS são lisadas liberando-se ^{51}Cr no meio. O ^{51}Cr no sobrenadante recuperado é medido por meio de contagem de cintilação de líquidos. Os resultados obtidos permitem a avaliação do percentual de lise de células alvo por células NK. O teste foi conduzido em placas com 96 cavidades em U em RPMI completo, 200 μl final/cavidade, com razão E:T 5/1. Anticorpos anti-Siglec-7/9 e isótipo controle foram adicionados a 10 $\mu\text{g/ml}$ e uma série de diluição de 1:10.

[00317] Cada um dos mAbs anti-Siglec-7/9 mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 e mAb6 induziu aumento da citotoxicidade de Siglec-9* YTS em forma dependente de dosagem. Como controle, este efeito não foi observado sobre linhagem celular de YTS do tipo selvagem (sem expressão de Siglec-9). De forma similar, cada um dos mAbs anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE e mAbF induz aumento da citotoxicidade de Siglec-9* YTS em forma dependente de dosagem. A Figura 4 exibe indução dependente de dosagem do aumento da citotoxicidade de Siglec-9* YTS entre anticorpos reativos a Siglec-7 e 9 (Figura 4B) e entre os anticorpos monoespecíficos Siglec-9 (sem ligação a Siglec-7) (Figura 4A).

EXEMPLO 8

[00318] Estudo detalhado da neutralização de Siglec-9 em células NK humanas primárias (baixa expressão de Siglec-9):

Consideramos a possibilidade de que a incapacidade dos anticorpos anteriores de neutralizar Siglec-9 em células NK poderá estar relacionada a diferenças da expressão de Siglec-9 em células NK primárias em comparação, por exemplo, com neutrófilos e outras células que expressam níveis muito mais altos de Siglec-9 na sua superfície e Siglec-7 expresso em

diferentes subconjuntos de células NK. A fim de investigar se poderão ser obtidos anticorpos que neutralizem Siglec-9 em células NK, estudamos e selecionamos anticorpos em células NK primárias a partir de uma série de doadores humanos, fechados sobre Siglec-9 por meio de citometria de fluxo. O efeito de anticorpos anti-Siglec-9 foi estudado por meio de citotoxicidade, determinando-se a lise de células de tumor em um teste de liberação de ^{51}Cr clássico e por testes de ativação, determinando-se a expressão na superfície de CD137 sobre células NK. Em cada caso, células NK primárias (na forma de células NK novas purificadas de doadores) foram utilizadas como células efetoras e linhagem de células de câncer colorretal HT29 foi utilizada como alvo.

[00319] Parte 1: teste de citotoxicidade - células de tumores HT29 x NK purificadas em dois doadores humanos.

[00320] O teste de citotoxicidade mediou a citotoxicidade de células NK por meio de quantificação direta da lise de células alvo carregadas com ^{51}Cr . Resumidamente, as células alvo foram marcadas em primeiro lugar com isótopo ^{51}Cr radioativo e coincubadas em seguida por quatro horas a 37 °C com células efetoras. Durante esse período, células alvo que são sensíveis a células NK foram lisadas, liberando ^{51}Cr para o meio. O ^{51}Cr no sobrenadante recuperado foi medido por meio de contagem de cintilação de líquidos. Os resultados obtidos permitem a avaliação do percentual de lise de células alvo por células NK. O teste foi conduzido em placas com 96 cavidades em U em RPMI completo, 200 μl final/cavidade, com razão E:T 8/1. Anticorpos anti-Siglec-9 e isótipo controle foram adicionados a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

[00321] Cada um dos anticorpos anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE e mAbF e anticorpos anti-Siglec-7/9 mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 e mAb6 induziu aumento da citotoxicidade de células NK. A Figura 5 é uma figura representativa que exibe o aumento da citotoxicidade de células NK primárias mediada pelo anticorpo mAbA, mAbC, mAbD, mAbE e mAbF em

dois doadores humanos diferentes (doadores D1 (painel esquerdo) e D2 (painel direito)).

[00322] Parte 2: teste de ativação (CD137) - Comparação de mAb, NK purificado x HT29, em um único doador humano:

O efeito dos anticorpos anti-Siglec-7/9 e anti-Siglec-9 sobre a ativação de células NK foi determinado por meio de análise da expressão de CD137 sobre células NK positivas para Siglec-9 por meio de citometria de fluxo. Células efetoras foram células NK primárias (células NK novas purificadas de doadores, incubação por uma noite a 37 °C antes do uso) e células alvo (linhagem celular HT29) foram misturadas em razão 1:1. O teste CD137 foi conduzido em placas com 96 cavidades em U em RPMI completo, 200 µl final/cavidade. Anticorpos foram previamente incubados por 30 minutos a 37 °C com células efetoras e, em seguida, células alvo foram coincubadas por uma noite a 37 °C. As etapas seguintes foram: 3 min de centrifugação a 500 g; lavagem por duas vezes com Tampão de Manchas (SB); adição de 50 µl de mistura Ab de manchas (anti-CD3 Pacific blue – BD Pharmingen; anti-CD56-PE-Vio770 (Miltenyi); anti-CD137-APC (Miltenyi), anti-Siglec-9 K8-PE (Biolegend); 30 min de incubação a 4 °C; lavagem por duas vezes com SB; pelota novamente suspensa com SB; e fluorescência revelada com Canto II (HTS).

[00323] Os controles negativos foram células NK x HT29 isoladamente e na presença de isótipo controle. A Figura 6 é uma figura representativa que exibe aumento do percentual de células NK positivas para Siglec-9 que expressam CD137 mediado por diversos anticorpos anti-Siglec-9 e anti-Siglec-7/9 mAbA, mAbB, mAbF, mAb6 e mAb4 em um doador humano. Como controle, o percentual de células NK negativas para Siglec-9 que expressam CD137 não foi afetado por esses anticorpos. Como se pode observar na figura, os anticorpos anti-Siglec-9 restauraram totalmente a citotoxicidade de células NK humanas primárias que expressam Siglec-9 até o nível observado

em células NK humanas primárias negativas para Siglec-9 do mesmo doador.

[00324] Parte 3: teste de ativação (CD137) – NK purificada x HT29, mAbA e mAb1 em seis doadores humanos:

Experimentos foram reproduzidos com seis doadores, utilizando-se um anti-Siglec-9 (mAb.A) e um anti-Siglec-7/9 (mAb1). Na ausência de anticorpos (a configuração “média”), o percentual de NK que expressa CD137 variou entre os doadores de 6% a 27% (vide a Figura 7, painel esquerdo). Os dados foram normalizados para que fossem alteração relativa em comparação com o valor médio controle de cada experimento: $((X - X_{\text{médio}})/X_{\text{médio}}) (\%)$. Conforme exibido na Figura 7, mAbA e mAb1 induziram aumento do percentual de NK CD137+ Siglec-9+ (Figura 7, painel central) e não do percentual de NK CD137+ Siglec-9- (Figura 7, painel direito).

EXEMPLO 9

[00325] Titulação sobre células NK primárias:

A ligação de anticorpos sobre células NK humanas purificadas novas foi testada por meio de experimento de titulação por citometria de fluxo. As células foram incubadas por uma hora em Tampão de Manchas (SB) com anticorpos primários a 10 µg/ml e uma série de diluição de 1:10. Elas foram lavadas por três vezes com SB e incubadas em seguida por 30 minutos com PE anti-IgG humano F(ab')² de cabra (Fc) (Jackson ImmunoResearch). Manchas foram obtidas em BD FACS Canto II e analisadas utilizando-se o software FlowJo. Os valores EC₅₀ são exibidos na tabela abaixo em µg/ml (calculados utilizando-se enquadramento logístico com quatro parâmetros).

	EC ₅₀ médio (µg/ml) - 4 doadores
mAb1	0,05
mAb2	0,07
mAb3	0,19
mAb4	0,61
mAb5	1,27

	EC ₅₀ médio (µg/ml) - 4 doadores
mAb6	1,30
mAbA	0,08
mAbB	0,10
mAbC	0,09
mAbE	0,01
mAbF	0,30

EXEMPLO 10

[00326] Bloqueio da ligação de Siglec a ligantes de ácido siálico.

[00327] Parte A - Bloqueio da ligação de Siglec-9 a células de tumores que expressam ácido siálico por meio de citometria de fluxo.

[00328] Faixa de dosagem de Fab anti-Siglec-9 humano foi coincubada por 30 minutos à temperatura ambiente com a proteína recombinante de fusão Siglec-9 Fc humana em dose fixa e adicionada em seguida sobre diversas linhagens celulares que expressam ácido siálico K562 E6 (linhagem celular K562 transfetada com HLA-E humano) e Ramos por uma hora. Após lavagem das células por duas vezes em tampão de manchas, anticorpos secundários de fragmentos Fc anti-IgG de camundongos de cabra acoplados a PE (Jackson ImmunoResearch) diluídos em tampão de manchas foram adicionados às células e as placas foram incubadas por 30 minutos adicionais a 4 °C. As células foram lavadas por duas vezes e analisadas em um citômetro de fluxo Accury C6 equipado com um leitor de placas HTFC. A fluorescência média contra a razão entre Fab e proteína recombinante de fusão Siglec-9 Fc foi plotada em gráficos.

[00329] Os resultados são exibidos na Figura 8. No painel superior, é exibida a ligação de proteína Siglec-9-Fc a células de Ramos na

presença de anticorpos. Cada um dentre os mAbs anti-Siglec/9 mAbA, mAbB, mAbC e mAbD inibiu a ligação de proteína Siglec-9-Fc às células de Ramos, enquanto mAbE exibiu capacidade parcial de inibição da ligação de proteína Siglec-9-Fc às células de Ramos e mAbF não inibiu significativamente a ligação de proteína Siglec-9-Fc às células de Ramos. Na Figura 8, painel inferior, é exibida a ligação de proteína Siglec-9-Fc a células K562 na presença de anticorpos. Cada um dentre os mAbs anti-Siglec/9 mAbA, mAbB, mAbC e mAbD inibiu a ligação de proteína Siglec-9-Fc às células de Ramos, enquanto mAbE e mAbF exibiram capacidade parcial de inibição da ligação de proteína Siglec-9-Fc às células K562 e somente em concentrações significativamente mais altas de anticorpo. Concluindo, os anticorpos mAbA, mAbB, mAbC e mAbD bloqueiam totalmente a ligação de Siglec-9 aos seus ligantes de ácido siálico em células de tumor, enquanto o bloqueio de mAbE de anticorpos depende da linhagem celular que expressa ácido siálico e mAbF não bloqueia a ligação.

[00330] Parte B – bloqueio da ligação de Siglec-7 e 9 a ligantes sialilados por meio de testes ELISA.

[00331] Ácidos siálicos são monossacarídeos carboxilados com nove carbonos sobre proteínas glicosiladas e lipídios formados. Diversas enzimas, incluindo sialiltransferases (que catalisam sua biossíntese) e sialidases, também denominadas neuraminidases (que catalisam sua divisão), regulam sua ocorrência no sistema de mamíferos. Em câncer, o perfil de ácido siálico alterado desempenha papel dominante aumentando o crescimento de tumores, metástase e evitando a vigilância imunológica, gerando sobrevida das células de câncer (Bork et al, *J. Pharm. Sci.*, outubro de 2009; 98 (10): 3499-508). Maior sialilação, em conjunto com sialilação reguladora do perfil de enzimas alterada, foi relatada em diversos cânceres. A enzima ST3GAL6 é sobre-expressa em diversos pacientes e linhagens de células de mieloma e é

associada *in vitro* à expressão de ácido siálico ligado por α-2,3 sobre a superfície de diversas células de mieloma. *In vivo*, knockdown de ST3GAL6 é associado à redução do abrigo e enxerto de diversas células de mieloma para o local da medula óssea, em conjunto com redução da carga tumoral e sobrevivência prolongada (Glavey et al, *Blood*, 11 de setembro de 2014; 124 (11): 1765-76). Alta expressão de enzima ST3GAL1 em glioma é associada a graus de tumores mais altos da classificação molecular mesenquimal (Chong et al, *Natl. Cancer Inst.*, 7 de novembro de 2015; 108 (2). Metilação de promotores aberrante desempenha papel na modulação da expressão de diversas sialil transferases em câncer (Vojta et al, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 de janeiro de 2016). Em câncer da bexiga, metilação de promotores ST6GAL1 aberrante induz perda de expressão de ST6Gal1 (Antony et al, *BMC Cancer*, 2 de dezembro de 2014; 14: 901).

[00332] Siglec-7 e Siglec-9 ligam-se a diversas ligações de ácido siálico. Biblioteca de sialosida impressa sobre chips identificou ligantes de sialosida comuns a diversos Siglec e um ligante Siglec-7 seletivo (Rillahan et al, *ACS Chem. Biol.*, 19 de julho de 2013; 8 (7): 1417-22). Em vista do possível reconhecimento diferencial de sialosidas por Siglec-7 e Siglec-9, direcionamento a Siglec-7 e 9 sobre células imunes poderá permitir direcionamento de diversos tipos de câncer, considerando as diversas sialil transferases e ácido siálico.

[00333] O bloqueio da interação entre Siglec-7 e 9 e ligantes sialilados por anticorpos anti-Siglec-7/9 foi testado em testes ELISA. Proteínas Siglec foram proteínas recombinantes Fc humanas Siglec-7 e Fc humanas Siglec-9 e os ligantes foram polímeros biotinilados com trissacarídeos sialilados (Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb-PAA-biotina Glycotech n° 01-077 denominado “Sia1” e 6'-sialil-lactose-PAA-biotina Glycotech n° 01-039, denominado “Sia2”). Resumidamente, Proteína A foi revestida sobre placas ELISA por uma noite a 4

°C. Após três lavagens e saturação, Siglec-7 Fc e Siglec-9 Fc foram adicionados a 0,8 µg/cavidade à temperatura ambiente por 1h30. Após três lavagens, mAbs foram adicionados a 20 µg/ml e uma série de diluição 1:5. Após três lavagens, polímeros sialilados biotinilados foram adicionados por três horas à temperatura ambiente. Após três lavagens, adicionou-se Estreptavidina-Peroxidase (Beckman) a 1:1000. Por fim, a ligação de polímeros sialilados sobre proteínas Siglec-7 e 9 foi revelada por meio da adição de TMB (Interchim) à temperatura ambiente no escuro e a reação foi suspensa pela adição de H₂SO₄. A absorção foi lida a 450 nm.

[00334] Os resultados são exibidos nas Figuras 9 e 10. mAbs 1, 2, 4, 5 e 6 bloqueiam a interação de Siglec-7 com Sia2, ao contrário de mAb3 (Figura 9). Todos os mAbs bloquearam a interação de Siglec-9 com Sia2 (Figura 10), mas mAb1, mAb2 e mAb3 exibiram baixa capacidade de inibição da interação de Siglec-9 com Sia1 (Figura 10) e, portanto, não bloquearam substancialmente a interação de Sia1. mAb5 e mAb6 bloquearam a interação de Siglec-9 com Sia1 e mAb4 apresentou capacidade intermediária de bloqueio da interação de Siglec-9 com Sia1. O efeito de bloqueio sobre Siglec-9 depende do tipo de ácido siálico. De forma geral, observou-se inibição mais completa com os anticorpos anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC e mAbD, que atingiram inibição substancialmente completa da interação de Siglec-9 com ácidos siálicos.

EXEMPLO 11

[00335] Epítulos de anticorpos anti-Siglec utilizando mutantes pontuais.

[00336] A fim de definir os epítulos de anticorpos anti-Siglec-9, identificamos em primeiro lugar o domínio de ligação de nossos anticorpos por meio da expressão de cada domínio Siglec-9 isolado (domínio similar a Ig conjunto V, domínio 1 do tipo C2 similar a Ig e domínio 2 do tipo C2

similar a Ig) com a marca V5 em células HEK293T e teste de ligação dos anticorpos a cada proteína.

[00337] Projetamos em seguida mutantes Siglec-9 definidos por substituições de aminoácidos expostos na superfície molecular sobre a superfície do domínio similar a Ig conjunto V N-terminal. A estrutura de Siglec-9 ainda não foi resolvida e, entre as estruturas de Siglec disponíveis, Siglec-7 é o membro mais próximo (mais de 80% de identidade com a sequência de aminoácidos de Siglec-9). Consequentemente, utilizamos a estrutura de Siglec-7 para projetar mutantes de Siglec-9. O líder de peptídeo Siglec-9 nativo do polipeptídeo de SEQ ID N° 2 foi substituído por uma sequência líder substituta e marca V5 (exibida nas proteínas de domínio Siglec-9, domínio similar a Ig conjunto V, domínio 1 tipo C2 similar a Ig e domínio 2 tipo C2 similar a Ig na Tabela 1), seguida pela sequência de aminoácidos Siglec-9 da Tabela 1, à qual foram incorporadas substituições de aminoácidos relacionadas na Tabela 3. As proteínas foram expressas na linhagem celular HEK293T.

[00338] Todas as figuras (Figuras 11-14) correspondem ao domínio similar a Ig conjunto V N-terminal da estrutura SIGLEC-7 107V, descrita por Alphey et al (2003), acima. As figuras exibem, em sombreamento claro, a área de ligação de ligantes, incluindo arginina 124, que é um resíduo fundamental conservado em todos os Sigecls para interação com o grupo carboxila sobre o açúcar de ácido siálico terminal, e os resíduos vizinhos W132, K131, K135 e N133, que são conservados entre Siglec-7 e Siglec-9 e também são descritos como essenciais para ligação de ácido siálico. W132 fornece interação hidrofóbica com a porção glicerol de ácido siálico. As mutações de aminoácidos dirigidas na Tabela 3 são resíduos presentes em Siglec-7 e 9 e são exibidas utilizando numeração de SEQ ID N° 1 para Siglec-7 ou SEQ ID N° 2 para Siglec-9 (resíduo em Siglec-9 do tipo selvagem/posição de resíduo/resíduo em mutante).

TABELA 3

Ref.	Mutações com referência a Siglec-7 de SEQ ID N° 1	Mutações com referência a Siglec-9 de SEQ ID N° 2
M1	Q19A-T20A-S21N-K22A	Q18A-T19A-S20N-K21A
M2	L27T-T29A-S47A-S49A-K104N	L22T-T24A-S42A-S44A-K100N
M3	Q31E-S33K-T35V	Q26E-S28K-T30V
M5	H43L-P45A-H96F-L98S-N105D-T107A-S109A	H38L-P40A-H92F-L94S-N101D-T103A-S105A
M6	S52L-H53T-G54D-W55S-I56A-Y57A-P58A-G59S	S47L-H48T-G49D-W50S-I51A-Y52A-P53A-G54S
M7	P60S-H62A-E126A-G128S-S129K-K131A	P55S-H58A-E122A-G124S-S125K-K127A
M8	R67A-A70T-N71A-T72R-D73R-Q74K-D75A	R63A-A66T-N67A-T68R-D69R-Q70K-D71A
M9	N82A-P83S-A84S-R85S-A86K-V87S	N78A-P79S-A80S-R81S-A82K-V83S
M10	N81A-D100A-H102W-T103R	N77A-D96A-H98W-T99R
M11	W88V-E89K-E90A-R92A	W84V-E85K-E86A-R88A
M12	D93A-R94A-R111S-D112A-R114A	D89A-R90A-R107S-D108A-R110A
M13	E38A-R115A-S116K-N142V-T144A-A118S	E33A-R111A-S112K-N138V-T140A-A114S
M14	R124A-W132Y-N133A	R120A-W128Y-N129A
M15	H137D-R138A-R120S-S32R	H133D-R134A-R116S-S27R
M16	K135M-H136W	K131M-H132W

[00339] Geração de mutantes:

Mutantes de Siglec-9 foram gerados por meio de PCR. As sequências amplificadas foram conduzidas sobre gel de agarose e purificadas utilizando-se o Kit de Extração de Gel de Limpeza de PCR Macherey Nagel. Os produtos de PCR purificados gerados para cada mutante foram ligados em seguida a um vetor de expressão, com o sistema ClonTech InFusion®. Os vetores que contêm as sequências que sofreram mutação foram preparados na forma de Miniprep e sequenciados. Após o sequenciamento, os vetores que contêm as sequências que sofreram mutação foram preparados na forma de Midiprep® utilizando o Sistema Midiprep de Plasmídeos Promega PureYield®. Células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen), transfetadas com vetores utilizando Lipofectamina® 2000 da Invitrogen e incubadas a 37 °C

em um incubador de CO₂ a 37 °C por 24 ou 48 horas antes do teste da expressão de transgenes.

[00340] Análise de citometria de fluxo de ligação anti-Siglec-9 às células transfetadas HEK293T.

[00341] Os anticorpos mAb4, mAb5 e mAb6 ligaram-se ao domínio 1 tipo C2 similar a Ig, enquanto mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE, mAbF, mAb1, mAb2 e mAb3 ligaram-se ao domínio similar a Ig conjunto V N-terminal. Os anticorpos de ligação de domínio similar a Ig conjunto V foram testados para determinar a sua ligação a cada um dos mutantes 1-16 por meio de citometria de fluxo. Realizou-se primeiro experimento para determinar anticorpos que perdem a sua ligação para um ou mais mutantes em uma concentração. Para confirmar perda de ligação, realizou-se titulação de anticorpos sobre anticorpos para os quais a ligação aparentemente é afetada pelas mutações Siglec-9. Os resultados são exibidos na Tabela 4 abaixo.

[00342] Nenhum anticorpo perdeu a ligação ao mutante M2 que inclui uma substituição no resíduo K100 (com referência a Siglec-9 de SEQ ID N° 2) ou K104 (com referência a Siglec-7 de SEQ ID N° 1) que varia na população; desta forma, os anticorpos ligam-se ao alelo Siglec-9 exibido na Tabela 1 (SEQ ID N° 160).

[00343] Os anticorpos específicos anti-Siglec-7 e 9 mAb1, mAb2 e mAb3 e todos os anticorpos específicos de Siglec-9 mAbE e mAbF perderam a ligação aos mutantes M9, M10 e M11 de Siglec-9, mas não a nenhum outro mutante. O mutante 9 contém substituições de aminoácidos nos resíduos N78, P79, A80, R81, A82 e V83 (referência a Siglec-9), o que indica que um ou mais, ou todos os resíduos do mutante são importantes para o epítopo central desses anticorpos. O mutante 10 contém substituições de aminoácidos nos resíduos N77, D96, H98 e T99, o que indica que um ou mais, ou todos os resíduos do mutante são importantes para o epítopo central desses

anticorpos. O mutante 11 contém substituições de aminoácidos nos resíduos W84, E85, E86 e R88, o que indica que um ou mais, ou todos os resíduos do mutante são importantes para o epítopo central desses anticorpos. Conforme exibido na Figura 11, os resíduos substituídos em M9, M10 e M11 são encontrados sobre o lado do domínio similar a Ig conjunto V N-terminal (sombreamento escuro), longe da face que contém os locais de ligação de ácido siálico (sombreamento claro). Notadamente, os anticorpos não perderam ligação a M8 que contém mutações no domínio de circuito C-C' que define a especificidade de ligante siálico de Siglecs (vide, por exemplo, Alphey et al, 2003, *J. Biol. Chem.* 278 (5): 3372-3377), nem a M15 de M16, que cobrem, em parte, uma região de ligação de ligante. Os anticorpos atingem, portanto, alta potência no bloqueio de Siglec-9, sem ligação a uma região de contato de ácido siálico, local de ligação ou ao circuito C-C'.

[00344] O anticorpo específico anti-Siglec-9 mAbD perdeu a ligação ao mutante M6, mas não a nenhum outro mutante. O mutante 6 contém substituições de aminoácidos nos resíduos S47, H48, G49, W50, I51, Y52, P53 e G54 (referência a Siglec-9), o que indica que um ou mais, ou todos os resíduos do mutante são importantes para o epítopo central do anticorpo. Conforme exibido na Figura 12, os resíduos substituídos em M6 (sombreamento escuro) são encontrados sobre o topo da face de domínio similar a Ig conjunto V N-terminal que contém os locais de ligação de ácido siálico, mas fora do local de ligação de ligantes (sombreamento claro). mAbD não perdeu ligação a M7, mas exibiu redução parcial da ligação a esse mutante M7; M7 contém resíduos que podem sobrepor-se parcialmente à região de ligação de ligantes (em sombreamento claro). M7 incluiu substituições de aminoácidos nos resíduos P55, H58, E122, G124, S125 e K127 (referência a Siglec-9). Os resíduos de M7, portanto, não são importantes para o epítopo central do anticorpo. Os anticorpos não perderam ligação a M8, que possui

mutações no domínio de circuito C-C' ou a M15 de M16, que cobrem em parte uma região de ligação de ligantes. Os anticorpos atingem, portanto, alta potência no bloqueio de Siglec-9, sem ligação a uma região de contato de ácido siálico, local de ligação ou ao circuito C-C'.

[00345] Os anticorpos específicos anti-Siglec-9 mAbA e mAbB perderam a ligação ao mutante M16 de Siglec-9, mas não a nenhum outro mutante. O mutante 16 contém substituições de aminoácidos nos resíduos K131 e H136 (referência a Siglec-9), o que indica que um ou mais, ou todos os resíduos do mutante são importantes para o epítopo central desses anticorpos. É interessante notar que, embora M16 esteja próximo ou dentro de um lado de contato de ligante ácido siálico de Siglec-9 (vide a Figura 13), os anticorpos não perderam ligação a M8 (mutante de domínio de circuito C-C'), nem a M15. Os anticorpos atingem, portanto, alta potência no bloqueio de Siglec-9 e, adicionalmente, dentro de uma região de contato de ácido siálico, sem ligar-se ao circuito C-C'.

[00346] O anticorpo mAbC, por outro lado, perdeu a ligação ao mutante M8 de Siglec-9 (ou seja, dentro do circuito C-C'), mas não perdeu a ligação a M15 ou M16, nem a M6, M7 ou M8, nem a M9, M10 ou M11 (nem a nenhum outro mutante), apesar da redução parcial da ligação a M15 e M16. Os resíduos que sofreram mutação em M8 são exibidos na Figura 14. O mutante 8 contém substituições de aminoácidos nos resíduos R63, A66, N67, T68, D69, Q70 e D71 (referência a Siglec-9), o que indica que um ou mais, ou todos os resíduos do mutante são importantes para o epítopo central desses anticorpos. O anticorpo liga-se, portanto, aos resíduos no domínio de circuito C-C' que define a especificidade de ácido siálico de Siglecs.

EXEMPLO 12

[00347] Anticorpos anti-Siglec aumentam a atividade de bloqueio de NKG2A em células NK purificadas de doadores humanos.

[00348] Os anticorpos anti-Siglec descritos no presente que se descobriu restaurarem a atividade citotóxica de células NK humanas primárias foram estudados para avaliar se o Siglec na superfície do subconjunto de células NK NKG2A+ restringe a atividade citotóxica dessas células NKG2A+. Os anticorpos anti-Siglec foram testados, portanto, para avaliar se eles exibem a capacidade de aumentar a atividade de células NK primárias de doadores humanos na presença do anticorpo bloqueador de NKG2A monalizumab (também denominado IPH2201).

[00349] Expressão de CD137:

O aumento da expressão de CD137 em 24 horas é correlacionado à ativação de diversos linfócitos que incluem células NK (Kohrt et al (2011), *Blood* 117 (8): 2423-2432). O efeito dos anticorpos anti-Siglec-7/9 e anti-Siglec-9 sobre a ativação de células NK foi determinado por meio de análise da expressão de CD137 sobre células NK positivas para Siglec-9 por meio de citometria de fluxo. Células efetoras (células NK novas purificadas de doadores, incubação por uma noite a 37 °C antes do uso) e células alvo de tumores K562 E6 (células K562 levadas a expressar HLA-E) foram misturadas em razão 1:1. O teste CD137 foi conduzido em placas com 96 cavidades em U em RPMI completo, 200 µl final/cavidade. Anticorpos foram previamente incubados por 30 minutos a 37 °C com células efetoras e, em seguida, células alvo foram coincubadas por uma noite a 37 °C. As etapas a seguir foram: 3 min de centrifugação a 500 g; lavagem por duas vezes com Tampão de Manchas (SB); adição de 50 µl de mistura Ab de manchas (anti-CD3 Pacific blue – BD Pharmingen n° 558124; anti-CD56-PE-Vio770 – Milteny n° 130.100.676; anti-CD137-APC – Milteny n° 130.094.821, anti-Siglec-9 K8-PE – Biolegend n° 351504; 30 min de incubação a 4 °C; lavagem por duas vezes com SB; pelota novamente suspensa com SB; e fluorescência revelada com Canto II (HTS).

[00350] Os controles negativos foram células NK x K562 E6

(células K562 levadas a expressar HLA-E) isoladamente e na presença de isótipo controle.

[00351] Os experimentos foram reproduzidos em dez doadores humanos. Na ausência de anticorpo (condição “média”), o percentual de NK que expressa CD137 variou entre os doadores de 5% a 24%. Os dados foram normalizados para que fossem alteração relativa em comparação com o valor médio controle de cada experimento: $((X - X_{\text{médio}})) / X_{\text{médio}}$ (%).

[00352] Conforme exibido na Figura 15, anticorpo anti-Siglec-9 (mAbA) induziu aumento de células positivas para CD137 entre células NK Siglec-9+, mas não induziu aumento de células positivas para CD137 entre as células NK Siglec-9-. Embora anticorpo anti-NKG2A (IPH2201, também conhecido como monalizumab; anticorpo que possui VH de SEQ ID N° 172 e VL de SEQ ID N° 176) aumentasse a citotoxicidade (conforme determinado por aumento da expressão de CD137) de células NK Siglec-9- e Siglec-9+ para células alvo E6 K562, o aumento da expressão de CD137 foi maior nas células Siglec-9- (negativas), o que sugere que Siglec-9 restringe a citotoxicidade dessas células NK que expressam NKG2A na presença de bloqueio de NKG2A. A adição de anticorpos anti-Siglec restaurou a expressão/citotoxicidade de CD137 nas células NK que expressam NKG2A. Os resultados demonstram que os anticorpos anti-Siglec potencializam o efeito amplificador da citotoxicidade dos anticorpos anti-NKG2A neutralizantes.

[00353] Teste de ^{51}Cr :

O teste de citotoxicidade mediou a citotoxicidade da linhagem de células NK Siglec-9* KHYG-1 (linhagem de células NK que sofreu transdução com Siglec-9) por meio de quantificação direta da lise de células alvo carregadas com ^{51}Cr K562-HLA-E* (K562 que sofreu transdução com HLA-E). Resumidamente, as células alvo foram marcadas em primeiro lugar com isótopo ^{51}Cr radioativo e coincubadas em seguida por quatro horas a 37 °C

com células efetoras. Durante esse período, células alvo que são sensíveis a células Siglec-9* KHYG-1 foram lisadas liberando-se ^{51}Cr no meio. O ^{51}Cr no sobrenadante recuperado foi medido por meio de contagem de cintilação de líquidos. Os resultados obtidos permitem a avaliação do percentual de lise de células alvo por células NK. O teste foi conduzido em placas com 96 cavidades em U em RPMI completo, 200 μl final/cavidade, com razão E:T 5/1. Faixa de dosagem de anticorpos anti-Siglec-9, anti-Siglec-7/9 reativo e isótipo controle foi adicionada em combinação com dose fixa de anticorpo anti-NKG2A neutralizante (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

[00354] Cada um dos anticorpos anti-Siglec-9 mAbA, mAbB, mAbC, mAbD, mAbE e mAbF e anticorpos anti-Siglec-7/9 mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 e mAb6 induziu aumento da citotoxicidade de células NK em combinação com o anticorpo anti-NKG2A.

TABELA 4

MUTANTE →	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M14	M15	M16
ANTICORPO													
mAb1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb.A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
mAb.B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
mAb.C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+/-
mAb.D	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
mAb.E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb.F	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

[00355] Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente e patentes, mencionadas no presente são incorporadas ao presente por meio de referência integral e até o mesmo ponto como se cada referência fosse específica e individualmente indicada como incorporada por referência e descrita integralmente no presente (até a extensão máxima

permitida por lei), independentemente de qualquer incorporação fornecida separadamente de documentos específicos realizada em outros pontos do presente.

[00356] A menos que indicado em contrário, todos os valores exatos fornecidos no presente são representativos de valores aproximados correspondentes (por exemplo, todos os exemplos de valores exatos fornecidos com relação a um fator ou medição específica podem ser considerados como também fornecendo medição aproximada correspondente, modificada por “cerca de”, quando apropriado).

[00357] A descrição no presente de qualquer aspecto ou realização do presente, utilizando expressões como “que comprehende”, “que possui”, “que inclui” ou “que contém”, com referência a um ou mais elementos, destina-se a fornecer apoio para um aspecto ou realização similar da presente invenção que “consiste de”, “consiste essencialmente de” ou “comprehende substancialmente” aquele(s) elemento(s) específico(s), a menos que indicado em contrário ou em clara contradição pelo contexto (por exemplo, uma composição descrita no presente como compreendendo um elemento específico deverá ser compreendida como também descrevendo uma composição que consiste daquele elemento, a menos que indicado em contrário ou em clara contradição pelo contexto).

[00358] O uso de todo e qualquer exemplo ou expressão de exemplo (por exemplo, “tal como”) fornecido no presente destina-se meramente a melhor ilustrar a presente invenção e não impõe limitação sobre o escopo da presente invenção, a menos que reivindicado em contrário. Nenhuma expressão do presente relatório descritivo deverá ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. AGENTE que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9 humano para uso no tratamento de câncer em pacientes humanos, caracterizado pelo tratamento compreender a administração ao paciente de quantidade eficaz de cada um dentre: (a) um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A humano; e (b) um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9 humano.

2. AGENTE de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de Siglec-9 humano compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo que seja capaz de ligar um polipeptídeo Siglec-9 humano e neutralizar a atividade inibidora de um polipeptídeo Siglec-9 expresso por uma célula NK humana.

3. ANTICORPO que liga o domínio similar a Ig conjunto V N-terminal de Siglec-7 e/ou Siglec-9 humano, caracterizado pelo anticorpo neutralizar a atividade inibidora de polipeptídeo Siglec-7 e/ou Siglec-9 humano, para uso no tratamento de câncer em pacientes humanos, em que o anticorpo anti-Siglec é administrado em combinação com um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A humano.

4. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de Siglec humano compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente com afinidade de ligação comparável a um polipeptídeo Siglec-7 humano e a um polipeptídeo Siglec-9 humano.

5. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de Siglec humano compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo que possui EC₅₀ para ligação a polipeptídeo Siglec-7 humano e polipeptídeo Siglec-9 humano

que difere em não mais de 1 log, conforme determinado por meio de citometria de fluxo para ligação a células que expressam, na sua superfície, níveis comparáveis de Siglec-7 ou Siglec-9.

6. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de Siglec-9 humano aumenta e/ou restaura a citotoxicidade de células NK em um teste de citotoxicidade de liberação de ^{51}Cr *in vitro* por quatro horas padrão no qual as células NK que expressam Siglec-9 são purificadas a partir de doadores humanos e incubadas com células alvo que expressam um ligante ácido siálico de Siglec-9.

7. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente que neutraliza a atividade inibidora de Siglec humano compreender um anticorpo capaz de neutralizar a atividade inibidora de polipeptídeos Siglec-7 e/ou 9 expressos por moDC humano que possui, na sua superfície, polipeptídeos Siglec-7 e/ou 9 que são dedicados a interações *cis* com ácidos siálicos.

8. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de NKG2A humano e o agente que neutraliza a atividade inibidora de Siglec são formulados para administração separada e administrados simultânea ou sequencialmente.

9. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de NKG2A humano e o agente que neutraliza a atividade inibidora de Siglec são administrados simultaneamente em uma única formulação.

10. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de NKG2A humano e o agente que neutraliza a atividade inibidora de Siglec são

administrados no mesmo dia.

11. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o câncer é caracterizado por células malignas que possuem, na sua superfície, polipeptídeos HLA-E.

12. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o câncer é caracterizado por células malignas que possuem, na sua superfície, ligantes de ácido siálico de Siglec-7 e/ou Siglec-9.

13. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo câncer ser selecionado a partir do grupo que consiste de câncer do pulmão, câncer da cabeça e do pescoço, carcinoma de células renais (RCC), melanoma, câncer colorretal e câncer do ovário.

14. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo anticorpo neutralizar a atividade inibidora de NKG2A compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de uma cadeia pesada que possui a sequência descrita em qualquer um dentre SEQ ID N° 171-175 e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de uma cadeia leve que possui a sequência descrita em SEQ ID N° 176.

15. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo mencionado anticorpo neutralizar a atividade inibidora de NKG2A é um anticorpo não esgotador.

16. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo mencionado anticorpo neutralizar a atividade inibidora de Siglec-9 humano é um anticorpo não esgotador.

17. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo mencionado anticorpo não esgotador não possuir domínio Fc ou compreende um domínio Fc que é modificado para reduzir a ligação entre o domínio Fc e um receptor de Fcγ.

18. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações 15

ou 16, caracterizado pelo mencionado anticorpo não esgotador ser um fragmento de anticorpo.

19. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de Siglec-9 compreende um anticorpo que se liga a: (a) um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 2; e (b) um polipeptídeo Siglec-9 que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº 160.

20. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente neutralizar a atividade inibidora de Siglec-9 e/ou Siglec-7 não se liga substancialmente a um polipeptídeo Siglec relativo a CD33 humano adicional, opcionalmente em que o anticorpo liga-se ao Siglec-7 e/ou Siglec-9 com KD pelo menos 100 vezes menor que para terceiro polipeptídeo Siglec relativo a CD33 humano, opcionalmente em que o terceiro Siglec relativo a CD33 humano é selecionado a partir do grupo que consiste de Siglec-3, 5, 6, 8, 10, 11 e 12.

21. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo terceiro polipeptídeo Siglec relativo a CD33 humano ser Siglec-12.

22. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo anticorpo anti-Siglec causar aumento da citotoxicidade e/ou em um marcador associado à citotoxicidade em uma célula NK que expressa Siglec-7 e/ou 9 purificada a partir de um doador humano, quando a célula NK é colocada em contato com uma célula humana alvo que possui ligante do Siglec sobre a superfície de células alvo.

23. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-Siglec é caracterizado por ligação reduzida a:

- polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo N78, P79, A80, R81, A82 e/ou V83; mutação no resíduo N77, D96, H98 e/ou T99 e/ou mutação no resíduo W84, E85, E86 e/ou R88;
 - polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo S47, H48, G49, W50, I51, Y52, P53 e/ou G54;
 - polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo P55, H58, E122, G124, S125 e/ou K127;
 - polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo K131 e/ou H132; e/ou
 - polipeptídeo Siglec-9 que possui mutação no resíduo R63, A66, N67, T68, D69, Q70 e/ou D71;
- em comparação com a ligação a um polipeptídeo Siglec-9 do tipo selvagem de SEQ ID N° 2, em que resíduos de aminoácidos são indicados com referência ao polipeptídeo Siglec-9 de SEQ ID N° 2.

24. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente compreender um anticorpo que concorre pela ligação a Siglec-9 com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste de:

- a. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 15 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 16;
- b. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 17 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 18;
- c. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de

SEQ ID N° 19 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 20;

d. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 21 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 22;

e. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 23 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 24; e

f. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 25 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 26.

25. AGENTE de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo agente compreender um anticorpo que concorre pela ligação a Siglec-7 e/ou Siglec-9 com um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste de:

a. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 3 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 4;

b. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 5 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 6;

c. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de

SEQ ID N° 7 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 8;

d. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 9 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 10;

e. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 11 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 12; e

f. um anticorpo monoclonal que compreende (i) cadeia pesada que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID N° 13 e (ii) cadeia leve que compreende CDR 1, 2 e 3 da região variável de cadeia leve de SEQ ID N° 14.

26. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA caracterizado por compreender um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A, um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9 humano e um veículo farmaceuticamente aceitável.

27. KIT caracterizado por compreender: (a) uma dose de um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A e (b) uma dose de um agente, opcionalmente anticorpo, que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9 humano.

28. KIT caracterizado por compreender: (a) diversos pacotes de composições farmacêuticas de dose única que contêm quantidade eficaz de um anticorpo que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A; e (b) diversos pacotes de composições farmacêuticas de dose única que contêm quantidade eficaz de um anticorpo que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9.

29. MÉTODO DE MODULAÇÃO DE LINFÓCITOS Siglec+ NKG2A+, opcionalmente células NK, opcionalmente células T CD8+ em indivíduos, caracterizado pelo método compreender a administração ao mencionado indivíduo de quantidade eficaz de um agente conforme definido na reivindicação 26.

30. MÉTODO *IN VITRO* DE MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE LINFÓCITOS Siglec+ NKG2A+, opcionalmente células NK, opcionalmente células T CD8+, caracterizado por compreender a colocação de linfócitos que expressam, na sua superfície, NKG2A e Siglec-9 em contato com um anticorpo que neutraliza a atividade inibidora de NKG2A e um anticorpo que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9.

31. AGENTE que neutraliza a atividade inibidora de Siglec-9, para uso no tratamento ou prevenção de câncer em indivíduos, caracterizado pelo tratamento compreender:

a. determinação da situação de polipeptídeo HLA-E de células malignas no indivíduo portador de câncer; e

b. mediante determinação de que polipeptídeos HLA-E são expressos por células malignas (por exemplo, sobre a sua superfície), administração ao indivíduo de um agente que neutraliza a atividade inibidora de um polipeptídeo NKG2A humano e um agente que inibe um polipeptídeo Siglec-9 humano.

32. COMPOSIÇÃO de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo uso no tratamento de câncer.

33. COMPOSIÇÃO ou agente de acordo com qualquer das reivindicações 31 ou 32, caracterizado pelo câncer ser um tumor sólido.

34. COMPOSIÇÃO ou agente de acordo com qualquer das reivindicações 31 ou 32, caracterizado pelo câncer ser um tumor hematológico.

35. COMPOSIÇÃO ou agente de acordo com qualquer das

reivindicações 31 a 34, em que o câncer é caracterizado por células malignas que possuem, na sua superfície, ligantes de ácido siálico de Siglec-7 e/ou Siglec-9.

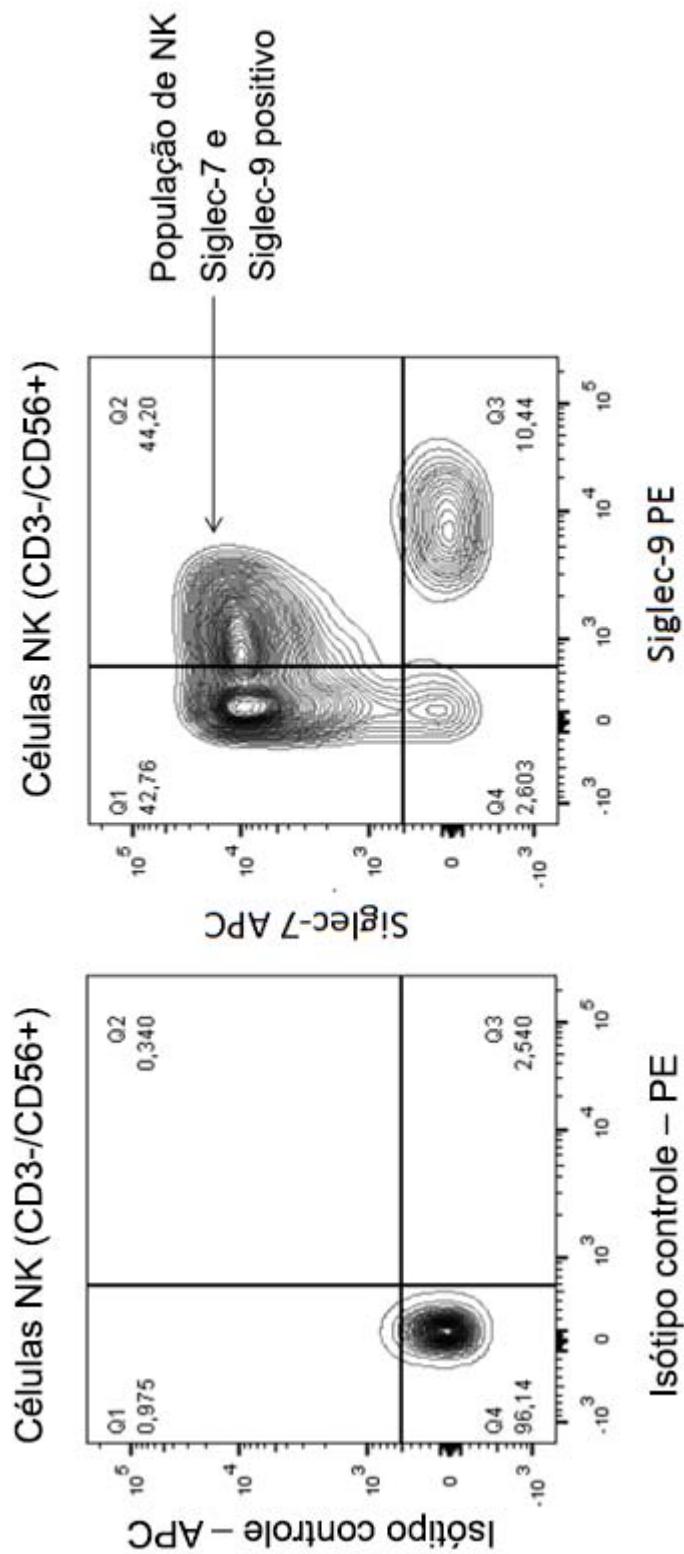
Fig. 1

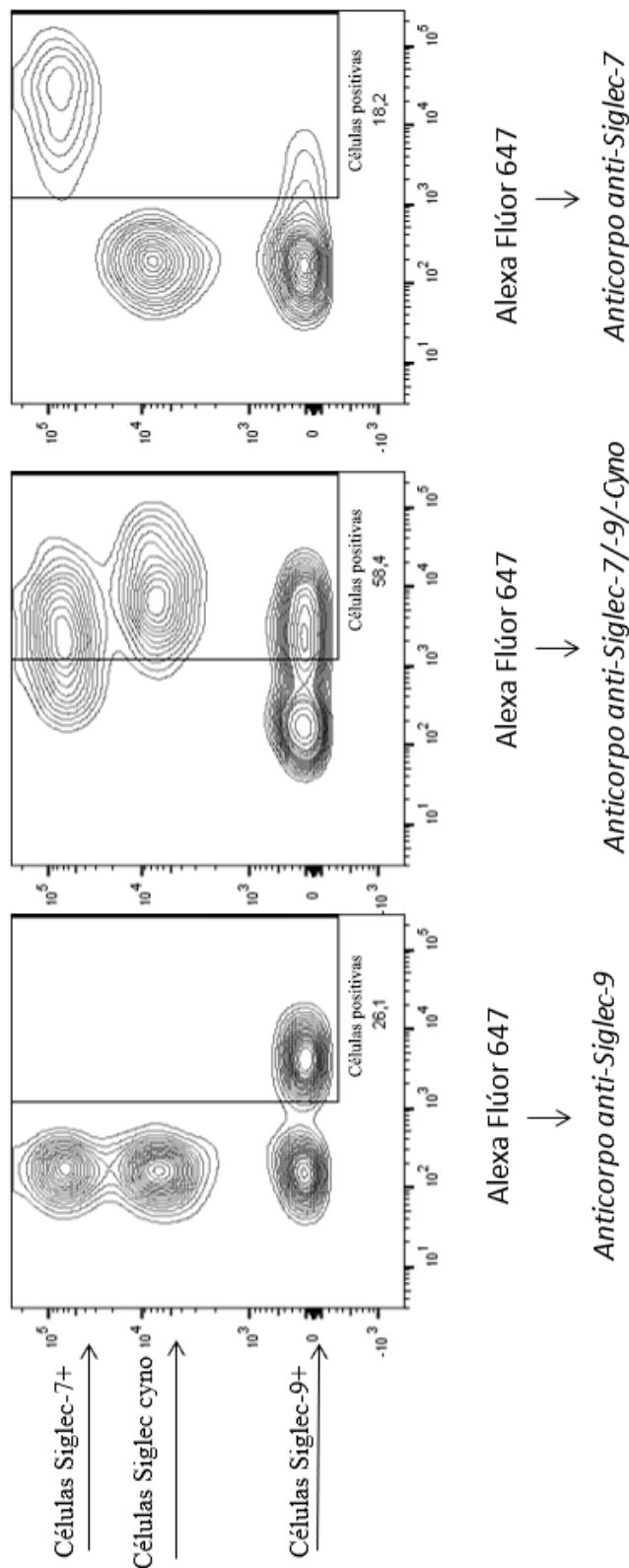
Fig. 2

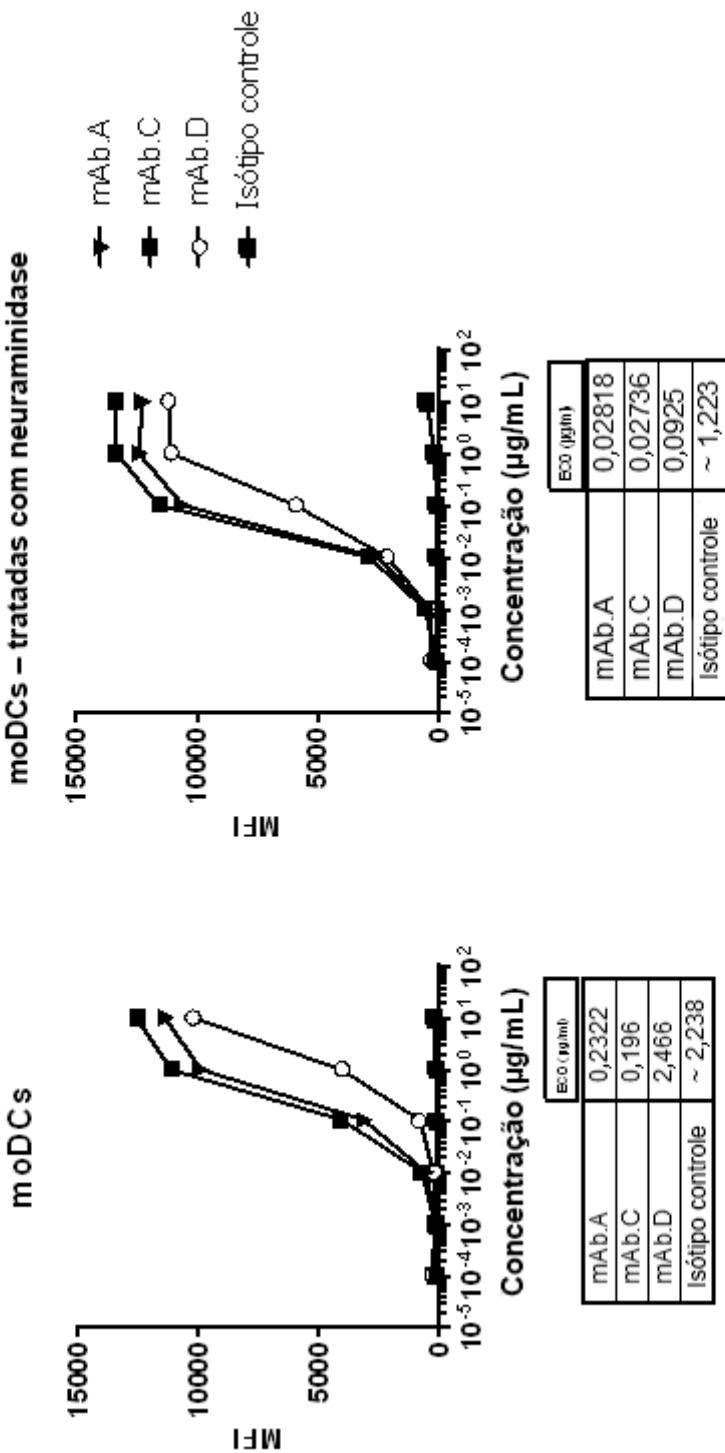
Fig. 3

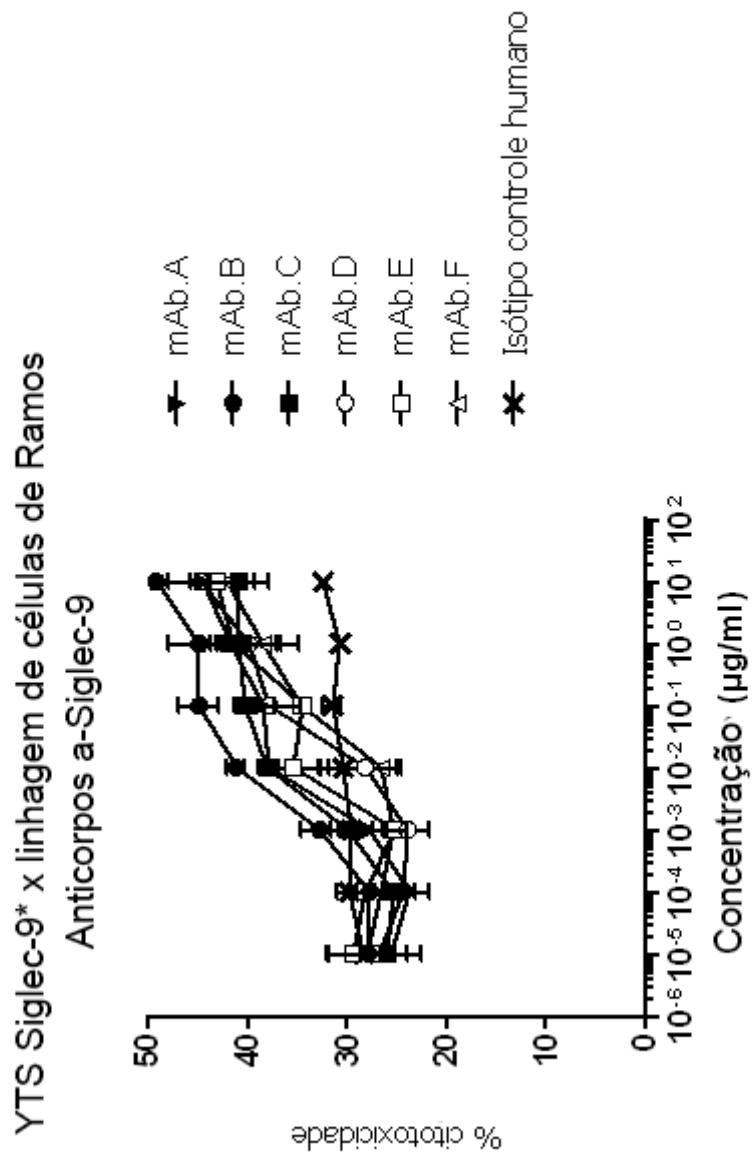
Fig. 4A

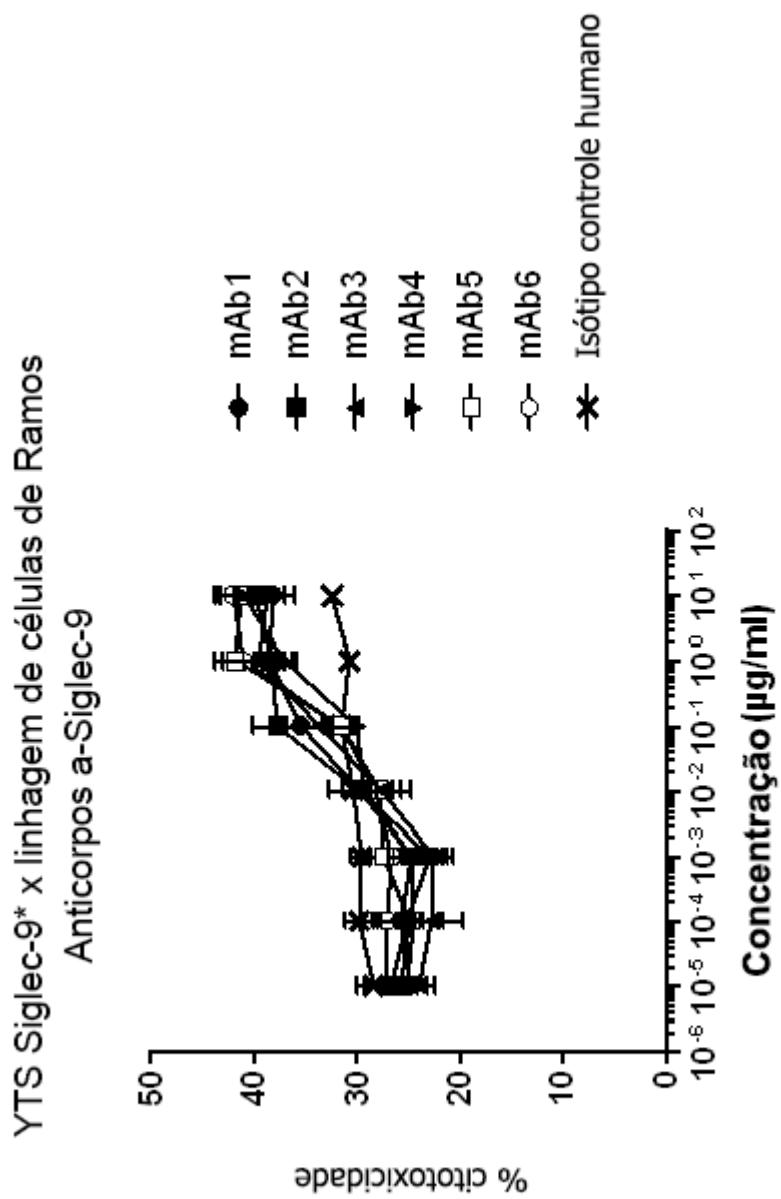
Fig. 4B

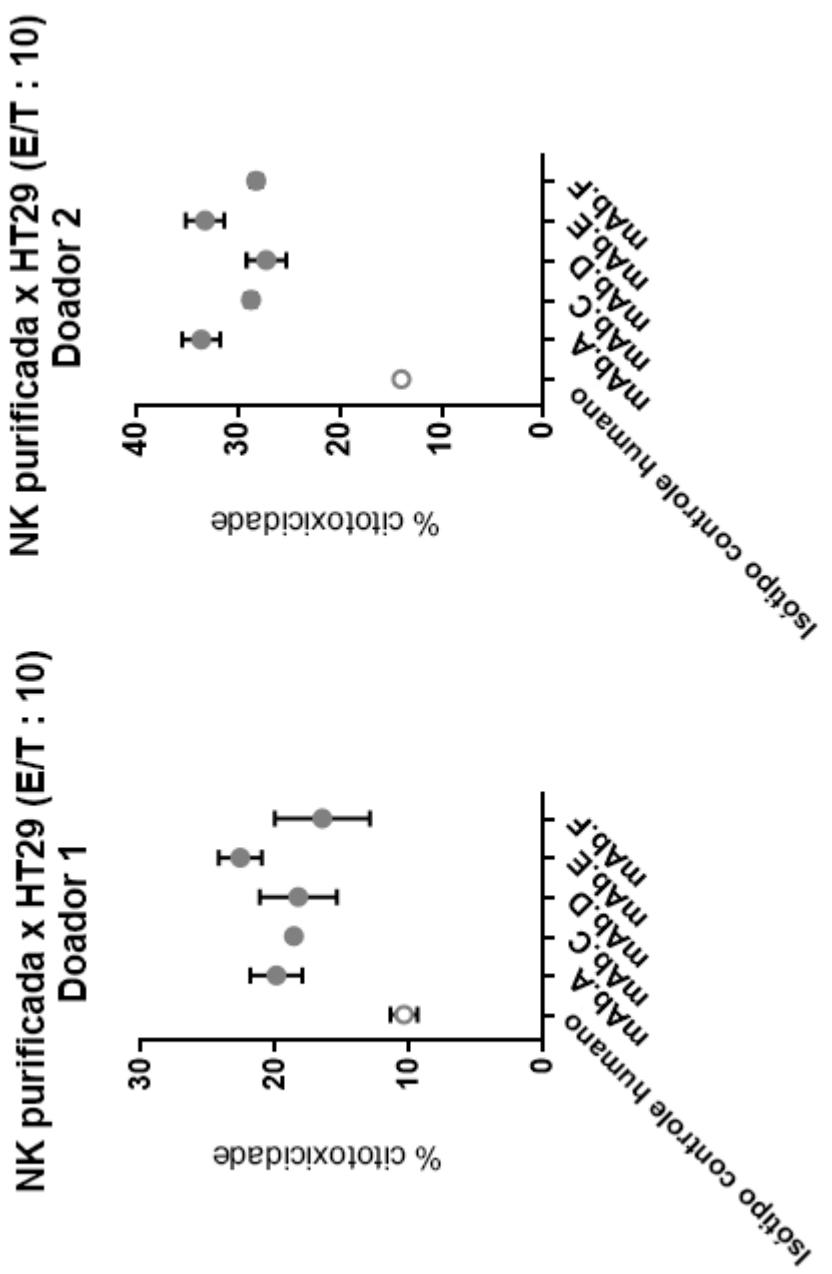
Fig. 5

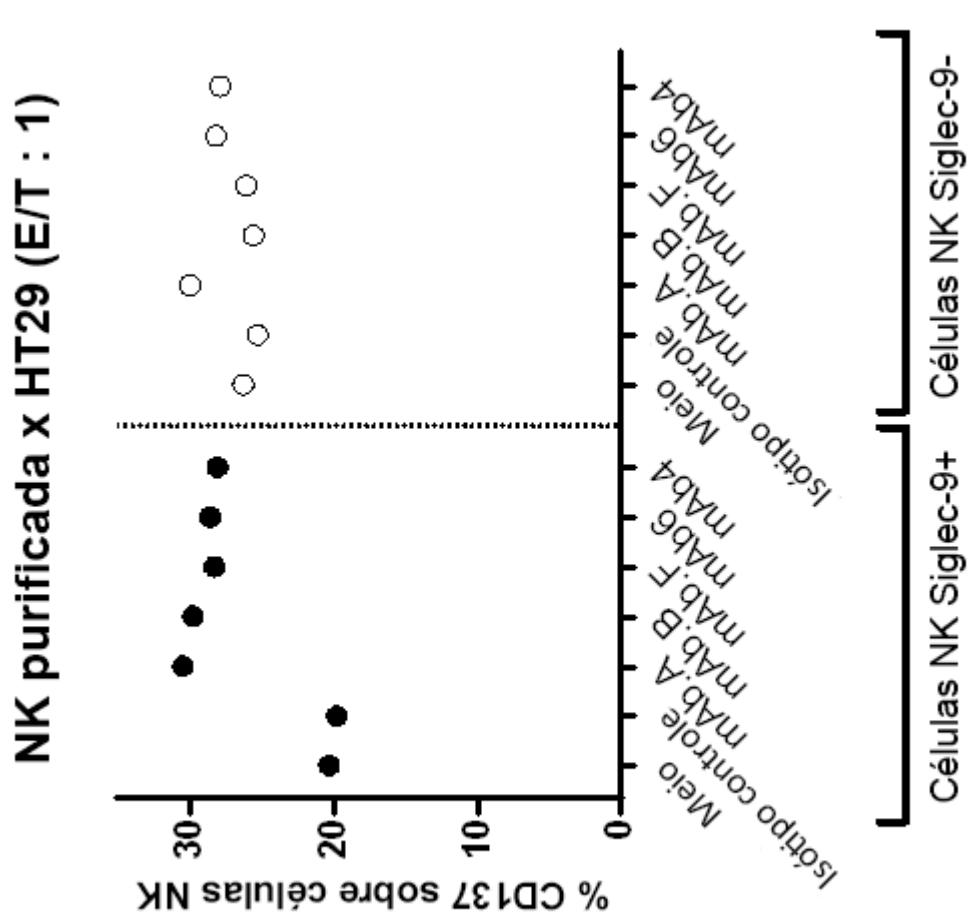
Fig. 6

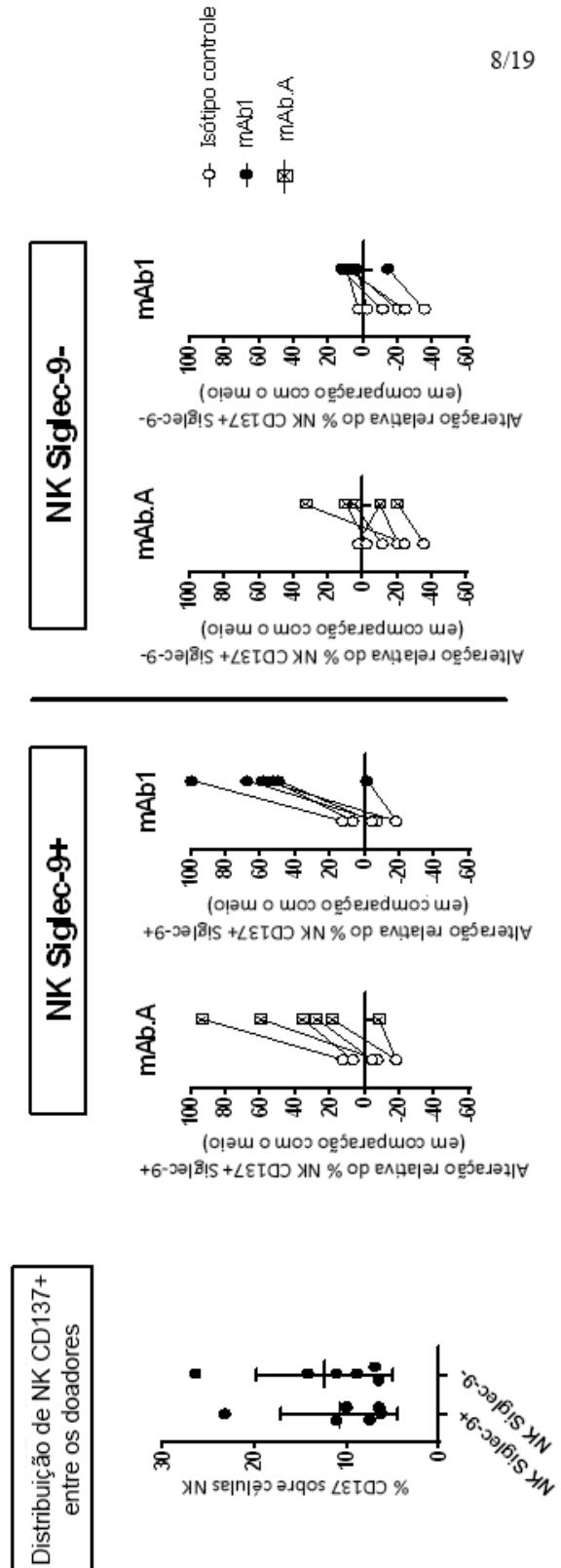
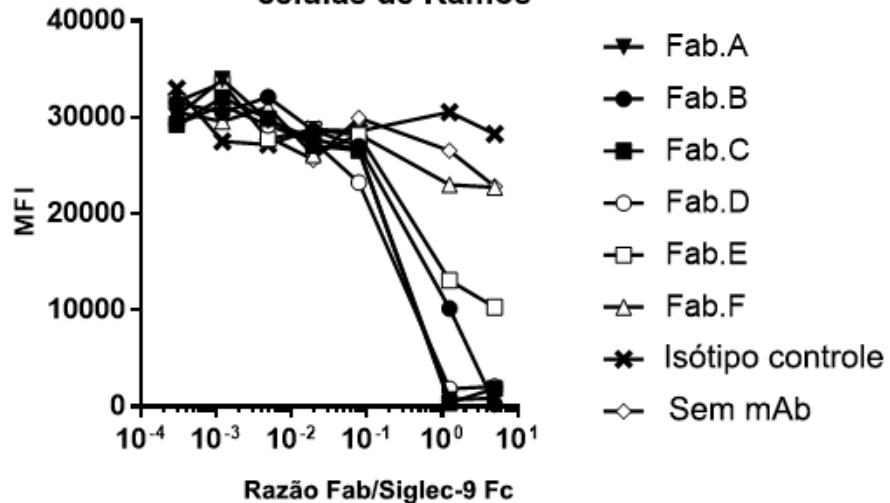
Fig. 7

Fig. 8

Bloqueio da ligação de Siglec-9 Fc sobre linhagem de células de Ramos



Bloqueio da ligação de Siglec-9 Fc sobre linhagem de células K562

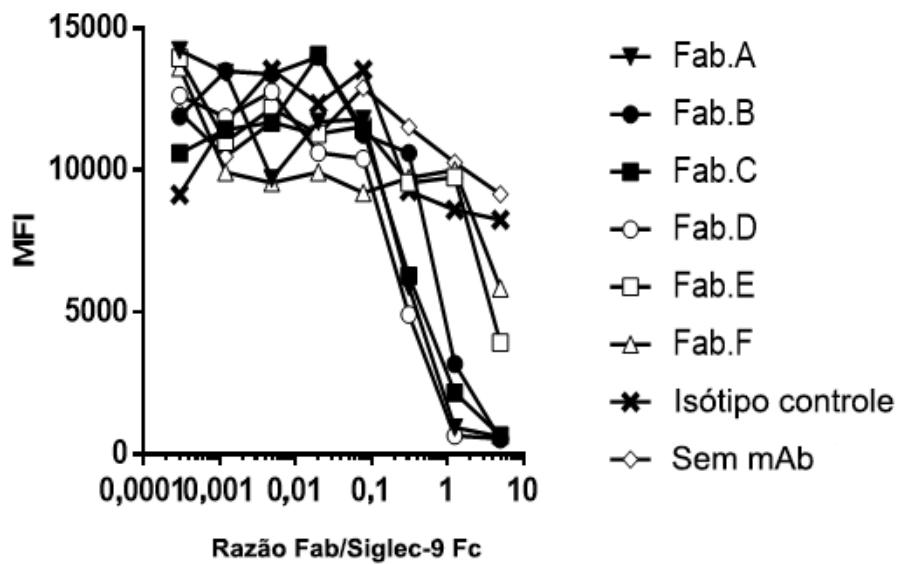


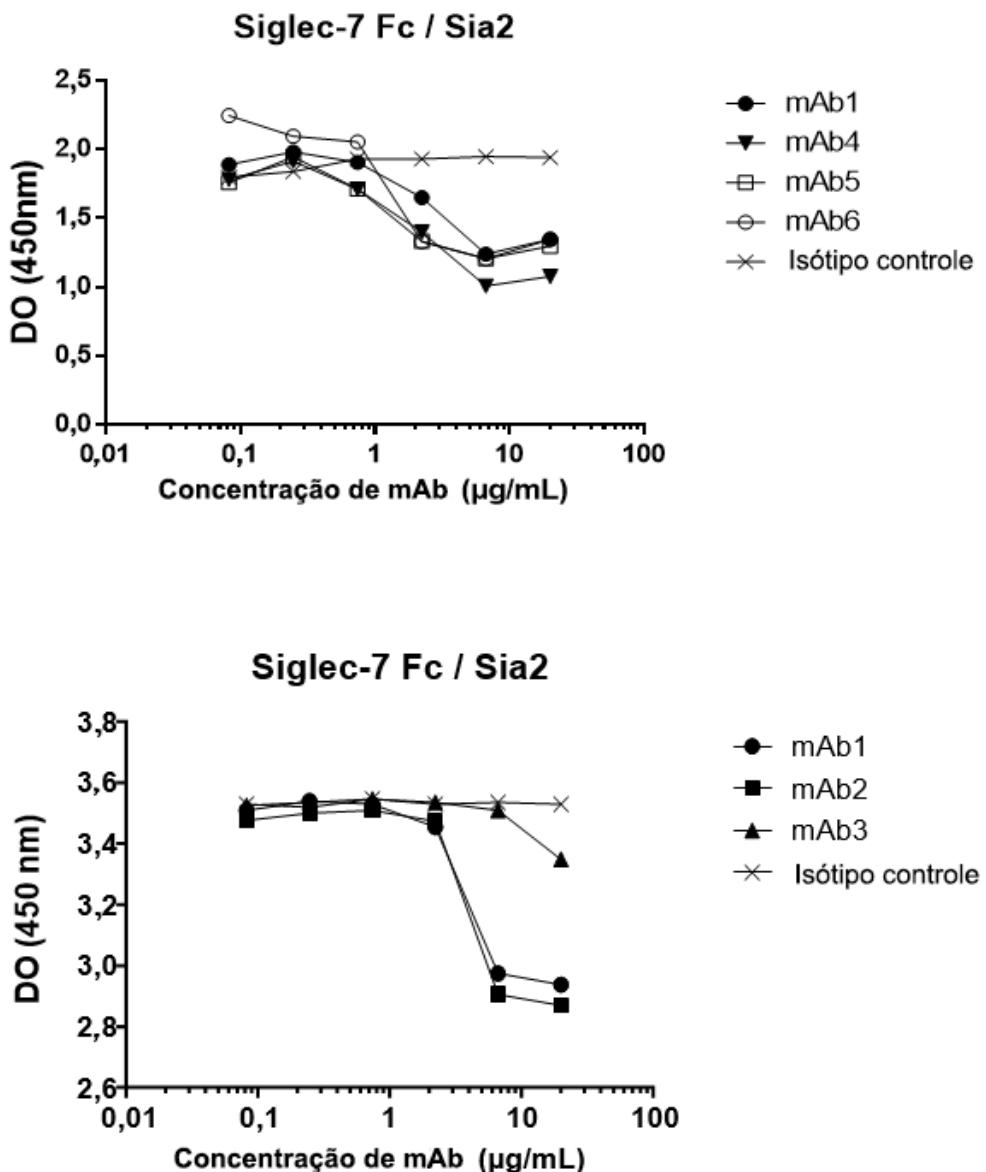
Fig. 9

Fig. 10

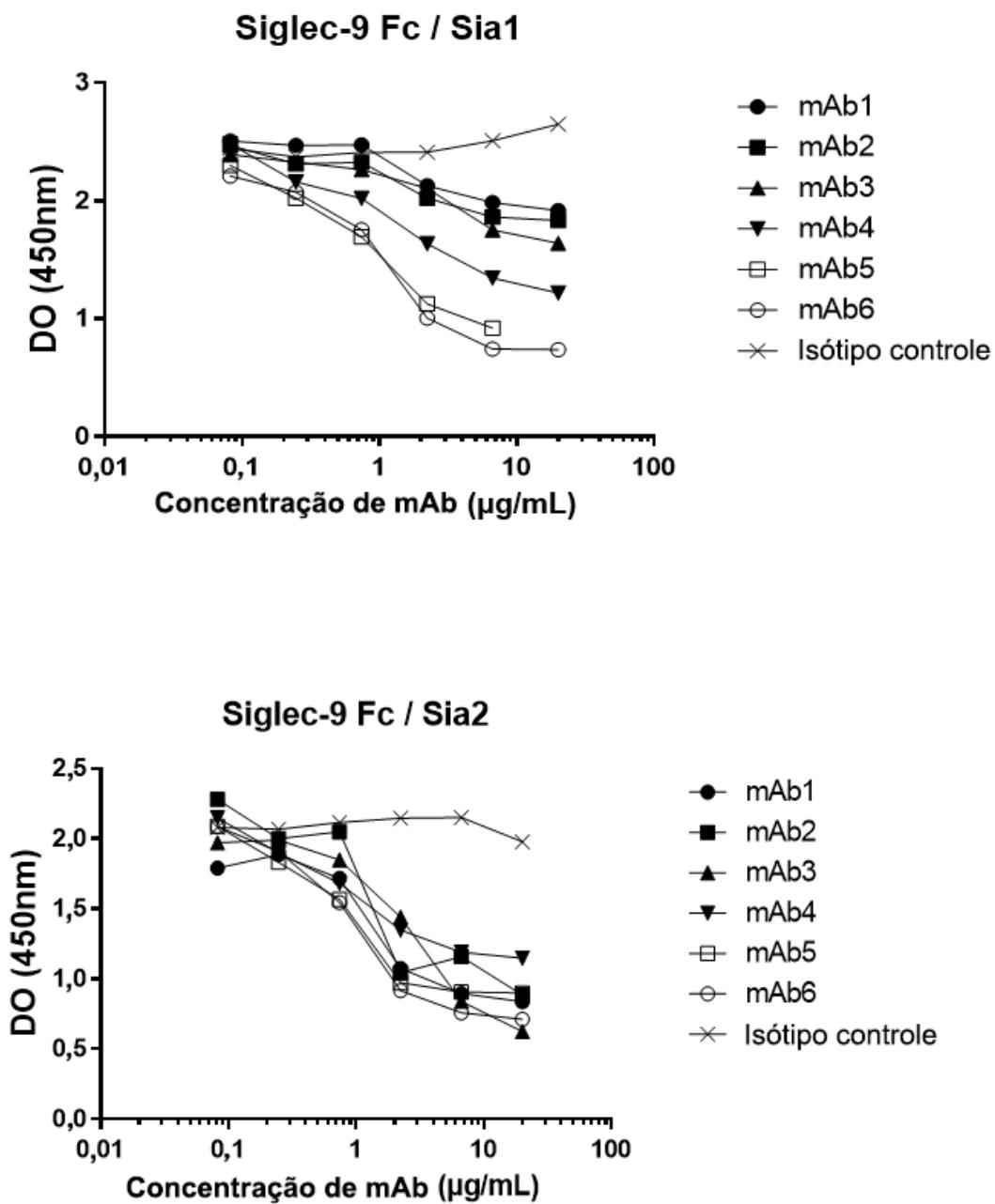


Fig. 11

**mAb.E – mAb.F
mAb1 – mAb2 – mAb3**

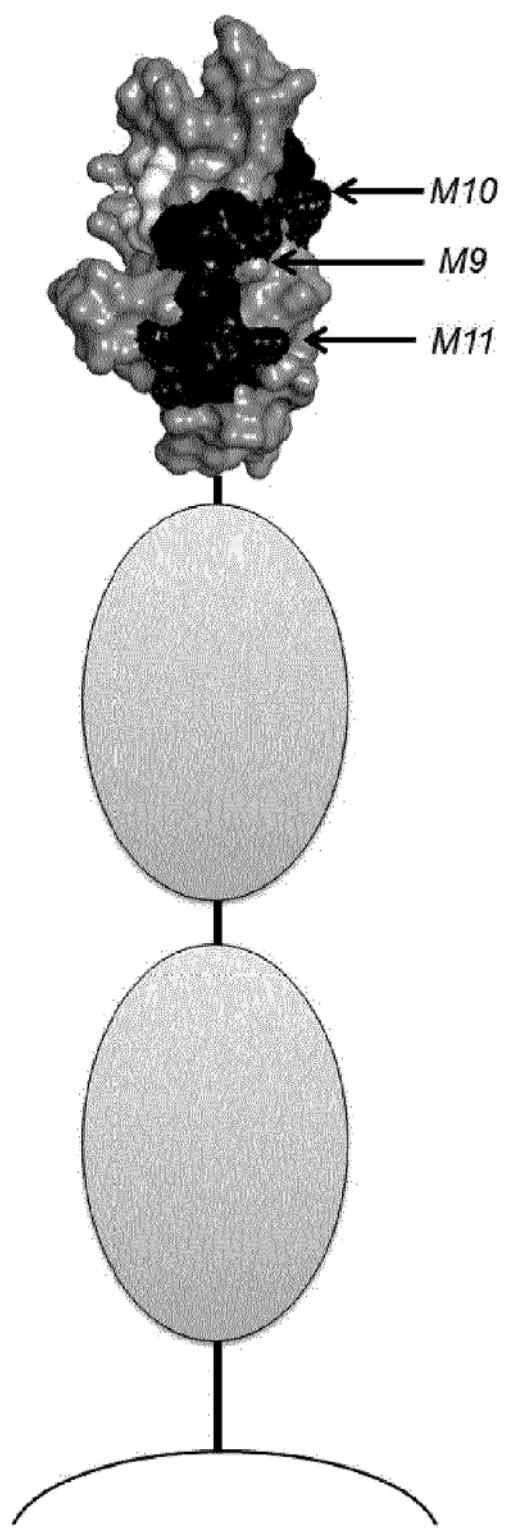


Fig. 12
mAb.D

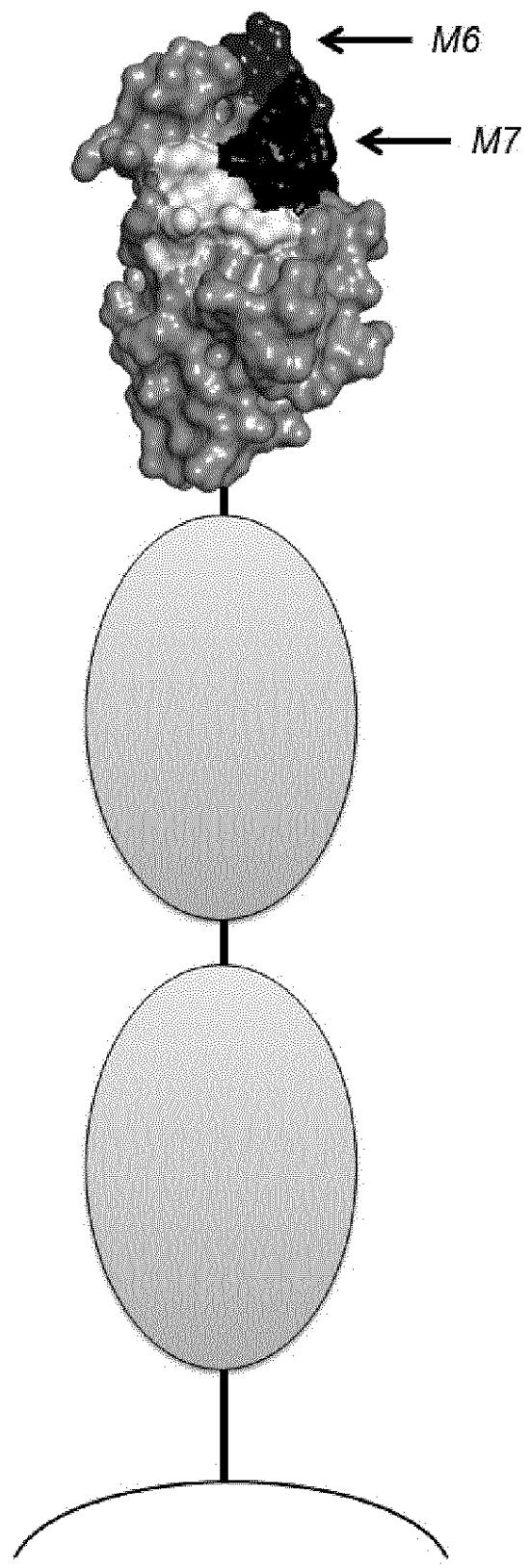


Fig. 13

mAb.A – mAb.B

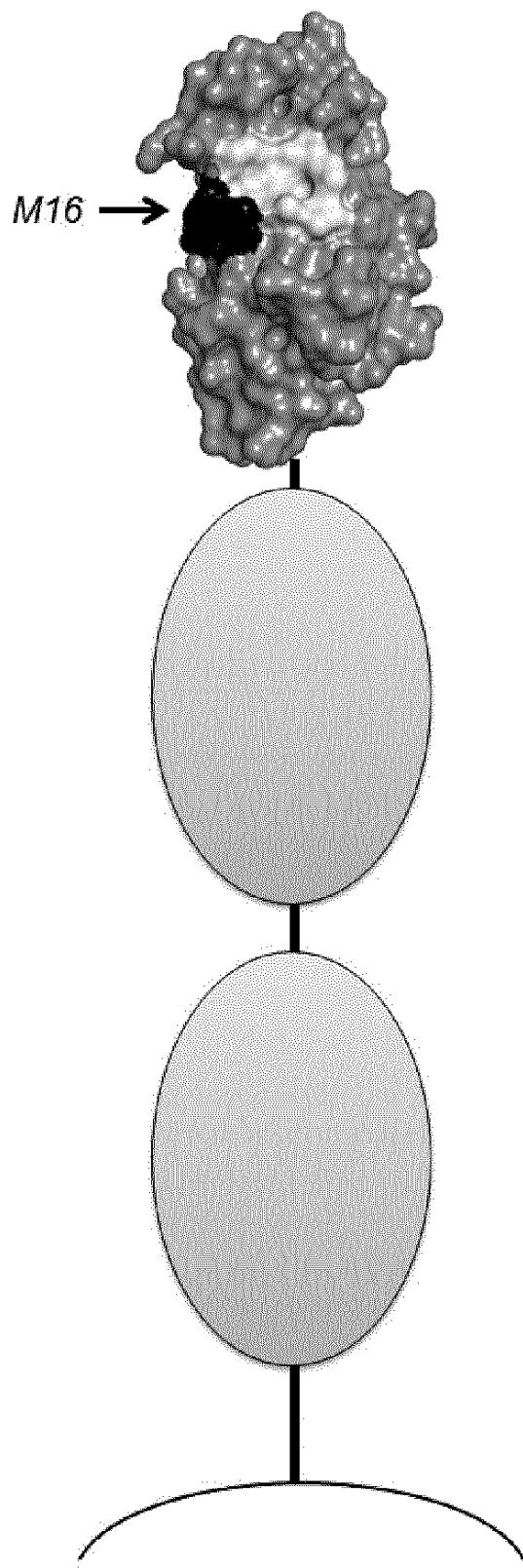


Fig. 14
mAb.C

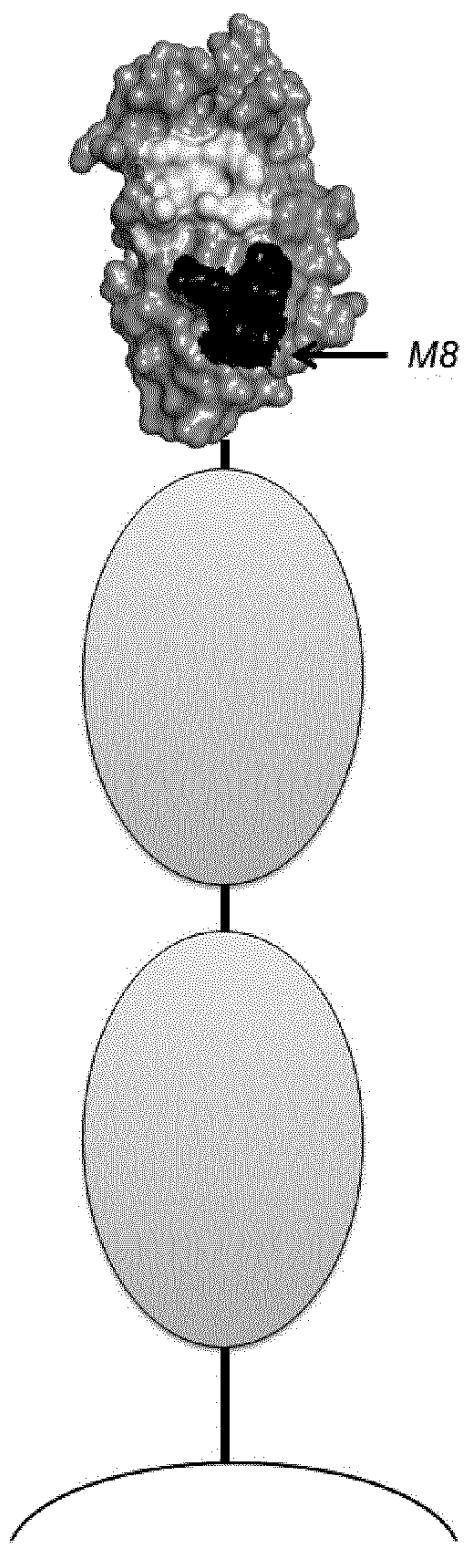
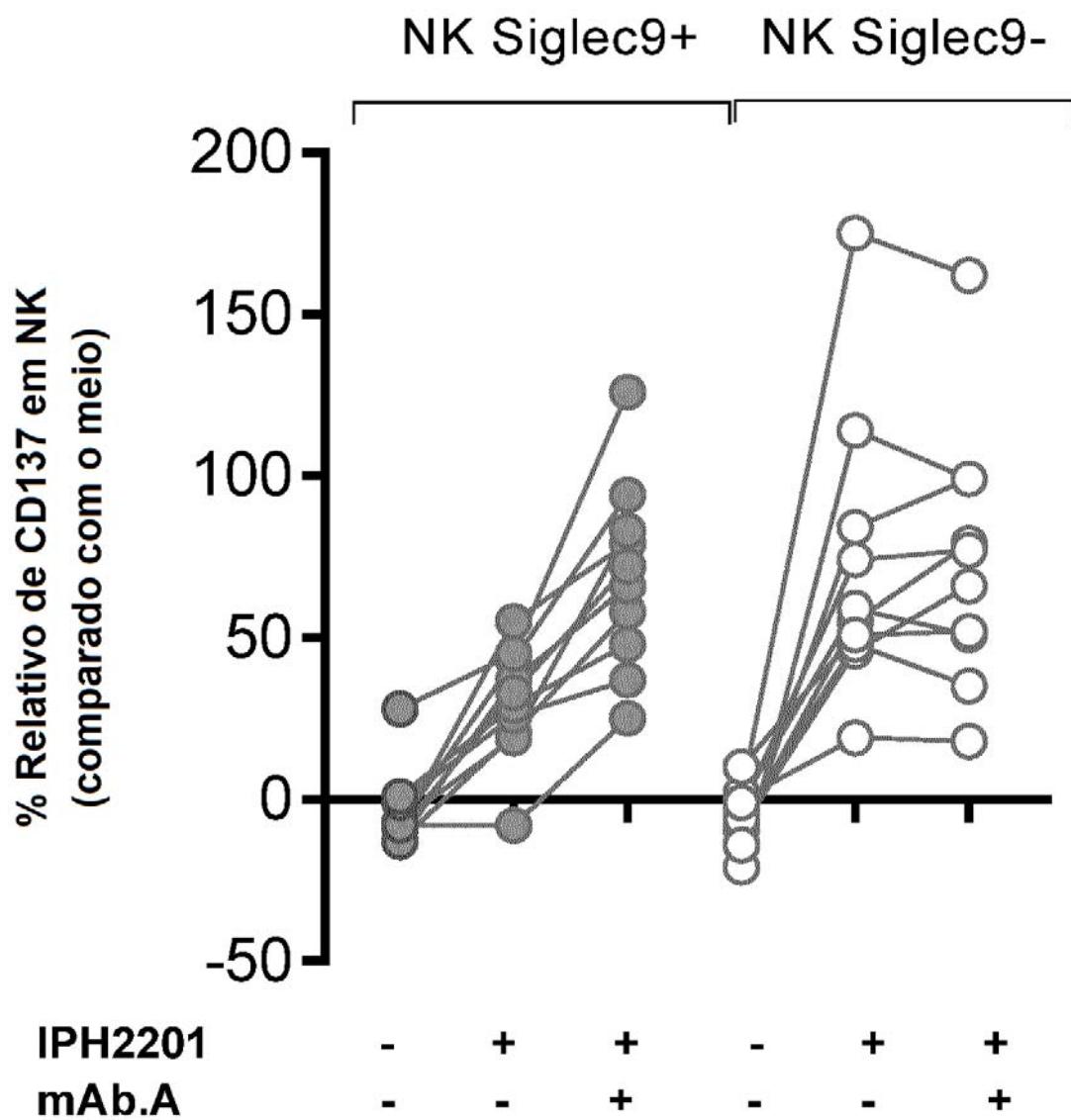


Fig. 15



RESUMO

**“AGENTES, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KITS,
MÉTODO DE MODULAÇÃO DE LINFÓCITOS, MÉTODO *IN VITRO* DE
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE LINFÓCITOS E COMPOSIÇÃO”**

A presente invenção refere-se a agentes que ligam Siglecs humanos que possuem atividade inibidora em células imunes e que neutralizam a atividade inibidora desses Siglecs. Esses agentes podem ser utilizados para o tratamento de cânceres.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 3296-0002_Revisão Técnica_Listagem de Sequências.TXT
- Data de Geração do Código: 19/12/2019
- Hora de Geração do Código: 16:52:36
- Código de Controle:
 - Campo 1: 13FC5671274FE397
 - Campo 2: DB0344400B8B5779