



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

(21) BR 112021007765-0 A2



(22) Data do Depósito: 23/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

(54) Título: INIBIDORES SELETIVOS DE RGMc E USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: A61P 7/06; C07K 16/28; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/10/2018 US 62/749,469.

(71) Depositante(es): SCHOLAR ROCK, INC..

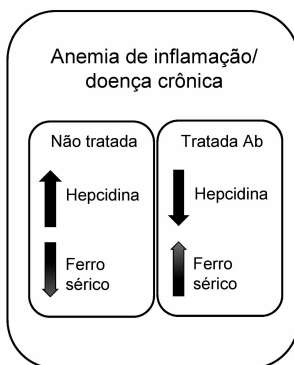
(72) Inventor(es): SAMANTHA NICHOLLS; ADRIANA DONOVAN; MEGHAN MCDONALD; ABHISHEK DATTA; ALLAN CAPILI; KEVIN B. DAGBAY; LORENA LERNER; LEONARD IRA ZON; JUSTIN W. JACKSON; KEVIN SCHUTZ; JOHN BUKOWSKI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019057687 de 23/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/086736 de 30/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 23/04/2021

(57) Resumo: INIBIDORES SELETIVOS DE RGMc E USO DOS MESMOS. Inibidores seletivos de molécula de orientação repulsiva C (RGMc) são descritos. Os métodos relacionados, incluindo métodos para produção, assim como uso terapêutico desses inibidores no tratamento de distúrbios, como anemia, são também providos.



**INIBIDORES SELETIVOS DE RGMc E USO DOS MESMOS****PEDIDOS RELACIONADOS**

[001]Esse pedido de patente internacional reivindica o benefício de e prioridade para o Pedido Provisório US número de série 62/749.469, depositado em 23 de outubro de 2018, cujo conteúdo é incorporado aqui por referência em sua totalidade

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[002]Esta invenção geralmente refere-se a agentes de ligação a RGMc (por exemplo, anticorpos e moléculas compreendendo fragmentos de ligação ao antígeno), que especificamente e seletivamente inibem RGMc, mas não RGMa ou RGMb.

**FUNDAMENTO**

[003]Anormalidades em homeostase do ferro estão associadas com várias doenças que podem ser difíceis de tratar. Esses distúrbios podem ser amplamente classificados em duas categorias, i) doenças com sobrecarga de ferro que incluem cirrose, cardiomiopatia, diabetes, etc.; e ii) doenças com deficiência de ferro, incluindo anemia com restrição de ferro, anemia de doença crônica ("ACD"), etc.

[004]Hepcidina é um regulador chave da homeostase sistêmica de ferro, cuja expressão é predominantemente restrita ao fígado. Hepcidina é produzida como um propeptídeo e processada por furina ou protease semelhante à furina no peptídeo ativo maduro. Hepcidina regula negativamente a disponibilidade de ferro por ligação ao seu receptor ferroportina, o único exportador celular de ferro, e causando a internalização e degradação de ambos. Assim, hepcidina bloqueia a exportação de ferro das células-chave para a

absorção de ferro na dieta (enterócitos), reciclagem de ferro da hemoglobina (os macrófagos) e a liberação de ferro armazenado dos hepatócitos, resultando na redução de disponibilidade sistêmica de ferro. Um papel central de hepcidina na homeostase sistêmica do ferro foi logo reconhecido de modo inequívoco pela descoberta de que a inativação de seu gene estava associada a uma sobrecarga severa de ferro no fígado e no pâncreas.

[005]Foi demonstrado que a expressão de BMP6 e BMP2 é requerida para manter homeostase de ferro em camundongos. Proteínas morfogênicas ósseas 6 e 2, (BMP6 e BMP2, respectivamente) são, ambas, membros da superfamília TGF $\beta$  de fatores de crescimento conhecidos por estarem envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo metabolismo/homeostase de ferro. Foi demonstrado que a expressão de BMP6 e BMP2 é requerida para manter homeostase de ferro em camundongos. Consistente com a noção de que está envolvido em regulação de ferro, comprometimento genético de BMP6 causa sobrecarga severa de ferro nos tecidos. Similarmente, mutações BMP6 foram encontradas em pacientes tendo hemocromatose hereditária, um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizado por sobrecarga de ferro parenquimal.

[006]BMP6 se liga a receptores de treonina quinase de serina tipo I e tipo II (por exemplo, Alk2, Alk3, BMPR2 e ActRIIA). Além disso, BMP6 também demonstrou se ligar diretamente ao seu correceptor, molécula de orientação repulsiva C ou RGMc, também conhecida como hemojuvelina ou HJV. A ligação de BMP6 aos seus receptores e, por sua vez, ao complexo multimérico maior que inclui HJV, HFE, TFR2 e neogenina, ativa a fosforilação de SMAD intracelular, que

induz a translocação nuclear e transcrição de hepcidina aumentada. Assim, o eixo BMP6/HJV/SMAD é o regulador principal de expressão de hepcidina que responde à situação de ferro.

[007]Terapias atualmente disponíveis para o tratamento de indicações clínicas envolvendo anemia, como anemia induzida por quimioterapia e anemia de doença renal crônica, incluem ferro intravenoso (por exemplo, suplemento de ferro e transfusão) e agentes estimulantes de eritropoiese (ESAs). Exemplos de ESAs incluem eritropoietina (Epo); Epoetina alfa (Procrit/Epogen); Epoetina beta (NeoRecormon); Darbepoietina alfa (Aranesp); e, metoxi polietileno glicol-epoetina beta (Mircera). Essas terapias são subótimas e também podem estar associadas a efeitos colaterais indesejados ou eventos adversos, como sobrecarga de ferro, riscos cardiovasculares e oncogênicos.

[008]Sobrecarga de ferro em pacientes com anemia que recebem suplementos de ferro frequentes, como ferro IV, é um efeito colateral perigoso. O excesso de ferro no corpo pode ser altamente tóxico, que pode afetar vários órgãos, levando a várias doenças sérias, como doenças do fígado, doenças cardíacas, diabetes mellitus, anormalidades hormonais e sistema imune disfuncional. Similarmente, pacientes que recebem transfusão de sangue correm o risco de toxicidades associadas à sobrecarga de ferro. Por exemplo, uma unidade de sangue transfundido contém aproximadamente 250 mg de ferro. Em pacientes que recebem numerosas transfusões, especialmente aqueles com talassemia maior, doença falciforme, síndrome mielodisplásica, anemia aplástica, anemia hemolítica e anemias sideroblásticas refratárias, que

podem se tornar dependentes de transfusão, o excesso de ferro dos eritrócitos transfundidos gradualmente se acumula em vários tecidos, causando morbidade e mortalidade. Assim, o excesso de ferro induzido pelo tratamento no corpo pode causar reações adversas severas, incluindo toxicidades para sistemas cardiovascular, gastrointestinal, imune, ósseo/cartilaginoso, reprodutivo e renal. Como uma opção de tratamento adicional ou alternativa ao ferro IV, a terapia com ESA (por exemplo, EPO, como Epogen® por Amgen) foi extensivamente administrada a uma ampla faixa de populações de pacientes, incluindo aqueles que sofrem de anemia relacionada ao câncer e induzida por quimioterapia em pacientes. Paradoxalmente, no entanto, estudos pré-clínicos e clínicos indicam que ESAs (por exemplo, EPO) poderiam potencialmente acelerar o crescimento do tumor e comprometer a sobrevivência em pacientes com câncer.

[009]Na tentativa de contornar pelo menos alguns desses efeitos colaterais indesejados associados com ESAs administradas exogenamente e suplementos de ferro (como transfusão), fator proilil hidroxilase indutível por hipoxia (HIF-PH) tem recebido atenção significativa como um potencial alvo terapêutico destinado a promover a produção endógena de EPO. Para este fim, mais recentemente, uma série de estabilizadores de HIF (por exemplo, inibidores de HIF-PH) se encontram sob desenvolvimento. Estes incluem, por exemplo, roxadustat (FibroGen), daprodustat (GSK), vadadustat (Akebia) e molidustat (Bayer). Apesar dos dados iniciais de eficácia mostrando superioridade ou não inferioridade às terapias com ESA, no entanto, preocupações de longo prazo permanecem sobre o risco de eventos

cardiovasculares adversos principais e aumentado risco de câncer. Em particular, porque o eixo HIF regula uma ampla faixa de funções biológicas essenciais *in vivo* (como angiogênese), a intervenção sistêmica desta via pode levar a efeitos indesejáveis além dos efeitos desejados na eritropoiese.

[0010]Como uma abordagem alternativa, inibidores de BMP6, incluindo anticorpos neutralizantes, estão sendo explorados por várias empresas em um esforço para tratar pacientes com anemia (como anticorpos anti-BMP6 (por exemplo, WO 2016/098079, Novartis; e, KY-1070, KyMab). No entanto, esses inibidores correm o risco de modular adversamente outros aspectos da sinalização de BMP6, incluindo formação de osso e cartilagem, função ovariana e metabolismo de gordura.

[0011]Separadamente, em um artigo de 2015 (The AAPS Journal 17(4): 930-938) Böser *et al.* (AbbVie) descreveram o uso terapêutico de dois anticorpos que se ligam a ambos RGMa e RGMc (isto é, RGMa/c) no tratamento de condições anêmicas associadas com desregulação de hepcidina usando dois modelos pré-clínicos, demonstrando intensificação na mobilização *in vivo* de ferro pelo anticorpo de RGMa/c não seletiva. No entanto, embora RGMa seja especulada como funcionando como um supressor de tumor, assim como um imunomodulador, o risco potencial de longo prazo de inibir a via RGMa não foi discutido neste artigo.

[0012]Assim, permanece uma necessidade significativa não atendida de prover um tratamento aperfeiçoado para doenças relacionadas ao ferro, em particular, distúrbios com restrição de ferro causados por hepcidina excessiva, por

exemplo, anemia de doença crônica (ACD), anemia por deficiência de ferro refratária a ferro (IRIDA) e anemia de doença renal crônica (CKD).

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0013] Os inventores da presente divulgação reconheceram o benefício de alcançar um maior nível de seletividade para inibir mais especificamente a via de sinalização que regula a homeostase do ferro, enquanto minimizando os potenciais efeitos sistêmicos indesejados. Para esse fim, os inventores procuraram inibir a sinalização de BMP6 em um modo seletivo de fígado ao especificamente direcionar molécula de orientação repulsiva c (RGMc), também conhecida como hemojuvelina (HJV) ou proteína hemocromatose tipo 2 (HFE2). Foi postulado que, deste modo, inibidores seletivos de RGMc podem proporcionar eficácia para o tratamento de distúrbios de restrição de ferro, enquanto alcançando um perfil de segurança aperfeiçoado, como comparado com abordagens existentes que afetam vias adicionais que são requeridas para outras funções biológicas. Assim, é contemplado que os inibidores seletivos de RGMc, de acordo com a presente divulgação, podem alcançar um perfil de segurança aperfeiçoado (por exemplo, toxicidades reduzidas ou eventos/efeitos adversos) tal como um risco reduzido de eventos cardíacos adversos principais (por exemplo, derrame) e/ou risco reduzido de progressão do câncer. Vantajosamente, os inibidores seletivos de RGMc podem reduzir o risco de sobrecarga de ferro associada com ferro administrado exogenamente (por exemplo, ferro IV ou transfusão). Os inibidores seletivos de RGMc podem permitir aos pacientes com anemia com restrição de ferro necessitar de uma dosagem

menor de terapias com ESAs e/ou suplemento de ferro, por exemplo, ferro IV ou transfusão menos frequente.

[0014]RGMc é um membro da classe RGM de proteínas, ou seja, RGMa, RGMb e RGMc. RGMs foram relatadas para interagir com múltiplos membros da classe BMP de fatores de crescimento, incluindo BMP6. RGMc é expresso como uma forma ligada à membrana e solúvel em mamíferos e desempenha um papel na homeostase/metabolismo do ferro dentro do eixo BMP

[0015]Tanto RGMa como RGMb são encontradas nos sistemas nervoso e imune, enquanto RGMc é encontrada no músculo esquelético, mas predominantemente no fígado. Embora cada um desses membros da família compartilhe homologia estrutural significativa, particularmente entre seus domínios de ligação de BMP, seus papéis fisiológicos são bastante diferentes. RGMa e RGMb são relatadas como tendo papéis na biologia do sistema nervoso, imunidade, inflamação, angiogênese e crescimento. Diferente de RGMa e RGMb, a função conhecida de RGMc está primariamente localizada para hepatócitos. Como tal, identificação de anticorpos seletivos de RGMc que não se ligam a RGMa ou RGMb poderia prover o potencial para modulação específica de fígado da biologia de BMP6.

[0016]Assim, RGMc é um correceptor obrigatório expresso pelo fígado para certas BMPs, como BMP6, que intensificam a expressão da hepcidina e, conseqüentemente, inibem o transporte de ferro. Em outras palavras, ao direcionar RGMc, cuja expressão é mais restritiva do que a de RGMa, RGMb e BMP6, efeitos mais específicos de tecido podem ser alcançados enquanto reduzindo os efeitos fora de alvo. Esta abordagem apresenta o potencial de se dirigir a anemias com restrição

de ferro e condições de sobrecarga de ferro sem inibir amplamente as funções de RGM e BMP6 em todo o corpo.

[0017]Consequentemente, a presente invenção inclui o reconhecimento que o direcionamento seletivo de RGMc proporciona uma abordagem vantajosa para alcançar tanto eficácia como segurança (toxicidades reduzidas), como comparada com abordagens convencionais, como antagonistas diretos de BMP6 e inibidores não seletivos de RGMc/RGMa/RGMb. Vantajosamente, diferente dos anticorpos da técnica anterior, que se ligam a RGMc não seletivamente (ver, por exemplo, PCT/US2012/069586), anticorpos da presente invenção são seletivos para RGMc em vez de RGMa e RGMb.

[0018]Consequentemente, em um aspecto, a invenção provê anticorpos específicos de RGMc, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, caracterizados em que eles se ligam seletivamente a RGMc. Em uma modalidade, a invenção provê um anticorpo isolado, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que seletivamente se liga à RGMc humana e não se liga, ou tem ligação reduzida, a RGMa humana e RGMb humana. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, inibe ou reduz integração de RGMc com BMPs (por exemplo, BMP6). Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, não inibe ou reduz interação de RGMc com neogenina.

[0019]Em outros aspectos, a invenção provê anticorpos específicos de RGMc, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que se ligam a porção(ões) específica(s) em RGMc que pode(m) prover seletividade particularmente vantajosa para RGMc em vez de RGMa/b. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc englobado pela presente

invenção se liga à primeira e/ou segunda região de ligação de RGMc humana, em que a primeira região de ligação é YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) dentro do domínio de hélice alfa1 e a segunda região de ligação é FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47) dentro do domínio de hélice alfa3. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga a pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da primeira região de ligação e/ou se liga a pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da segunda região de ligação.

[0020]Assim, a presente divulgação provê um anticorpo seletivo de RGMc que se liga a um epítipo compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46), opcionalmente compreendendo ainda um ou mais resíduos de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47).

[0021]A presente divulgação provê um anticorpo seletivo de RGMc que se liga a um epítipo compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47), opcionalmente compreendendo ainda um ou mais resíduos de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46).

[0022]Em algumas modalidades, o anticorpo seletivo de RGMc se liga a um epítipo compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e um ou mais resíduos de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47).

[0023]Em outros aspectos, a invenção provê anticorpos específicos de RGMc, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, em que o anticorpo é definido por sequências de aminoácido de suas regiões determinantes de complementariedade (CDRs), e variantes. Por exemplo, os anticorpos podem incluir uma ou mais sequências de CDR selecionadas dentre SEQ ID NOs: 6-11, SEQ ID NOs: 14-19, SEQ

ID NOs: 22-27, SEQ ID NOs: 30-35, e SEQ ID NOs: 38-43. Em algumas modalidades, cada CDR contém até 1, 2, 3, 4, ou 5 variações de resíduo de aminoácido, como comparadas com a sequência de CDR correspondente.

[0024]Em outros aspectos, a invenção provê anticorpos específicos de RGMc, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, em que o anticorpo é definido por suas sequências de região variável de cadeia pesada e/ou região variável de cadeia leve. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo um aminoácido como especificado em SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, ou SEQ ID NO: 44. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, ou SEQ ID NO: 45. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, como divulgado aqui. Em algumas modalidades, as regiões variáveis de cadeia pesada e/ou variáveis de cadeia leve têm uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à às regiões variáveis de cadeia pesada e variáveis de cadeia leve divulgadas aqui.

[0025]Em outros aspectos, a invenção provê anticorpos específicos de RGMc, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que competem para ligação a RGMc humana, e/ou se ligam ao mesmo epítipo como, um anticorpo divulgado aqui.

[0026]Em algumas modalidades, anticorpos preferidos de

acordo com a presente divulgação apresentam o seguinte perfil: *i*) o mecanismo de ação de tais anticorpos é tal que os anticorpos se ligam a RGMc, assim diretamente competindo com a ligação de BMP6 no eixo de sinalização BMP6-hepcidina; *ii*) tais anticorpos são ligantes seletivos de RGMc em vez de RGMa ou RGMb, preferivelmente sem reatividade cruzada detectável para os mesmos; *iii*) tais anticorpos mostram de reatividade cruzada de espécies para RGMc humana, roedores (camundongo e rato) e primatas não humanos (por exemplo, cyno); *iv*) tais anticorpos têm afinidade para RGMc humana e preferivelmente também roedor com  $K_D$  igual a ou menor do que 1 nM (isto é,  $K_D \leq 1$  nM), mais preferivelmente  $\leq 0,1$  nM; *v*) tais anticorpos mostram eficácia *in vivo*. Em um ou mais modelos pré-clínicos apropriados (por exemplo, ratos) a 10 mg/kg de dose ou menor (preferivelmente 5 mg/kg ou menor, por exemplo, 1 mg/kg ou menor) após 24-48 horas (preferivelmente após 24 horas); e/ou *vi*) tais anticorpos permitem formulações com solubilidade de pelo menos 50 mg/mL, mais preferivelmente  $\geq 100$  mg/mL (para dosagem subcutânea potencial). Em modalidades particularmente preferidas, todos dentre os critérios acima (*i*) – (*vi*) são atendidos.

[0027]Em outros aspectos, composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo divulgado aqui, e uso terapêutico de tais anticorpos/composições são providos. Tais anticorpos e composições podem ser usados em um método de tratamento de uma doença associada com RGMc em um indivíduo humano. Em algumas modalidades, a doença associada com RGMc é anemia, por exemplo, anemia com restrição de ferro (ou deficiência funcional de ferro). Em algumas modalidades, a anemia pode ser anemia com deficiência de ferro (IRIDA), anemia de doença

crônica (ACD), anemia induzida por tratamento (por exemplo, anemia induzida por quimioterapia), anemia relacionada com câncer, ou anemia associada com doença renal crônica (CKD). A CKD pode ser CKD dependente de diálise. A CKD pode ser CKD não dependente de diálise.

[0028]Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas/anticorpos podem ser administradas aos pacientes quem estão recebendo ou receberam outro agente terapêutico (por exemplo, agente estimulante de eritropoietina, estabilizador de HIF, suplemento de ferro, transfusão de ferro, agente anticâncer, e/ou um anti-inflamatório). Em algumas modalidades, o método reduz toxicidades associadas com ESAs, suplementos de ferro ou transfusão de ferro.

[0029]Assim, quando usados em conjunto com outra terapia para anemia (por exemplo, agente estimulante de eritropoietina, estabilizador de HIF, suplemento de ferro, transfusão de ferro, agente anticâncer, e/ou um anti-inflamatório), inibidores seletivos de RGMc divulgados aqui, podem diminuir a necessidade da terapia, de modo que a dosagem e/ou frequência da terapia podem ser reduzidas.

[0030]Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas/anticorpos podem ser usados para alcançar um alívio mais rápido de anemia quando usados em conjunto com outra terapia para anemia (por exemplo, agente estimulante de eritropoietina, estabilizador de HIF, suplemento de ferro, transfusão de ferro, agente anticâncer, e/ou um anti-inflamatório) em um indivíduo.

[0031]Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas/anticorpos podem ser usados para reduzir a

sobrecarga de ferro associada com terapia com ferro, como transfusões e ferro IV em pacientes.

[0032]Em algumas modalidades, composições farmacêuticas/anticorpos podem ser usados para sensibilizar anemia hiporresponsiva a ESA. Por exemplo, aproximadamente 5-10% de pacientes com CKD que tinham recebido terapia com ESA mostram hiporresponsividade para ESA (resistência a ESA). Inibidores seletivos de RGMc divulgados aqui podem ser usados para tornar este tipo de anemia mais responsivo à terapia com ESA.

[0033]De acordo com a invenção, o inibidor seletivo de RGMc englobado aqui pode ser usado no tratamento de anemia em uma quantidade eficaz para alcançar um ou mais dos seguintes: aumentar ferro sérico em um indivíduo, regular para baixo expressão de hepcidina em um indivíduo, aumentar saturação de transferrina em um indivíduo, aumentar eritropoiese em um indivíduo, diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) em um indivíduo, diminuir capacidade de ligação de ferro total (TIBC) em um indivíduo, e/ou aumentar níveis de ferritina sérica em um indivíduo.

[0034]Em outro aspecto, a invenção provê métodos para produzir uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor seletivo de RGMc, o método compreendendo as etapas de: i) identificar anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, quanto à capacidade para se ligar seletivamente a RGMc em vez de RGMA e RGMb; ii) identificar os anticorpos ou fragmento de ligação ao antígeno com base na etapa (i) quanto à capacidade para inibir/neutralizar a atividade RGMc *in vivo*; e iii) selecionar um anticorpo inibidor/neutralizante com base nas etapas (i) e (ii) para

formulação em uma composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o método para a produção compreende adicionalmente uma etapa de seleção positiva e, opcionalmente, uma etapa de seleção negativa. Em algumas modalidades, a etapa de identificação (ii) compreende adicionalmente medir um parâmetro de ferro selecionado do grupo consistindo em: ferro sérico, TIBC, UIBC, expressão de hepcidina e saturação de transferrina.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0035]**Figura 1** é uma representação da relação entre hepcidina e níveis de ferro sérico em anemia de inflamação/doença crônica. A representação também mostra como um antagonista de RGMc (por exemplo, anticorpo específico de RGMc) é esperado reduzir os níveis de hepcidina e aumentar ferro sérico.

[0036]**Figura 2** é um gráfico que mostra afinidade de ligação Octet® de anticorpos de primeira geração específicos de RGMc para RGMa, RGMb e RGMc.

[0037]**Figura 3A** é uma representação do ensaio *in vitro* de atividade de BMP6 usando células HepG2. Aumentada atividade de BMP6 (média±SD) indica inibição mediada por anticorpo de ligação de BMP6 a RGMc. **Figura 3B** é um gráfico que mostra aumentada atividade de BMP6 (média±SD) na presença de SR-RC-AB3 e SR-RC-AB4. Uma proteína de ligação a RGM não específica de alta afinidade foi usada como um controle positivo, junto com um controle negativo de isotipo.

[0038]**Figura 4A** é um gráfico que mostra ligação de anticorpos de RGMc amadurecidos por afinidade a RGMa-his (forma monovalente) ou RGMa-Fc (forma ávida). RGM01 (proteína de ligação a RGM não específica de alta afinidade)

foi usada como um controle positivo. **Figura 4B** mostra que reatividade cruzada para ambos os antígenos de RGMc humano e camundongo foi mantida durante todo o processo de amadurecimento por afinidade.

[0039]**Figura 5A** é um gráfico que mostra atividade (média±SD) da família SR-RC-AB3 de anticorpos amadurecidos por afinidade no ensaio de BMP6 *in vitro*. **Figura 5B** é um gráfico que mostra atividade (média±SD) da família SR-RC-AB4 de anticorpos amadurecidos por afinidade no ensaio de BMP6 *in vitro*. Uma proteína de ligação a RGM não específica de alta afinidade foi usada como um controle positivo, junto com um controle negativo de isotipo.

[0040]**Figura 6A** é um gráfico que mostra os efeitos de anticorpos amadurecidos por afinidade em níveis de ferro sérico (média±SD) em ratos. **Figura 6B** é um gráfico que mostra os efeitos de anticorpos amadurecidos por afinidade em capacidade de ligação a ferro não ligado (UIBC) (média±SD) em ratos. Uma proteína de ligação a RGM não específica de alta afinidade foi usada como um controle positivo, junto com um controle negativo de isotipo. Significância foi determinada por ANOVA 1-via versus controle de isotipo; \*valor  $p < 0,05$ , \*\*valor  $p < 0,01$ , \*\*\*valor  $p < 0,001$ .

[0041]**Figura 7A** é um gráfico que mostra níveis de ferro sérico (média±SEM) em ratos fêmeas Sprague-Dawley ao longo do tempo quando tratados com uma dose única de SR-RC-AB8 ou SR-RC-AB9 a 20 mg/kg. Um anticorpo de isotipo foi usado como um controle. **Figura 7B** mostra medições de ferro sérico (topo) e UIBC (fundo) (média±SEM) em estudos de PK/PD em que ratos fêmeas Sprague-Dawley foram administrados com uma dose única IV de SR-RC-AB8 a 0,6 mg/kg a 20 mg/kg (n=5-11

animais/grupo). **Figura 7C** mostra as concentrações séricas de anticorpo (média±SEM) dentro dos mesmos animais como um **Figura 7B**. **Figura 7D** ilustra a relação entre exposição ao anticorpo (PK) e parâmetros de ferro (PD) a 20mg/kg (todos os valores são média±SEM).

[0042]**Figura 8A** é um gráfico que mostra captação de deutério reduzida em peptídeos representando regiões A e B de RGMc na presença de SR-RC-AB9 Fab.

[0043]**Figura 8B** apresenta as sequências de aminoácido de regiões protegidas de deutério A e B alinhadas através das proteínas da família de RGM.

[0044]**Figura 8C** é um diagrama modelando a estrutura de RGMc na presença de BMP2. São destacadas a regiões A e B protegidas de troca H/D.

[0045]**Figura 8D** é um diagrama mapeando o epítipo SR-RC-AB9 fab no sítio de ligação a BMP2 e destacando os resíduos de contato potencial dentro da região B protegida de troca H/D.

[0046]**Figura 8E** é um diagrama mostrando homologia estrutural da região A protegida de troca H/D dentro de alfa hélices 1/2/3 de RGMa/b/c e destacando determinantes estruturais potenciais de especificidade de SR-RC-AB9 para RGMc em vez de RGMa e RGMb.

[0047]**Figura 8F** é um diagrama apresentando uma estrutura típica de fragmento Fab de um anticorpo destacando as CDRs H1-H3, que podem abranger a superfície de regiões de ligação A e B de RGMc.

[0048]**Figura 9A** mostra parâmetros de ferro sérico (ferro sérico e UIBC, média±SEM) sobre tempo mostrando uma dose I.V. única de SR-RC-AB8 a 10 mg/kg em *Cynomolgus macaques*

fêmeas. **Figura 9B** mostra a concentração sérica média (média±SEM) de SR-RC-AB8 até 10 semanas após dosagem. **Figura 9C** ilustra a relação entre exposição ao anticorpo (PK) e parâmetros de ferro sérico (PD). Todos os valores são média±SD.

[0049]**Figura 10A** mostra a mudança em ferro sérico de linha de base em dia -3 (média±SEM) com injeção semanal de SR-RC-AB8 a 20 mg/kg sozinho ou em combinação com epoietina alfa (EPO) (10 µg/kg) no modelo PGPS de anemia de doença crônica (ACD) em ratos Lewis fêmeas. **Figura 10B** (média±SD) mostra os níveis séricos absolutos de ferro em dia 24. Significância foi determinada por ANOVA 1-via versus controle de isotipo ACD; \*\*valor p <0,01. **Figura 10C** demonstra a mudança em hemoglobina a partir da medição de linha de base em dia -3 (média±SEM) em resposta a dosagem semanal de SR-RC-AB8 (20 mg/kg), EPO (10 µg/kg) ou ambos. Os níveis absolutos de hemoglobina (média±SD) em dia 24 são mostrados em **FIG 10D**. Significância foi determinada por ANOVA 1-via versus controle de isotipo de ACD; \*\*valor p <0,01.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DE DETERMINADAS MODALIDADES

##### **Definições**

[0050]A fim de que a divulgação possa ser mais facilmente compreendida, alguns termos são primeiro definidos. Estas definições devem ser lidas à luz do restante da divulgação e como entendidas por uma pessoa versada na técnica. Salvo se definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica. Definições adicionais são especificadas ao longo de toda a descrição detalhada.

[0051]*Afinidade*: Afinidade é a resistência da ligação da molécula (como um anticorpo) a seu ligando (como um antígeno). Ela é tipicamente medida e relatada pela constante de dissociação de equilíbrio ( $K_D$ ).  $K_D$  é a razão da taxa de dissociação do anticorpo ("taxa reversa" ou  $K_{off}$ ), como rapidamente ela se dissocia de seu antígeno, para a taxa de associação ao anticorpo ("taxa direta" ou  $K_{on}$ ) do anticorpo, como rapidamente ela se liga ao seu antígeno. Por exemplo, um anticorpo com uma afinidade de  $\leq 5$  nM tem um valor  $K_D$  que é 5 nM ou menor (isto é, 5 nM ou maior afinidade) determinado por um ensaio de ligação *in vitro* apropriado, como ensaios baseados em Interferometria de Biocamada (BLI) (por exemplo, Octet®), ensaios baseados em ressonância de plasmon de superfície (SPR) (por exemplo, Biacore) e ensaios baseados em titulação de equilíbrio de solução (por exemplo, descoberta mesoescala ou MDS).

[0052]*Anemia*: Anemia é uma condição média em que a contagem de células vermelhas do sangue ou hemoglobina é menor do que o normal. Para homens, anemia é tipicamente definida como nível de hemoglobina de menos do que 13,5 gramas/100 ml e em mulheres como hemoglobina de menos do que 12,0 gramas/100 ml. Anemia pode ser causada ou por uma diminuição na produção de células vermelhas do sangue ou hemoglobina, ou um aumento na perda (comumente devido a sangramento) ou destruição de células vermelhas do sangue. Anemia pode ser diagnosticada por, por exemplo, medindo os parâmetros de ferro sérico, que, quando desviados de faixas normais podem ser indicativos de anemia. Os parâmetros de ferro utilizáveis incluem: ferro sérico, capacidade de ligação de ferro total (TIBC), capacidade de ligação de ferro

insaturado (UIBC), e saturação de transferrina. Saturação de transferrina pode ser calculada a partir do ferro sérico dividida pela capacidade de ligação de ferro total (TIBC), expressa como uma porcentagem.

[0053]*Anemia de doença crônica*: O termo “anemia de doença crônica” ou “ACD” como usado aqui, refere-se à forma de anemia que é o resultado de outra condição. Tais condições podem estar associadas com infecção crônica, ativação imune crônica e/ou malignidade (por exemplo, doença renal crônica ou câncer).

[0054]*Anticorpo*: O termo “anticorpo” engloba qualquer imunoglobulina de ocorrência natural, recombinante, modificada ou engenheirada ou estrutura semelhante a imunoglobulina ou fragmento de ligação ao antígeno ou porção do mesmo, ou derivado do mesmo, como ainda descrito em outro lugar aqui. Assim, o termo refere-se a uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente a um antígeno alvo e inclui, por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos e biespecíficos. Um anticorpo intacto geralmente compreenderá pelo menos duas cadeias pesadas de comprimento completo e duas cadeias leves de comprimento completo, mas, em alguns casos, pode incluir menos cadeias, como anticorpos ocorrendo naturalmente em camelídeos que podem compreender apenas cadeias pesadas. Anticorpos podem ser derivados apenas de uma única fonte ou podem ser “quiméricos”, isto é, diferentes porções do anticorpo podem ser derivadas de dois anticorpos diferentes. Anticorpos, ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser produzidos em hibridomas, por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de

anticorpos intactos. O termo anticorpos, como aqui usado, inclui anticorpos monoclonais, anticorpos biespecíficos, minicorpos, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos (às vezes referidos aqui como "miméticos de anticorpos"), anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, fusões de anticorpos (às vezes aqui referidos como "conjugados de anticorpos"), respectivamente. Em algumas modalidades, o termo também engloba peptícorpos.

[0055]*Antígeno*: O termo "antígeno" O termo "antígeno" amplamente inclui quaisquer moléculas compreendendo um determinante antigênico dentro de uma região(s) de ligação à qual um anticorpo ou um fragmento se liga especificamente. Um antígeno pode ser uma molécula de unidade única (como um monômero de proteína ou um fragmento) ou um complexo constituído de múltiplos componentes. Um antígeno fornece um epítopo, por exemplo, uma molécula ou uma porção de uma molécula, ou um complexo de moléculas ou porções de moléculas, capazes de serem ligadas por um agente de ligação seletivo, como uma proteína de ligação ao antígeno (incluindo, por exemplo, um anticorpo). Assim, um agente de ligação seletivo pode se ligar especificamente a um antígeno que é formado por dois ou mais componentes em um complexo. Em algumas modalidades, o antígeno é capaz de ser usado em um animal para produzir anticorpos capazes de se ligar a esse antígeno. Um antígeno pode possuir um ou mais epítopos que são capazes de interagir com diferentes proteínas de ligação ao antígeno, por exemplo, anticorpos.

[0056]*Porção de ligação ao antígeno/fragmento*: Os termos "porção de ligação ao antígeno" ou "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, tal como aqui usados, referem-se

a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade para se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, RGMc/HJV). Porções de ligação ao antígeno incluem, mas não são limitadas a, qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, obtível enzimaticamente, sintético ou geneticamente modificado, que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Em algumas modalidades, uma porção de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser derivada, por exemplo, de moléculas de anticorpo completo usando quaisquer técnicas padrão apropriadas, como digestão proteolítica ou técnicas de engenharia genética recombinante envolvendo a manipulação e expressão de DNA codificando de anticorpos variáveis e, opcionalmente, domínios constantes. Exemplos não limitativos de porções de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) fragmentos Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iv) fragmentos Fv que consistem nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; (v) moléculas Fv de cadeia única (scFv) (ver, por exemplo, Bird *et al.* (1988) SCIENCE 242: 423-426; e Huston *et al.* (1988) PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 85 : 5879-5883); (vi) fragmentos de dAb (ver, por exemplo, Ward *et al.* (1989) NATURE 341: 544-546); e (vii) unidades de reconhecimento mínimo consistindo nos resíduos de aminoácidos que mimetizam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região determinante de complementaridade isolada (CDR)). Outras formas de anticorpos de cadeia simples, como

diacorpos, também são incluídas. O termo porção de ligação ao antígeno de um anticorpo inclui um "fragmento Fab de cadeia única" também conhecido como um "scFab", compreendendo um domínio variável de cadeia pesada (VH) de anticorpo, um domínio constante 1 de anticorpo (CH1), um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL), um domínio constante de cadeia leve de anticorpo (CL) e um ligante, em que os ditos domínios de anticorpo e o dito ligante têm uma das seguintes ordens na direção do terminal N para o terminal C: : a) VH-CH1-ligante-VL-CL, b) VL-CL-ligante-VH-CH1, c) VH-CL-ligante-VL-CH1 ou d) VL-CH1-ligante-VH-CL; e em que dito ligante é um polipeptídeo de pelo menos 30 aminoácidos, preferivelmente entre 32 e 50 aminoácidos.

[0057]*Região de ligação:* Como usado aqui, uma "região de ligação" é uma porção de um antígeno que, quando ligada a um anticorpo ou um fragmento do mesmo, pode formar uma interface da interação anticorpo-antígeno. Após a ligação do anticorpo, uma região de ligação se torna protegida da exposição da superfície, que pode ser detectada por técnicas apropriadas, como espectrometria de massa de troca de hidrogênio deutério (HDX-MS). A interação anticorpo-antígeno pode ser mediada via múltiplas regiões de ligação (por exemplo, duas ou mais). Uma região de ligação pode compreender um determinante antigênico ou epítipo.

[0058]*Interferometria de biocamada (BLI):* BLI é uma tecnologia livre de marcação para medir opticamente as interações biomoleculares, por exemplo, entre um ligando imobilizado na superfície da ponta do biossensor e um analito em solução, o que permite medições em tempo real das afinidades de anticorpos. BLI fornece a capacidade de

monitorar a especificidade de ligação, taxas de associação (por exemplo, taxa "ligada") e dissociação (por exemplo, taxa "reversa") ou concentração, com precisão e exatidão. Os instrumentos da plataforma BLI são comercialmente disponíveis, por exemplo, de ForteBio e são comumente referidas como o Sistema Octet®.

[0059]*BMP6/BMP-6*: Como usado aqui, os termos "proteína morfogenética de osso 6", "BMP6 (ou BMP-6)", "VGR", e "VGR1" referem-se, todos, à proteína que é um membro da família de proteínas morfogenéticas de osso, que interage com moléculas RGMc como um correceptor, por exemplo, BMP6 humana Nº. de AcessoNP\_001709.

[0060]*Anemia relacionada com câncer*: O termo "anemia relacionada com câncer" ou CRA, também pode ser mencionado como "anemia associada com câncer", significa anemia que é associada com, causada por e/ou exacerbada por, a presença de um câncer

[0061]*Anemia induzida por quimioterapia*: O termo "anemia induzida por quimioterapia", ou CIA, também mencionado como "anemia associada a quimioterapia", é um tipo de anemia induzida por tratamento e refere-se à anemia que é causada por e/ou exacerbada por quimioterapia. No contexto da presente divulgação, o termo "quimioterapia" englobará quaisquer agentes anticâncer, fármacos e terapias destinadas ao tratamento de câncer (por exemplo, matar as células malignas) em pacientes, que prejudicam a hematopoiese.

[0062]*Doença renal crônica*: O termo "doença renal crônica" (CKD) refere-se a doença renal em que se nota uma perda gradual da função renal durante um período de meses a anos. Por exemplo, tal doença renal pode ser causada por

diabetes, hipertensão, glomerulonefrite e doença policística renal. CKD é associada com produção de eritropoietina insuficiente (EPO) pelas células do rim, o que resulta em menos células vermelhas produzidas na medula óssea, levando à anemia.

[0063]*Benefício clínico*: Como usado aqui, o termo “benefícios clínicos” é destinado a incluir tanto eficácia como segurança de uma terapia. Assim, tratamento terapêutico que alcança um benefício clínico desejável é tanto eficaz como seguro (por exemplo, com toxicidades toleráveis ou aceitáveis ou eventos adversos).

[0064]*Terapia de combinação*: “Terapia de combinação” refere-se a regimes de tratamento para uma indicação clínica que compreendem dois ou mais agentes terapêuticos. Assim, o termo refere-se a um regime terapêutico em que uma primeira terapia compreendendo uma primeira composição (por exemplo, ingrediente ativo) é administrada em conjunto com uma segunda terapia compreendendo uma segunda composição (ingrediente ativo) a um indivíduo, destinada a tratar a mesma doença ou doença ou condição clínica sobreposta. A primeira e segunda composições podem ambas atuar no mesmo alvo celular, ou alvos celulares discretos. A frase “em conjunto com”, no contexto de terapias de combinação, significa que efeitos terapêuticos da primeira terapia se sobrepõe temporariamente e/ou espacialmente com efeitos terapêuticos de uma segunda terapia no indivíduo recebendo a terapia de combinação. Assim, as terapias de combinação podem ser formuladas como uma formulação única para administração simultânea, ou como formulações separadas, para administração sequencial das terapias.

[0065]*Epítopo combinatório ou combinatorial*: Um epítopo combinatorial é um epítopo que é reconhecido e ligado por um anticorpo combinatorial em um sítio (isto é, determinante antigênico) formado por porções não contíguas de um componente ou componentes de um antígeno, que, em uma estrutura tridimensional, ficam juntos em estreita proximidade para formar o epítopo. Um epítopo combinatorial é também referido como um epítopo descontínuo. Assim, anticorpos da invenção podem se ligar a um epítopo formado por dois ou mais componentes (por exemplo, porções ou segmentos) de RGMc. Um epítopo combinatório pode compreender resíduo(s) de aminoácido de uma primeira porção/componente de RGMc, e resíduo(s) de aminoácido de uma segunda porção/componente de RGMc, e assim por diante. Cada porção/componente pode ser de uma proteína única ou de duas ou mais proteínas de um complexo antigênico. Um epítopo combinatório é formado com contribuições estruturais de dois ou mais componentes (por exemplo, porções ou segmentos, como resíduos de aminoácido) de um antígeno ou complexo de antígeno.

[0066]*Competir ou competir cruzado*: O termo “competir” quando usado no contexto de proteínas de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) que compete para o mesmo epítopo significa competição entre proteínas de ligação ao antígeno como determinado por um ensaio em que a proteína de ligação ao antígeno sendo testada evita ou inibe (por exemplo, reduz) ligação específica da proteína de ligação ao antígeno de referência para um antígeno comum (por exemplo, RGMc ou um fragmento da mesma). Numerosos tipos de ensaios de ligação

competitivos podem ser usados para determinar se uma proteína de ligação ao antígeno compete com outra, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoensaio enzimático direto ou indireto (EIA) em fase sólida, ensaio de competição em sanduíche; EIA biotina-avidina em fase sólida direta; ensaio de marcação direta em fase sólida e ensaio em sanduíche de marcação direta em fase sólida. Comumente, quando a proteína de ligação ao antígeno competindo está presente em excesso, ela irá inibir (por exemplo, reduzir) ligação específica da proteína de ligação ao antígeno de referência para um antígeno comum por pelo menos 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% ou 75% ou mais. Em alguns casos, a ligação é inibida por pelo menos 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, ou 97% ou mais. Em algumas modalidades, um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se bloqueiam de modo cruzado com cada outro com relação ao mesmo antígeno, por exemplo, como testado por Biacor ou Octet, usando condições de teste padrão, por exemplo, de acordo com as instruções do fabricante (por exemplo, ligação testada em temperatura ambiente, ~20-25°C). Em algumas modalidades, o primeiro anticorpo ou fragmento do mesmo e o segundo anticorpo ou fragmento do mesmo podem ter o mesmo epítopo. Em outras modalidades, o primeiro anticorpo ou fragmento do mesmo e o segundo anticorpo ou fragmento do mesmo podem ter epítopos não idênticos, mas se sobrepondo. Em modalidades ainda adicionais, o primeiro anticorpo ou fragmento do mesmo e o segundo anticorpo ou fragmento do mesmo podem ter epítopos separados (diferentes) que estão em estreita

proximidade em um espaço tridimensional, de modo que a ligação do anticorpo é bloqueada de modo cruzado via impedimento estereoquímico. “Bloqueio cruzado” significa que ligação do primeiro anticorpo para um antígeno evita ligação do segundo anticorpo ao mesmo antígeno, e similarmente, ligação do segundo anticorpo para um antígeno evita ligação do primeiro anticorpo para o mesmo antígeno.

[0067]*Região determinante complementar*: Como usado aqui, o termo “CDR” refere-se à região determinante de complementariedade dentro das sequências variáveis de anticorpo. Existem três CDRs em cada uma das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, que são designadas CDR1, CDR2 e CDR3, para cada uma das regiões variáveis. O termo “conjunto de CDR” como usado aqui refere-se a um grupo de três CDRs que ocorrem em uma única região variável que podem se ligar ao antígeno. Os limites exatos destas CDRs foram definidos de modo diferente de acordo com diferentes sistemas. O sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.* (1987; 1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) não somente fornece um sistema de numeração não ambíguo de resíduos aplicável a qualquer região variável de um anticorpo, mas também fornece limites precisos de resíduos definindo as três CDRs. Essas CDRs podem ser referidas como CDRs de Kabat. Chothia e colaboradores (Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; e Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342: 877-883) verificaram que algumas sub-porções dentro das CDRs de Kabat adotam conformações de cadeia principal de peptídeo quase idênticas, apesar de ter grande diversidade no nível de sequência de aminoácido. Estas sub-porções foram

designadas como L1, L2 e L3 ou H1, H2 e H3, onde "L" e "H" designam regiões de cadeia leve e de cadeia pesada, respectivamente. Essas regiões podem ser referidas como CDRs de Chothia, que têm limites que se sobrepõem com CDRs de Kabat. Outros limites que definem CDRs sobrepostas com as CDRs de Kabat foram descritos por Padlan (1995) FASEB J. 9: 133-139 e MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-45. Ainda outras definições de limites de CDR podem não seguir estritamente um dos sistemas aqui descritos, mas, no entanto, se sobreporão às CDRs de Kabat, embora possam ser encurtados ou alongados à luz da previsão ou descobertas experimentais de que resíduos ou grupos de resíduos específicos ou mesmo CDRs inteiras não afetam significativamente a ligação ao antígeno. Os métodos usados aqui podem utilizar CDRs definidas de acordo com qualquer um destes sistemas, apesar de algumas modalidades usarem CDRs definidas por Kabat ou Chothia.

[0068]*Epítipo conformacional*: Um epítipo conformacional é um epítipo que é reconhecido e ligado por um anticorpo conformacional em uma conformação tridimensional, mas não em um peptídeo não duplicado da mesma sequência de aminoácidos. Um epítipo conformacional pode ser referido como um epítipo específico de conformação, epítipo dependente de conformação ou epítipo sensível à conformação. Um anticorpo correspondente ou fragmento do mesmo que se liga especificamente a tal epítipo pode ser referido como anticorpo específico para conformação, anticorpo seletivo para conformação ou anticorpo dependente de conformação. A ligação de um antígeno a um epítipo conformacional depende da estrutura tridimensional (conformação) do antígeno ou

complexo de antígeno.

[0069]*Região constante*: um domínio constante de imunoglobulina refere-se a um domínio constante de cadeia pesada ou leve. Sequências de aminoácido de domínio constante cadeia pesada e cadeia leve de IgG humana são conhecidas na técnica.

[0070]*Quantidade eficaz*: uma “quantidade eficaz” (ou quantidade terapeuticamente eficaz) é uma dosagem ou regime de dosagem que alcança benefícios estatisticamente significativos clínicos em uma população de pacientes.

[0071]*Epítopo*: O termo “epítopo” pode ser também referido como um determinante antigênico, é um determinante molecular (por exemplo, determinante polipeptídico) que pode ser especificamente ligado por um agente de ligação, imunoglobulina ou receptor de célula T. Os determinantes de epítopo incluem agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforil ou sulfonil e, em certas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas. Um epítopo reconhecido por um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo é um elemento estrutural de um antígeno que interage com CDRs (por exemplo, o sítio complementar) do anticorpo ou fragmento. Um epítopo pode ser formado por contribuições de vários resíduos de aminoácidos, que interagem com as CDRs do anticorpo para produzir especificidade. Um fragmento antigênico pode conter mais de um epítopo. Em certas modalidades, um anticorpo é o que se destina a se ligar especificamente a um antígeno quando reconhece seu antígeno alvo em uma mistura complexa de

proteínas e/ou macromoléculas. Por exemplo, anticorpos são ditos como “se ligando ao mesmo epítopo” se os anticorpos competem de modo cruzado (um impede a ligação ou o efeito modulador do outro).

[0072]*Agente estimulador da eritropoiese*: O termo “agente estimulador da eritropoiese” ou “ESA” como usado aqui refere-se a medicamentos que estimulam a medula óssea para produzir células vermelhas do sangue. eritropoietina ou EPO é um exemplo de um ESA e podem incluir eritropoietina alfa, delta, omega, e zeta, incluindo formas modificadas de eritropoietina, por exemplo, darbepoetina alfa. O termo “terapia com EPO” pode ser usado para englobar amplamente terapias que empregam um ou mais agentes ESA.

[0073]*Anticorpo humano*: O termo “anticorpo humano” (ou “anticorpo completamente humano”) como usado aqui, é destinado a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da presente divulgação podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs e, em particular, CDR3. No entanto, o termo “anticorpo humano”, como usado aqui, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências humanas do quadro de leitura.

[0074]*Anticorpo humanizado*: O termo “anticorpo humanizado” refere-se a anticorpos, que compreende

sequências de região variável de cadeia pesada e leve de uma espécie não humana (por exemplo, um camundongo), mas em que pelo menos uma porção da sequência VH e/ou VL foi alterada para ser mais "semelhante a humana", isto é, mais similar a sequências variáveis de linhagem germinativa humana. Um tipo de anticorpo humanizado é um anticorpo enxertado em CDR, em que sequências humanas de CDR são introduzidas em sequências VH e VL não humanas para substituir as correspondentes sequências de CDR não humanas. Também "anticorpo humanizado" é um anticorpo, ou uma variante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo, que imunoespecificamente se liga a um antígeno de interesse e que compreende uma região FR tendo substancialmente a sequência de aminoácido de um anticorpo humano e uma região de CDR tendo substancialmente a sequência de aminoácido de um anticorpo não humano. Como usado aqui, o termo "substancialmente" no contexto da CDR refere-se a uma CDR tendo uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácido de uma CDR de anticorpo não humano. Um anticorpo humanizado compreende substancialmente todos dentre pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) em que todas ou substancialmente todas as regiões de CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana (isto é, anticorpo doador) e todas ou substancialmente todas as regiões de FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina. Em uma modalidade, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos uma porção de uma região Fc de imunoglobulina, tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Em algumas modalidades um anticorpo humanizado contém a

cadeia leve assim como pelo menos o domínio variável da cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, dobradiça, CH2, CH3, e CH4 da cadeia pesada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém somente uma cadeia leve humanizada. Em algumas modalidades um anticorpo humanizado contém somente uma cadeia pesada humanizada. Em modalidades específicas, um anticorpo humanizado contém somente um domínio variável humanizado de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada humanizada.

[0075]*Espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS)*: HDX-MS é uma técnica bem conhecida empregada para interrogar confirmação de proteína e interações proteína-proteína em solução medindo o grau de acessibilidade ao solvente. Ver, por exemplo, Wei *et al.*, (2014) Drug Discov Today 19(1): 95-102. "Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications".

[0076]*Estabilizador de fator indutível por hipoxia (HIF)*: Os inibidores de HIF proli-hidroxilase (HIF-PH) podem estabilizar HIF (por exemplo, HIF-2 $\alpha$ ) assim podem resultar em produção endógena aumentada de eritropoietina (EPO) *in vivo*. Estes agentes podem ser também referidos como "ativadores de HIF". Exemplos de estabilizadores de HIF incluem, mas não são limitados a: Roxadustat (FG-4592); Vadadustat (AKB-6548), Daprodustat (GSK1278863), Dsidustat (ZYN-1), Molidustat (Bay 85-3934); MK-8617, YC-1, IOX-2, 2-metoxiestradiol, GN-44028, AKB-4924, Bay 87-2243, FG-2216 e FG-4497.

[0077]*Terapia com ferro*: Uma "terapia com ferro" como

usada aqui, refere-se a um tratamento terapêutico compreendendo um suplemento de ferro (por exemplo, ferro oral ou intravenoso (i.v.)).

[0078]*Isolado*: um anticorpo “isolado”, como usado aqui, refere-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo diferentes especificidades antigênicas. Em algumas modalidades, um anticorpo isolado é substancialmente livre de outro material celular não intencional e/ou produtos químicos.

[0079]*Potência*: O termo “*potência*” como usado aqui se refere a atividade de um fármaco, como um anticorpo inibidor (ou fragmento) tendo atividade inibidora, com relação à concentração ou quantidade do fármaco para produzir um efeito definido. Por exemplo, um anticorpo capaz de produzir certos efeitos em uma determinada dosagem é mais *potente* do que outro anticorpo que requer o dobro da quantidade (dosagem) para produzir efeitos equivalentes. Potência pode ser medida, por exemplo, por ensaios *in vitro*, como ensaios de ativação/inibição de BMP6 como aqui descrito. Potência também pode ser medida por ensaios *in vivo*, como aqueles que medem expressão de hepcidina, ferro sérico, expressão de ferritina e capacidade de ligação de ferro como aqui descrito. Tipicamente, anticorpos com afinidades maiores tendem a mostrar maior potência do que anticorpos com afinidades menores.

[0080]*Proteção (de exposição a solvente)*: No contexto de avaliação com base em HDX-MS de interações proteína-proteína, como anticorpo-antígeno-ligação, o grau pelo qual a proteína (por exemplo, a região da proteína contendo um epítopo) é exposta a um solvente, assim permitindo a

ocorrência de troca de prótons, inversamente se correlaciona com o grau de ligação/interação. Assim, quando um anticorpo descrito aqui se liga a uma região de um antígeno, a região de ligação é “protegida” de ser exposta ao solvente porque a interação proteína-proteína exclui a região de ligação de ser acessível ao solvente circundante. Assim, a região protegida é indicativa de um sítio de interação. Tipicamente, solventes apropriados são tampões fisiológicos.

[0081]*RGM*: Como usado aqui, “RGM” refere-se a uma classe de proteínas pertencendo à família da molécula de orientação repulsiva.

[0082]*RGMc*: Como usado aqui, os termos “molécula de orientação repulsiva C”, “RGMc”, “hemojuvelina”, “HJV”, “proteína de hemocromatose tipo 2”, e “HFE2A” referem-se, todos, a uma proteína que é um membro da família da molécula de orientação repulsiva de proteínas, que interage com moléculas de BMP como um correceptor, por exemplo, RGMc humana No. de Acesso NP\_998818; SEQ ID NO: 1.

[0083]*Distúrbio associado a RGMc*: Um “distúrbio associado a RGMc” significa i) qualquer doença ou distúrbio, em que pelo menos parte da patogênese e/ou progressão é atribuível à sinalização de RGMc ou desregulação da mesma, e/ou, ii) condições em que a inibição de RGMc pode proporcionar benefício clínico. Os distúrbios de RGMc podem incluir, por exemplo: anemia associada com inflamação/doença crônica (por exemplo, síndrome de Castleman, doença renal crônica, diabetes, insuficiência cardíaca/doença cardíaca, anemia hemolítica autoimune idiopática, hipertensão arterial pulmonar idiopática, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, artrite idiopática

juvenil sistêmica), anemia associada a câncer/distúrbios proliferativos (por exemplo, leucemia aguda, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica, linfoma não de Hodgkin. macroglobulinemia de Waldenström, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço, câncer hepatocelular, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata e câncer renal), anemia associada a infecções (por exemplo, endocardite, infecção por *Helicobacter pylori*, hepatite, vírus da imunodeficiência humana, malária), anemia associada a distúrbios neurológicos (por exemplo, derrame isquêmico agudo, esclerose lateral amiotrófica (ALS), isquemia cerebral focal/reperfusão, hemorragia cerebral intracraniana e hemorragia subaracnoidea), anemia induzida por tratamento ou associada a tratamento (por exemplo, induzida por antibióticos, associada à cirurgia bariátrica, induzida por quimioterapia, sobrecarga de ferro secundária), anemia associada com distúrbios genéticos ou outras condições (por exemplo, associada à idade (anemia em idosos), anemia de doença crítica, anemia de cirurgia, perda de sangue/hemorragia, calcifilaxia, doença celíaca, deficiência de cobre, anemia de Fanconi, hemocromatose hereditária (Tipo 4), esferocitose hereditária, IRIDA, obesidade, transplante de órgãos, hemoglobinúria paroxismal noturna, anemia falciforme, anemia induzida por esportes/exercícios, talassemia, púrpura trombocitopênica trombótica).

[0084]*Inibidor de RGM*: O termo “inibidor de RGM” ou “antagonista de RGM” refere-se a qualquer agente capaz de antagonizar atividades biológicas ou função de RGM (por

exemplo, RGMa, RGMb, e/ou RGMc). O termo não se destina a limitar seu mecanismo de ação e inclui, por exemplo, anticorpos neutralizantes, inibidores competitivos, antagonistas de receptor, intensificadores de clivagem de furina e/ou TMPRSS6, e peptídeos de RGM solúveis.

[0085]*Inibidor seletivo de RGMc*: O termo inibidor “seletivo de RGMc” (ou “específico de RGMc”) refere-se a um agente (incluindo moléculas pequenas e biológicas, por exemplo, anticorpos) capazes de seletivamente antagonizar as atividades biológicas ou função de RGMc em vez de RGMa e RGMb. Para clareza, um anticorpo monoclonal que se liga a e inibe/neutraliza ambas RGMa e RGMc não é um inibidor seletivo de RGMc.

[0086]*Ligação específica*: Como usado aqui, o termo “ligação específica” ou “especificamente se liga” significa que a interação do anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, com um antígeno é dependente da presença de uma estrutura particular (por exemplo, um determinante antigênico ou epítipo). Por exemplo, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga a uma proteína específica em vez de a proteínas de um modo geral.

[0087]Em algumas modalidades, um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, especificamente se liga a um alvo, por exemplo, RGMc, se o anticorpo tem um  $K_D$  para o alvo de pelo menos cerca de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-13}$  M, ou menos. Em algumas modalidades, os termos “ligação específica a um epítipo de RGMc”, “especificamente se liga a um epítipo de RGMc”, “ligação específica a RGMc”, ou “especificamente se liga à RGMc” como usados aqui, referem-se a um anticorpo, ou fragmento de ligação ao

antígeno do mesmo, que se liga à RGMc e tem uma constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $1,0 \times 10^{-7}$  M ou menos, como determinado por ensaios de ligação apropriados *in vitro*, como ressonância de plasmon de superfície e Interferometria de biocamada (BLI). Em uma modalidade, um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, pode se ligar especificamente a ortólogos tanto humanos como não humanos (por exemplo, camundongo) de RGMc. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tem uma diferença menor do que 5 vezes em reatividade cruzada a RGMc de humano, camundongo, rato e/ou cinomolgo.

[0088]O anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, também pode ter reatividade cruzada com outros membros da família de RGM (por exemplo, RGMA humana e RGMb humana). Consequentemente, em algumas modalidades o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga à RGMc humana com uma maior afinidade do que à RGMA humana e/ou RGMb humana (isto é, tem baixa reatividade cruzada). Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga à RGMc humana com pelo menos uma afinidade 1000 vezes maior (isto é,  $K_D$  1000 vezes menor) do que a RGMA humana e/ou RGMb humana.

[0089]*Indivíduo*: O termo "indivíduo" no contexto de aplicações terapêuticas refere-se a um indivíduo que recebe cuidados clínicos ou intervenção, como tratamento, diagnóstico, etc. Indivíduos apropriados incluem vertebrados, incluindo, mas não se limitando a, mamíferos (por exemplo, mamíferos humanos e não humanos). Quando o indivíduo é um indivíduo humano, o termo "paciente" pode ser usado indistintamente. Em um contexto clínico, o termo "uma

população de pacientes" ou "subpopulação de pacientes" é usado para se referir a um grupo de indivíduos que se enquadra em um conjunto de critérios, como critérios clínicos (por exemplo, apresentações de doenças, estágios de doenças, suscetibilidade a certas condições, capacidade de resposta à terapia, etc.), histórico médico, estado de saúde, sexo, faixa etária, critérios genéticos (por exemplo, portador de certa mutação, polimorfismo, duplicações de genes, repetições de sequência de DNA, etc.) e fatores de estilo de vida (por exemplo, tabagismo, consumo de álcool, exercícios, etc.).

[0090]*Ressonância de plasmon de superfície (SPR)*: Ressonância de plasmon de superfície é um fenômeno óptico que permite a detecção de interagentes não marcados em tempo real. Os biossensores baseados em SPR, como os comercialmente disponíveis de Biacore, podem ser empregados para medir interações biomoleculares, incluindo interações proteína-proteína, como ligação antígeno-anticorpo. A tecnologia é amplamente conhecida na arte e é utilizável para a determinação de parâmetros como afinidades de ligação, constantes de taxa cinética e termodinâmica.

[0091]*Capacidade de ligação a ferro total*: O termo "capacidade de ligação a ferro total", "TIBC", ou "capacidade de ligação a ferro transferrina" como usado aqui, refere-se ao teste de laboratório que mede a capacidade do sangue de ligar o ferro com transferrina. TIBC é determinada medindo-se a quantidade máxima de ferro que o sangue pode transportar, que é uma medição indireta de transferrina. Tipicamente, TIBC é calculado medindo o ferro sérico e a capacidade de ligação do ferro insaturado sérico (UIBC) e

somados os dois valores. Alternativamente, TIBC pode ser medida diretamente adicionando uma quantidade em excesso de ferro a uma amostra, removendo o ferro não ligado e medindo o ferro que está dissociado da transferrina. Geralmente, uma faixa "normal" para TIBC é, por exemplo, 255 - 450 ug/dL), embora medições possam variar dentro das populações.

[0092]*Toxicidade*: Como usado aqui, o termo "toxicidade" ou "toxicidades" refere-se a efeitos indesejados *in vivo* em pacientes associados com uma terapia administrada aos pacientes, como efeitos colaterais indesejáveis e eventos adversos. "Tolerabilidade" refere-se a um nível de toxicidades associadas a uma terapia ou regime terapêutico, que pode ser razoavelmente tolerado pelos pacientes, sem interromper a terapia devido às toxicidades. No contexto da presente divulgação, as toxicidades podem incluir, mas não são limitadas a: maior risco de morte, reações adversas cardiovasculares e/ou derrame, que podem estar associados a doenças crônicas, como doença renal crônica (CKD) e sobrevida global encurtada, risco aumentado de progressão tumoral ou recorrência em pacientes com câncer

[0093]*Tratar/tratamento*: O termo "tratar" ou "tratamento" inclui tratamentos terapêuticos, tratamentos profiláticos e aplicações em que se reduz o risco de um indivíduo desenvolver um distúrbio ou outro fator de risco. Assim, o termo pretende significar amplamente: causar benefícios terapêuticos para um paciente, por exemplo, intensificando ou reforçando a imunidade do corpo; reduzir ou reverter supressão imune; reduzir, remover ou erradicar células ou substâncias nocivas do corpo; reduzir a carga da doença (por exemplo, carga do tumor); prevenir a recorrência

ou recaída; prolongar um período refratário e/ou de outra forma melhorar a sobrevivência. O termo inclui tratamentos terapêuticos, tratamentos profiláticos e aplicações em que se reduz o risco de um indivíduo desenvolver um distúrbio ou outro fator de risco. Tratamento não requer a cura completa de um distúrbio e abrange modalidades nas quais se reduz sintomas ou fatores de risco subjacentes. No contexto da terapia de combinação, o termo também pode referir-se a: i) a capacidade de um segundo terapêutico para reduzir a dosagem eficaz de um primeiro terapêutico, de modo a reduzir os efeitos colaterais e aumentar a tolerabilidade; ii) a capacidade de uma segunda terapia para tornar o paciente mais responsivo (por exemplo, sensibilizar) a uma primeira terapia; iii) a capacidade de efetuar benefícios clínicos aditivos ou sinérgicos; e/ou iv) a capacidade de alcançar início de alívio mais rápido (por exemplo, benefícios terapêuticos).

[0094]*Capacidade de ligação a ferro não ligado*: O termo "capacidade de ligação a ferro não ligado" ou "UIBC", como usado aqui, refere-se à quantidade de capacidade de ligação a ferro disponível de transferrina. UIBC é com frequência calculada avaliando a diferença entre a TIBC e a quantidade de ferro sérico. Alternativamente, UIBC pode ser calculada diretamente pela adição de uma quantidade conhecida de excesso de ferro a uma amostra e subtraindo o ferro não ligado remanescente. Geralmente, embora medições possam variar entre populações ou indivíduos, uma faixa "normal" para UIBC é, por exemplo, 120 – 470 ug/dL (21 – 84 umol/L).

[0095]*Região variável*: O termo "região variável" ou "domínio variável" refere-se a uma porção das cadeias leves

e/ou pesadas de um anticorpo, tipicamente incluindo aproximadamente o terminal amino de 120 a 130 aminoácidos na cadeia pesada e cerca de 100 a 110 aminoácidos do terminal amino na cadeia leve. Em certas modalidades, regiões variáveis de diferentes anticorpos diferem extensivamente em sequência de aminoácidos, mesmo entre anticorpos da mesma espécie. A região variável de um anticorpo tipicamente determina especificidade de um anticorpo particular para seu alvo.

[0096]Exceto nos exemplos operacionais, ou onde indicado de outra forma, todos os números expressando quantidades de ingredientes ou condições de reação usados aqui devem ser entendidos como modificados em todos os casos pelo termo "cerca de".

[0097]Os artigos indefinidos "um" e "uma", como usados aqui no relatório descritivo e nas reivindicações, salvo claramente indicado o contrário, devem ser entendidos como significando "pelo menos um/uma".

[0098]A expressão "e/ou", como usada aqui no relatório descritivo e nas reivindicações, deve ser entendida como significando "um ou ambos" dos elementos assim conjugados, isto é, elementos que estão conjuntivamente presentes em alguns casos e de modo disjuntivo presentes em outros casos. Outros elementos podem opcionalmente estar presentes além dos elementos especificamente identificados pela cláusula "e/ou", sejam eles relacionados ou não a esses elementos especificamente identificados, salvo claramente indicado o contrário. Assim, como um exemplo não limitativo, uma referência a "A e/ou B", quando usada em conjunto com um termo de sentido aberto, como "compreendendo", pode se

referir, em uma modalidade, a A sem B (opcionalmente incluindo outros elementos diferentes de B); em outra modalidade, a B sem A (opcionalmente incluindo elementos diferentes de A); em ainda outra modalidade, a ambos A e B (opcionalmente incluindo outros elementos); etc.

[0099]Como usado aqui no relatório descritivo e nas reivindicações, a expressão "pelo menos um", em referência a uma lista de um ou mais elementos, deve ser entendida como significando pelo menos um elemento selecionado dentre qualquer um ou mais dos elementos na lista de elementos, mas não necessariamente incluindo pelo menos um de cada um e cada elemento especificamente listado na lista de elementos, e não excluindo quaisquer combinações de elementos na lista de elementos. Esta definição também permite que elementos possam estar opcionalmente presentes diferentes dos elementos especificamente identificados na lista de elementos aos quais a expressão "pelo menos um" se refere, sejam eles relacionados ou não aos elementos especificamente identificados. Assim, como um exemplo não limitativo, "pelo menos um de A e B" (ou, de modo equivalente, "pelo menos um de A ou B" ou, de modo equivalente, "pelo menos um de A e/ou B") pode se referir, em uma modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, A, sem B presente (e, opcionalmente, incluindo elementos diferentes de B); em outra modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, B, sem A presente (e, opcionalmente, incluindo elementos diferentes de A); em ainda outra modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, A, e pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, B (e opcionalmente incluindo outros elementos); etc.

[00100]O uso de termos ordinais, como "primeiro", "segundo", "terceiro", etc., nas reivindicações para modificar um elemento de reivindicação não conota por si só qualquer prioridade, precedência ou ordem de um elemento de reivindicação sobre outro ou a ordem temporal na qual os atos de um método são realizados, mas são usados apenas como marcações para distinguir um elemento de reivindicação tendo um certo nome de outro elemento tendo o mesmo nome (mas para uso do termo ordinal) para distinguir os elementos de reivindicação.

[00101]As faixas dadas aqui são entendidas como uma abreviatura para todos os valores dentro da faixa. Por exemplo, uma faixa de 1 a 50 é entendida como incluindo qualquer número, combinação de números, ou sub-faixa do grupo que consiste em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50, por exemplo, 10-20, 1-10, 30-40, etc.

#### ***Regulação de homeostase de ferro via eixo BMP6/hepcidina***

[00102]Hepcidina é um pequeno peptídeo secretado pelo fígado e o regulador central de homeostase de ferro no corpo. Sua principal função é inibir o transporte de ferro das células para o compartimento plasmático de sangue a partir de três fontes principais: a absorção de ferro da dieta através dos enterócitos duodenais, a liberação de ferro da hemoglobina das células vermelhas recicladas e a liberação de ferro armazenado a partir de hepatócitos. A regulação de ferro é alcançada pela degradação mediada pela hepcidina da ferroportina exportadora de ferro, localizada na superfície

de enterócitos duodenais, macrófagos reticuloendoteliais residentes no fígado e baço e hepatócitos. Porque a ferroportina é degradada, macrófagos e enterócitos duodenais não são mais capazes de liberar ferro no sangue e, como uma consequência, a transferência de ferro para transferrina é reduzida. Consequentemente, como mostrado na **Figura 1**, à medida que a expressão de hepcidina aumenta, exportação de ferro diminui. Inversamente, à medida que a expressão de hepcidina diminui, exportação de ferro aumenta. Consequentemente, distúrbios hereditários e adquiridos que alteram a produção normal de hepcidina podem causar deficiência de ferro (níveis elevados de hepcidina) ou sobrecarga de ferro (deficiência de hepcidina).

[00103] Como o principal agente na manutenção da homeostase de ferro, a síntese de hepcidina é regulada transcricionalmente por vários estímulos, incluindo concentrações intra- e extracelulares de ferro, demanda eritropoiética e inflamação. Em indivíduos saudáveis, a hepcidina é mantida em níveis homeostáticos devido à atividade de um grupo de proteínas coordenadoras no complexo regulador de ferro. Análises genéticas de pacientes que sofrem de hemocromatose hereditária (HH), nos quais mutações genéticas causam absorção e armazenamento excessivo de ferro na periferia com toxicidade para tecidos/órgãos, levaram à identificação de proteínas-chave que regulam a homeostase de ferro. O tipo mais comum de HH é causado por mutações no gene HFE, que codifica uma proteína atípica de classe MHC que interfere com ligação de receptor de transferrina-transferrina. Formas mais raras de HH ocorrem em pacientes com mutações em TFR2, Hepcidina e HJV (a seguir referida

como "RGMc"). Cada uma dessas formas raras é caracterizada por níveis inapropriadamente baixos de hepcidina, apoiando papéis para RGMc, HFE e TFR2 na regulação a montante da expressão de hepcidina. Curiosamente, mutações em RGMc são a causa mais comum de uma forma grave de HH juvenil, que, se não tratada, pode ser fatal.

[00104]Expressão da hepcidina é estimulada por estímulos extracelulares, incluindo o sinal inflamatório IL-6 e as proteínas morfogenéticas ósseas de sinalização de desenvolvimento (BMPs). Camundongos com deleção direcionada de componentes de sinalização de BMP (ligandos, receptores e correceptores específicos) são caracterizados por fenótipos de sobrecarga de ferro, destacando o papel crítico da sinalização de BMP na expressão de hepcidina. Regulação de sinalização de BMP ocorre em vários níveis, a fim de gerar especificidade e sintonização fina do sinal; intensificação ou interferência do correceptor com interação ligando-receptor é um mecanismo predominante para regulação da sinalização de BMP. RGMc é o correceptor chave para a intensificação mediado por BMP de expressão de hepcidina no fígado e acredita-se que sensibilize hepatócitos em níveis baixos de BMP em condições fisiológicas normais, intensificando, assim, a expressão de hepcidina e regulando a homeostase de ferro. Devido à sua potência e papel confinado na regulação de ferro, RGMc é um alvo terapêutico atraente para distúrbios em que restrição de ferro associada à hepcidina desempenha um papel chave, como a anemia de doenças crônicas.

[00105]BMPs são uma ampla subfamília de fatores de crescimento na superfamília TGF $\beta$  originalmente descoberta

por sua capacidade de induzir a formação de osso e cartilagem. Além de sua associação com osso, como muitos outros fatores de crescimento, as BMPs estão envolvidas em um conjunto diverso de processos biológicos. Por exemplo, enquanto BMP6 desempenha papéis em muitas biológicas diferentes, incluindo metabolismo de gordura e fisiologia ovariana, no fígado ela funciona como um ponto de controle crítico em modulação de ferro em humanos via regulação de hepcidina, um regulador central da homeostase de ferro.

[00106]Como tal, BMP6 tem sido um alvo terapêutico alternativo para o tratamento de doenças e distúrbios envolvendo desregulação de ferro. Vários grupos, incluindo Eli Lilly e Novartis, desenvolveram anticorpos que se ligam especificamente e neutralizam BMP6 e propuseram uso terapêutico de tais anticorpos para tratamento de condições, como anemia. No entanto, essas abordagens, destinadas a inibir diretamente a sinalização de BMP6 sistemicamente, perturbariam provavelmente os numerosos processos fisiológicos diferentes em que BMP6 está envolvida, elevando o risco de causar efeitos inadvertidos e indesejados (por exemplo, toxicidades).

[00107]Mais recentemente, as moléculas de orientação repulsiva (RGMs) foram identificadas como proteínas que interagem com BMP. A família de proteínas RGM inclui pelo menos três membros conhecidos, ou seja, RGMA, RGMb e RGMc, e são assim chamados devido ao papel do membro fundador, RGMA, na orientação do crescimento do axônio durante embriogênese.

[00108]Estruturalmente, RGMs são proteínas ancoradas por glicosilfosfatidil-inositol (GPI) consistindo em uma

sequência de sinal N-terminal, um motivo RGD (RGMa e RGMc), um domínio parcial de von Willebrand tipo D (vWFD) e um sítio de clivagem autocatalítico Gly-Asp-Pro-His (GDPH). Foi relatado que RGMs interagem com múltiplos membros da classe de BMP de fatores de crescimento, incluindo BMP6 como um correceptor. Cada um dos membros da família RGM compartilha homologia estrutural significativa (ver Tabela 1), particularmente entre seus domínios de ligação de BMP. RGMa e RGMc, em particular, compartilham elevada homologia de sequência.

[00109]Apesar da homologia considerável entre os membros da família, suas expressões e funções biológicas parecem distintas. RGMa e RGMb são relatadas como tendo papéis em biologia do sistema nervoso, imunidade, inflamação, angiogênese e crescimento, enquanto RGMc é expressa primariamente no fígado (por exemplo, hepatócitos), que é o principal sítio de síntese de hepcidina e está envolvido na regulação do metabolismo de ferro.

[00110]Evidências apoiam a noção de que a inibição do eixo BMP6/RGMc pode ser uma abordagem terapêutica atraente para tratar a desregulação de ferro. Por exemplo, US2013/0330343A1 divulgou que um anticorpo monoclonal, que se liga e neutraliza RGMa/c, é capaz de 1) diminuir os níveis de hepcidina, 2) aumentar os níveis de ferro sérico e saturação de transferrina e 3) diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC), em animais tratados.

[00111]Os inventores da presente divulgação reconheceram que a inibição seletiva de RGMc pode fornecer perfis de segurança melhorados. Foi argumentado que tais inibidores deveriam somente direcionar à RGMc expressa no fígado,

enquanto mantendo as funções biológicas normais de RGMa e RGMb intactas. Como tal, os inventores procuraram identificar anticorpos seletivos para RGMc que não se ligam a RGMa ou RGMb, a fim de alcançar modulação específica de fígado da atividade de BMP6.

**Tabela 1:**

| RGM  | % identidade para hRGMc | % homologia para hRGMc | % homologia em hélices |
|------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| RGMa | 46                      | 59                     | 80                     |
| RGMb | 41                      | 58                     | 50                     |

***RGMc/hemojuvelina (HJV)***

[00112]Existem pelo menos três isoformas de RGMc humana, incluindo uma proteína precursora (isoforma a; SEQ ID NO: 1) e duas variantes de emenda (isoforma b e isoforma c; SEQ ID NOs: 2 e 3, respectivamente). Isoforma de RGMc humana “a”, a isoforma predominante, consiste em 426 aminoácidos e representa o transcrito mais longo. Salvo indicado de outro modo aqui, o termo “RGMc” refere-se a uma proteína de comprimento completo, heterodímero, ou produto de clivagem de isoforma a de RGMc. Abaixo estão as sequências de aminoácido das isoformas de RGMc, RGMa e RGMb.

[00113]RGMc humana isoforma a (No. de Acesso NP\_998818; SEQ ID NO: 1):

1 mgepgqspsp rsshgsptl stltlllllc ghahsqckil rcnaeyvsst  
lslrsggssg

61 alrggggggr gggvgsgglc ralrsyalct rrtartcrgd  
lafhsavhgi edlmiqhncs

121 rqqptapppp rgpalpgags glpapdpcdy egrfsrlhgr  
ppgflhcasf gdphvrsfhh

181 hfhtcrvqga wplldndflf vqatsspmal ganatatrkl

tiifknmqec idqkvyqaev

241 dnlpvafedg singgdrpgg sslsiqtanp gnhveiqaay  
igtthiirqt agqlsfsikv

301 aedvamafsa eqdlqlcvvg cppsqrllsrs ernrrgaiti  
dtarrlckeg lpvedayfhs

361 cvfdvllsgd pnftvaaqaa ledaraflpd lekhlflpsd  
agvplssatl lapllsglflv

421 lwlciq

RGMc humana isoforma b (No. de Acesso NP\_660320; SEQ ID  
NO: 2):

1 miqhncsrqg ptapppprgp alpgagsglp apdpcdyegr fsrlhgrppg  
flhcasfgdp

61 hvrsfhhfhf tcrvqgawpl ldndflfvqa tsspmalga  
atatrklthi fknmqecidq

121 kvyqaevdnl pvafedgsin ggdrpggssl siqtanpgnh  
veiqaayigt thhrrqtagg

181 lsfsikvaed vamafsaeqd lqlcvggcpp sqrlsrsern  
rrgaitidta rrlckeglpv

241 edayfhscvf dvlisgdpnf tvaaqaaled araflpdlek  
hlflpsdagv plssatllap

301sglflvwl ciq

RGMc humana isoforma c (No. de Acesso NP\_998817; SEQ ID  
NO: 3):

1 mqecidqkvy qaevdnlpva fedgsinggd rpggsslsiq tanpgnhvei  
qaayigthh

61 irqtagqlsf sikvaedvam afsaeqdlql cvggcppsq  
lsrsernrrg aitidtarrr

121 ckeglpvda yfhscvfdvl isgdpnftva aqaaledara  
flpdlekhl flpsdagvpls

181tllaplls glflvwlciq

RGMa humana (No. de Acesso NP\_001159755; SEQ ID NO: 4):

1 mgglgprrag tsrerlvvtg ragwmgmgrg agrsalgfwf tlaflfcsfp  
aatpckilk

61 cnsefwsats gshapasddt pefcaalrsy alctrtrtart  
crgdlayhsa vhgiedlmsq

121 hncskdgpts qprlrtlppa gdsqersdsp eichyeksfh  
khsatpnyth cglfgdphlr

181 tftdrfqtck vqgawplidn nylvqvnt pvlpgsaata  
tskltiifkn fgecvdqkv

241 qaemelpaa fvdgsknggd khganslkit ekvsgqhvei  
qakyigttiv vrqvgryltf

301 avrmpeevvn avedwdsqgl ylcrlgcpln qqidfqaft  
naegtgarrl aaaspaptap

361 etfpyetava kckeklpved lyyqacvfdl lttgdnftl  
aayyaedvk mlhsnkdklh

421ertrdlpg raaaglpap rpllgalvpl lallpvfc

RGMb humana (No. de Acesso NP\_001012779; SEQ ID NO: 5):

1 mirkkkrksa ppgpcrshgp rpatapapp speptrpawt gmglraapss  
aaaaaeveq

61 rrspglcppp lellllllfs lgllhagdcq qpaqcriqkc  
ttdfvsltsh lnsavdgfds

121 efckalraya gctqrtskac rgnlvysav lgisdllmsqr  
ncskdgptss tnpevthdpc

181 nyhshagare hrrgdqnpps ylfcgldgdp hlrtfkdnfq  
tckvegawpl idnnyslvqv

241 tnvpvpgss atatnkitii fkahhectdq kvyqavtddl  
paafvdgtts ggdsdaksrl

301 iveresghyv emharyigtt vfvrqvgryl tlairmpedl  
amsyeesqdl qlcvngcpls

361 eriddgqqqv sailghslpr tslvqawpgy tletantqch  
ekmpvkdiyf qscvfdlltt

421 gdanftaaah saledvealh prkerwhifp ssgngtprgg  
sdlsvslglt clilivfl

RGMc é um correceptor para BMP6, que é parte de um complexo maior de proteínas multiméricas compreendendo BMP6, BMP6 ligando receptores de treonina quinase de serina tipo I e tipo II (por exemplo, Alk2, Alk3, BMPR2 e ActRIIA), neogenina, RGMc (HJV), HFE, e TFR2. Ligação de BMP6 a seus receptores e, por sua vez, ao complexo multimérico, induz fosforilação de SMAD a jusante, que induz translocação nuclear dos fatores de transcrição que medeiam a transcrição aumentada de hepcidina. Assim, Sinalização de BMP6 foi mostrada para modular diretamente homeostase de ferro através da regulação da expressão de hepcidina.

[00114]RGMc é expressa formas ligadas à membrana e solúveis em mamíferos. A RGMc ligada à membrana é encontrada na superfície celular em duas formas diferentes, uma forma de cadeia única de comprimento completo e uma forma de duas cadeias (heterodiméricas) ligadas por dissulfeto. A forma heterodimérica de RGMc é o resultado da autoproteólise ocorrendo em um motivo FGDPH produzindo um fragmento C-terminal de cerca de 35 kD e um fragmento N-terminal de cerca de 20 kD, que permanece ligado por ligações dissulfeto. Embora tenha sido demonstrado que RGMc de cadeia única e comprimento completo interage com BMP2, estudos anteriores sugerem que autoproteólise é importante para a duplicação correta da proteína e que o processamento autocatalítico é uma característica geral e importante de RGMs. Por exemplo, foi demonstrado que apenas a forma heterodimérica de RGMc

ativa a expressão de hepcidina *in vitro*, e processamento autocatalítico de RGMa é requerido para seu efeito inibidor de crescimento em axôns. Além disso, várias mutações associadas a JHH estão localizadas perto do sítio de clivagem autocatalítica de RGMc e esses mutantes têm atividades de baixa sinalização e são frequentemente retidos no ER.

[00115]Adicionalmente, pelo menos duas proteases, furina e TMPRSS6, mostraram clivar RGMc para produzir várias formas solúveis de RGMc (s-RGMc ou s-HJV). Especificamente, a clivagem da furina produz um fragmento s-RGMc de ~ 40 kD. Este fragmento foi demonstrado como atuando como um receptor chamariz que compete com a RGMc ligada à membrana pela ligação aos ligandos de BMP, reduzindo assim a expressão de hepcidina e aumentando os níveis de ferro sérico. Curiosamente, atividade da furina demonstrou ser intensificada em deficiência de ferro e hipóxia. No entanto, como a furina também participa do processamento da pró-hepcidina, o efeito da furina na expressão da hepcidina pode ser complexo e, muito provavelmente, depende das condições celulares particulares.

[00116]Por outro lado, TMPRSS6 pode clivar RGMc em múltiplos sítios levando a fragmentos de clivagem com funcionalidade variável. O papel de TMPRSS6 na regulação da expressão da hepcidina foi demonstrado por estudos demonstrando que sua inativação em camundongos leva a um aumento nos níveis de hepcidina, um bloqueio da absorção de ferro e anemia. Além disso, anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro (IRIDA) pode ser causada por mutações no gene codificando TMPRSS6/matriptase-2. No entanto, também foi mostrado que os fragmentos RGMc secretados por TMPRSS6

tem uma capacidade reduzida de se ligar a BMPs.

[00117]Como discutido acima, hepcidina é um regulador chave da mobilização sistêmica do ferro e, por sua vez, é regulada pela sinalização mediada pela proteína morfogenética óssea (BMP), particularmente BMP6. RGMc se liga a BMP6 e regula a via mediada por Smad, levando à regulação da expressão de hepcidina, e, por sua vez, degradação da ferroportina, uma proteína transportadora de ferro, bloqueando, assim, a liberação de ferro de macrófagos e enterócitos na circulação. Assim, atividade de RGMc aumentada provavelmente aumenta expressão de hepcidina, levando à liberação de ferro reduzida das células. Nesse cenário, a atividade da RGMc pode causar um desequilíbrio na homeostase de ferro devido à depleção sistêmica de ferro, resultando em doenças relacionadas ao ferro. Em outras palavras, um aumento mediado por RGMc em níveis de hepcidina pode resultar em anemia, enquanto sua expressão diminuída pode ser a característica causadora de muitas doenças de hemocromatose (sobrecarga de ferro).

[00118]Consequentemente, o presente pedido provê anticorpos monoclonais seletivos de RGMc e fragmentos dos mesmos, que especificamente se ligam e inibem a atividade de RGMc *in vivo*, sem reação cruzada com RGMa ou RGMb. Conforme o melhor conhecimento do requerente, estes anticorpos e fragmentos representam uma nova classe de tais inibidores. As razões para esta abordagem incluem as seguintes. Primeiro, baseado no reconhecimento de que a hepcidina é um regulador chave de homeostase de ferro, e que BMP6 é requerida no processo, inibidores que bloqueiam esse eixo de sinalização são desejáveis. Segundo, porque BMP6 é amplamente expressa

e desempenha uma ampla gama de funções biológicas, é vantajoso evitar o direcionamento direto de BMP6. Porque a família RGM de proteínas é conhecida como interagindo com e correceptores de BMPs, como BMP6, BMP2 e BMP4, o direcionamento do correceptor pode possibilitar uma abordagem alternativa e atraente para bloquear a sinalização para regular hepcidina. Terceiro, com o reconhecimento, no entanto, de que RGMa e RGMb desempenham funções biológicas distintas, tais inibidores devem inibir seletivamente RGMc, sem afetar RGMa/b. Deste modo, a inibição seletiva de RGMc no fígado pode ser alcançada ao mesmo tempo em que minimiza efeitos potenciais colaterais indesejados que podem surgir do bloqueio inadvertido e sistemático da função normal de BMP6, RGMa e RGMb.

[00119]A presente divulgação provê anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que especificamente se ligam a RGMc ou complexo contendo RGMc e inibem sua função, mas não se ligam a ou inibem a função de RGMa e RGMb. Em algumas modalidades, os anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, descritos aqui, inibem interação de RGMc com a BMP, por exemplo, BMP6. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos descritos aqui não inibem a interação de RGMc com neogenina. Em qualquer uma das modalidades, os anticorpos e fragmentos englobados pela presente invenção proporcionam uma especificidade exótica e direcionamento da via de RGMc. Vantajosamente, tais anticorpos ou fragmentos pode alcançar toxicidade diminuída. Importante, porque a expressão de RGMc é restrita a um subconjunto de tecidos, a inibição mediada por RGMc da via de BMP6, em oposição a antagonizar

diretamente a própria BMP6, ou ampliar inibição da família de RGM, deve atingir efeitos seletivos de tecido, portanto, reduzindo as toxicidades decorrentes de efeitos sistêmicos.

[00120]Assim, a presente invenção engloba o reconhecimento de que o uso de inibidores seletivos de RGMc provê uma abordagem vantajosa para o tratamento de condições envolvendo desregulação de ferro, como comparado com inibidores não seletivos. Para este fim, os inventores da presente divulgação procuraram planejar e gerar anticorpos ou fragmentos dos mesmos que especificamente e seletivamente direcionam RGMc, sem direcionar RGMa ou RGMb *in vivo*. Isto é baseado, pelo menos em parte, na noção de que a seletividade proporciona perfis melhorados de segurança (por exemplo, toxicidades reduzidas ou efeitos adversos) para a administração *in vivo* de tais inibidores.

[00121]Por exemplo, direcionamento de RGMc junto com RGMa e/ou RGMb pode aumentar toxicidades em potencial associadas com a expressão extensiva de tecido não fígado de RGMa/b e seu papel conhecido em vários processos fisiológicos. Especificamente, RGMa demonstrou ser crítica para o desenvolvimento embrionário e é expressa em múltiplos tecidos, incluindo cérebro, pele, coração, fígado, pulmão, rim, testículo e intestino de camundongo adulto. Consistente com esses dados, aproximadamente metade dos camundongos deficientes no gene RGMa morrem no útero, com um fenótipo exancefálico e defeitos principais morfológicos e de desenvolvimento. RGMa também demonstrou desempenhar um papel crítico em regeneração neuronal, recuperação e sobrevivência pós-lesão. Patologicamente, níveis elevados de RGMa são observados nas lesões cerebrais de lesão e derrame isquêmico;

placas amiloides de doença de Alzheimer; e a substância negra dos pacientes com doença de Parkinson. No entanto, expressão reduzida de RGMA e situação de metilação de promotor aumentada são demonstradas como estando intimamente associadas à gênese e progressão do câncer colorretal (Zhao *et al.*, *Oncol Rep* 2012;27(5):1653-9). Estas linhas de evidência sugerem que anticorpos reativos cruzados RGMA/c, por exemplo, podem causar ou exacerbar a progressão de câncer.

[00122]Além do desenvolvimento embrionário e da regeneração neuronal, RGMA também demonstrou regular as respostas imunes a lesões; ela é expressa por células dendríticas em lesões cerebrais e da medula espinhal e modula as respostas das células T. Especificamente, inibição de RGMA demonstrou suprimir a resposta de células T em um modelo de camundongo de esclerose múltipla (encefalomielite autoimune experimental; EAE). Em humanos, inibição de RGMA reduz a proliferação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs). Além disso, entre os subconjuntos de células T, RGMA demonstrou ser altamente expresso em células Th17. Uma vez que células Th17 desempenham um papel importante, *inter alia*, na defesa do hospedeiro contra infecção pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos para os tecidos infectados, perturbação farmacológica da função imune normal é indesejável. Vantajosamente, ao direcionar seletivamente e inibir RGMc e não RGMA, tais efeitos colaterais podem ser evitados com eficácia.

[00123]Embora muitas dessas funções estejam relacionadas a lesão, RGMA também pode modular regeneração neuronal em

indivíduos saudáveis. Considerando seus papéis importantes na regulação da resposta do SNC a lesão, respostas imunes e papéis desconhecidos em vários órgãos, inibição de atividade de RGMA é indesejável devido ao risco de potenciais efeitos colaterais fora do alvo.

[00124]RGMB também demonstrou ser expresso em múltiplos tecidos, incluindo cérebro, osso, coração, pulmão, fígado, rim, testículo, ovário, útero, epidídimo e pituitária em camundongo adulto. Camundongos nocaute de RGMB morrem no dia 12 pós-natal e têm crescimento atrofiado. RGMB, como RGMA, também tem um papel na resposta imune. Especificamente, RGMB é expresso em níveis elevados em macrófagos pulmonares e células dendríticas. Em sua ausência, níveis de IL-6 são elevados nesses tipos de células, sugerindo um papel na regulação de inflamação. RGMB também demonstrou promover o crescimento de neurites. Recentemente, RGMB foi descrito como um parceiro de ligação para PD-L2 no pulmão, e o bloqueio dessa interação impediu o desenvolvimento de tolerância respiratória, destacando um papel do RGMB em imunidade pulmonar. Isso levanta a possibilidade de que inibidores que interferem com a função de RGMB podem causar desregulação de respostas imunes.

[00125]Além disso, foi sugerido que RGMB pode atuar como um supressor de tumor, possivelmente inibindo a ativação de SMAD. De fato, expressão reduzida de RGMB está associada a um fraco prognóstico em carcinoma pulmonar de células não pequenas. O gene RGMB é inativado em um subtipo de câncer colorretal, e RGMB demonstrou ser um regulador negativo da proliferação de câncer de mama *in vitro*. Assim, não apenas a inibição de RGMB poderia ter um efeito sobre os sistemas

imune e nervoso, mas tal inibição também poderia aumentar progressão e/ou desenvolvimento de câncer.

[00126]Em resumo, os padrões de expressão amplamente difundidos e funções pleiotrópicas em diversos processos biológicos dos membros da família relacionados, RGMa e RGMb, estão em contraste com o padrão de expressão restrito e papel focalizado de RGMc na manutenção da homeostase de ferro. Isto sublinha a importância de realizar uma abordagem específica de RGMc para a descoberta de novas terapêuticas para anemias com restrição de ferro sem complicar os efeitos fora do alvo.

[00127]Assim, em um aspecto, a invenção é destinada a inibir a função de RGMc sem invocar efeitos colaterais potenciais ou toxicidades associadas com interferência com atividades de RGMa e RGMb *in vivo*. É contemplado que inibição seletiva de fígado da sinalização de BMP6 através da intervenção de função de RGMc pode fornecer um modo de atingir uma variedade de anemias com restrição de ferro, incluindo anemia de doença renal crônica, anemia de câncer e anemia de inflamação crônica.

[00128]De acordo com a invenção, inibidores seletivos de RGMc não inibem outros fatores intimamente relacionados como RGMa e RGMb. Um tal inibidor pode ser usado para normalizar homeostase de ferro incluindo o tratamento de várias formas de anemia ou doenças envolvendo anemia com restrição de ferro. De fato, como demonstrado aqui, anticorpos específicos de RGMc são mostrados como seletivamente reprimindo o eixo proteína morfogenética de osso 6 (BMP6)-hepcidina e aumentando a disponibilidade de ferro para eritropoiese.

***Inibidores de RGMc***

[00129]Para realizar os métodos da presente invenção, quaisquer agentes inibidores apropriados de RGM/HJV podem ser empregados, desde que tais agentes inibam ou antagonizem RGM com seletividade suficiente para a isoforma RGMc. Preferivelmente, tais agentes inibidores de RGMc não têm atividades inibitórias mensuráveis em relação a RGMa e RGMb em dosagem que forneça benefícios clínicos (por exemplo, eficácia terapêutica e perfis de toxicidade aceitáveis) quando administrados a indivíduos humanos.

[00130]Como usado aqui, o termo "inibidor" se refere a qualquer agente capaz de bloquear ou antagonizar sinalização de RGMc. Os agentes inibidores apropriados incluem pequenas moléculas, agentes à base de ácido nucleico, biológicos (por exemplo, agentes à base de polipeptídeo, como anticorpos e outros agentes de descoberta) e quaisquer combinações dos mesmos.

[00131]Em algumas modalidades, tais agentes podem prevenir ou reduzir atividade de RGMc por inibição da associação de RGMc com o complexo de receptor de BMP. Em algumas modalidades, tais agentes podem prevenir ou reduzir atividade de RGMc por inibição de ligação de RGMc a BMP. Em algumas modalidades, tais agentes podem prevenir ou reduzir atividade de RGMc por inibição de ligação de RGMc a BMP6. Em algumas modalidades, tais agentes podem prevenir ou reduzir atividade de RGMc por inibição de ligação de RGMc a neogenina. Em algumas modalidades, tais agentes são inibidores competitivos de ligação RGMc/BMP6. Em algumas modalidades, tais agentes são inibidores competitivos de ligação de RGMc/neogenina.

[00132]Em algumas modalidades, o inibidor pode ser um anticorpo (incluindo fragmentos do mesmo, como anticorpos de domínio (dAbs) como descritos em, por exemplo, Patentes US 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; e 6.696.245), um inibidor de molécula pequena, Adnectin, um Affibody, um DARPIn, um Anticalin, um Avimer, um Versabody ou uma terapia gênica. O uso de inibidores englobados pela presente invenção também inclui miméticos de anticorpo, como monocorpos e anticorpos de domínio único. Monocorpos são proteínas de ligação sintética que empregam tipicamente um domínio de fibronectina tipo III (FN3) como um andaime molecular. Monocorpos incluem Adnectins™ que são baseados no 10º domínio de fibronectina tipo III.

***Anticorpos específicos de RGMc***

[00133]Recentemente, anticorpos monoclonais que especificamente se ligam a RGMa/RGMc foram mostrados como aumentando ferro sérico em ratos e macacos cinomolgo por regulação para baixo de hepcidina (Böser *et al.* (2015) AAPS J. 2015 Jul; 17(4): 930–938). Neste caso, os investigadores não relataram toxicidades óbvias em animais saudáveis que receberam os anticorpos RGMa/RGMc, e normalização dos parâmetros do sangue foram vistos após um período de recuperação (~12 semanas) após um período de dosagem. No entanto, riscos potenciais associados com inibição simultânea de RGMa, por exemplo, no sistema nervoso, não são discerníveis a partir do trabalho publicado. Além disso, numerosas outras toxicidades são possíveis em humanos, conforme descrito acima, como as associadas com a expressão de células não hepáticas de RGMa (por exemplo, toxicidades associadas com o cérebro, pele, coração, pulmão, rim,

testículo e intestino). A expressão reduzida de RGMA também foi mostrada como relacionada com a gênese e progressão do câncer colorretal. Além disso, a expressão de RGMA foi demonstrado como regulando respostas imunes a lesões. Assim, a presente invenção provê novos inibidores seletivos de RGMc que não se ligam e inibem atividade/função de RGMA e/ou RGMb.

[00134]Em algumas modalidades da invenção, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem ou reduzem a interação de RGMc com BMPs. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem ou reduzem interação de RGMc com BMP6. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc não inibem ou reduzem interação com neogenina.

[00135]Em alguma modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) modulam a interação de RGMc com uma ou mais das seguintes proteínas de interação; HFE, TFR2, ALK2, ALK3, BMPR2, ACVR2A e Tmprss6. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com uma ou mais das seguintes proteínas de interação; HFE, TFR2, ALK2, ALK3, BMPR2, ACVR2A e Tmprss6. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com HFE. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com TFR2. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com ALK2. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com ALK3. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com BMPR2. Em

outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com ACVR2A. Em outra modalidade, os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos) inibem interação de RGMc com Tmprss6.

[00136]Em algumas modalidades, a RGMc compreende uma sequência de aminoácido de mamífero naturalmente ocorrendo. Em alguma modalidade, a RGMc compreende uma sequência de aminoácido humana naturalmente ocorrendo. Em algumas modalidades, a RGMc compreende uma sequência de aminoácido humana, de macaco, de rato ou de camundongo. Em algumas modalidades, a RGMc é uma sequência humana de RGMc, ou um fragmento da mesma, como especificada em SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a RGMa é uma forma solúvel de RGMc.

[00137]Em alguma modalidade, os inibidores seletivos de RGMc se ligam a RGMc com um  $K_D$  de  $\leq 5$  nM (por exemplo,  $\leq 0,1$  nM) em um teste de ligação *in vitro* apropriado, tal como Octet® ou MSD. Por outro lado, diferente de anticorpos RGMc previamente descritos, estes anticorpos específicos de RGMc não mostram qualquer ligação detectável para RGMa, ou RGMb sob as mesmas condições de ensaio. Por exemplo, os inibidores seletivos de RGMc podem se ligar a RGMc com um  $K_D$  de  $\leq 0,1$  nM, mas não mostram qualquer ligação detectável para RGMa ou RGMb por MSD sob as mesmas condições de ensaio.

[00138]Em algumas modalidades, a RGMa compreende uma sequência de aminoácido de mamífero naturalmente ocorrendo. Em alguma modalidade, a RGMa compreende uma sequência de aminoácido humana, naturalmente ocorrendo. Em algumas modalidades, a RGMa compreende uma sequência de aminoácido humana, de macaco, de rato ou de camundongo. Em algumas modalidades, a RGMa é uma sequência de RGMa humana, ou um

fragmento da mesma, como especificada em SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, a RGMa é uma forma solúvel de RGMa.

[00139]Em algumas modalidades, a RGMb compreende uma sequência de aminoácido de mamífero naturalmente ocorrendo. Em alguma modalidade, a RGMb compreende uma sequência de aminoácido humana naturalmente ocorrendo. Em algumas modalidades, a RGMb compreende uma sequência de aminoácido de humano, de macaco, de rato ou de camundongo. Em algumas modalidades, a RGMb é uma sequência de RGMb humana, ou um fragmento da mesma, como especificada em SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, a RGMb é uma forma solúvel de RGMb.

[00140]Aspectos da invenção referem-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga seletivamente a uma RGMc e compreende seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3.

[00141]Em um aspecto, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, se ligam seletivamente a RGMc e têm uma ou mais sequências de CDR substancialmente similares a CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, e/ou CDRL3, como comparado com uma região CDR correspondente. Por exemplo, os anticorpos podem incluir uma ou mais sequências de CDR (por exemplo, SEQ ID NOs: 6-11, SEQ ID NOs: 14-19, SEQ ID NOs: 22-27, SEQ ID NOs: 30-35, ou SEQ ID NOs: 38-43) cada contendo até 1, 2, 3, 4, ou 5 variações de resíduo de aminoácido como comparado com a região CDR correspondente em qualquer uma de SEQ ID NOs: 6-11, SEQ ID NOs: 14-19, SEQ ID NOs: 22-27, SEQ ID NOs: 30-35, ou SEQ ID NOs: 38-43.

[00142]Como usado aqui, a expressão “variações de aminoácido” ou “mudanças de aminoácido” ou “mudanças em

resíduos de aminoácido” inclui substituições e/ou deleções de aminoácidos.

[00143]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende pelo menos três CDRs selecionadas dentre as seguintes, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido, por exemplo 1, 2, ou 3 mudanças de aminoácido para cada uma das CDRs: CDR-H1: SEQ ID NO: 6; CDR-H2: SEQ ID NO: 7; CDR-H3: SEQ ID NO: 8; CDR-L1: SEQ ID NO: 9; CDR-L2: SEQ ID NO: 10; e, CDR-L3: SEQ ID NO: 11.

[00144]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende pelo menos três CDRs selecionadas dentre as seguintes, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido, por exemplo 1, 2, ou 3 mudanças de aminoácido para cada uma das CDRs: CDR-H1: SEQ ID NO: 14; CDR-H2: SEQ ID NO: 15; CDR-H3: SEQ ID NO: 16; CDR-L1: SEQ ID NO: 17; CDR-L2: SEQ ID NO: 18; e, CDR-L3: SEQ ID NO: 19.

[00145]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende pelo menos três CDRs selecionadas dentre as seguintes, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido, por exemplo 1, 2, ou 3 mudanças de aminoácido para cada uma das CDRs: CDR-H1: SEQ ID NO: 22; CDR-H2: SEQ ID NO: 23; CDR-H3: SEQ ID NO: 24; CDR-L1: SEQ ID NO: 25; CDR-L2: SEQ ID NO: 26; e, CDR-L3: SEQ ID NO: 27.

[00146]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende pelo menos três (por exemplo, 3, 4, 5 ou preferivelmente todas as 6) CDRs selecionadas dentre as seguintes, opcionalmente

compreendendo até 3 mudanças de aminoácido, por exemplo 1, 2, ou 3 mudanças de aminoácido para cada uma das CDRs: CDR-H1: SEQ ID NO: 30; CDR-H2: SEQ ID NO: 31; CDR-H3: SEQ ID NO: 32; CDR-L1: SEQ ID NO: 33; CDR-L2: SEQ ID NO: 34; e, CDR-L3: SEQ ID NO: 35.

[00147]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende pelo menos três CDRs selecionadas dentre as seguintes, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido, por exemplo 1, 2, ou 3 mudanças de aminoácido para cada uma das CDRs: CDR-H1: SEQ ID NO: 38; CDR-H2: SEQ ID NO: 39; CDR-H3: SEQ ID NO: 40; CDR-L1: SEQ ID NO: 41; CDR-L2: SEQ ID NO: 42; e, CDR-L3: SEQ ID NO: 43.

[00148]Em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H1, CDR-H2, e/ou CDR-H3 tendo mudanças particulares de aminoácido.

[00149]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 como especificada em SEQ ID NO: 14, com a condição que o resíduo serina em posição 4 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma arginina. Em outra modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 como especificada em SEQ ID NO: 14, com a condição que o resíduo alanina em posição 7 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma serina. Em outra modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 como especificada em SEQ ID NO: 14, com a condição que o resíduo serina em posição 9 de SEQ ID NO: 14 pode ser

substituído com uma glutamina. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 como especificada em SEQ ID NO: 14, com a condição que (i) o resíduo serina em posição 4 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma arginina; (ii) o resíduo alanina em posição 7 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma serina; e/ou (ii) o resíduo serina em posição 9 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma glutamina.

[00150]Em alguma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 como especificada em SEQ ID NO: 15, com a condição que o resíduo treonina em posição 8 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma valina. Em outra modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende e CDR-H2 como especificada em SEQ ID NO: 15, com a condição que o resíduo asparagina em posição 10 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma serina. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 como especificada em SEQ ID NO: 15, com a condição que (i) o resíduo treonina em posição 8 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma valina; e/ou (ii) o resíduo asparagina em posição 10 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma serina.

[00151]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 como especificada em SEQ ID NO: 16, com a condição que o resíduo isoleucina em posição 5 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma tirosina. Em outra modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma

CDR-H3 como especificada em SEQ ID NO: 16, com a condição que o resíduo alanina em posição 6 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma valina. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 como especificada em SEQ ID NO: 16, com a condição que (i) o resíduo isoleucina em posição 5 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma tirosina; e/ou (ii) o resíduo alanina em posição 6 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma valina.

[00152]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L1 como especificada em SEQ ID NO 17, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L2 como especificada em SEQ ID NO 18, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L3 como especificada em SEQ ID NO 19, opcionalmente compreendendo até 3 mudanças de aminoácido.

[00153]Em uma modalidade particular, a invenção provê um anticorpo isolado que especificamente se liga a RGMc humana, em que o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, e em que o anticorpo compreende pelo menos três das seguintes seis CDRs:

a) CDR-H1: SEQ ID NO: 14, com a condição que:

i) o resíduo serina em posição 4 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma arginina;

ii) o resíduo alanina em posição 7 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma serina; e/ou

iii) o resíduo serina em posição 9 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma glutamina;

b) CDR-H2: SEQ ID NO: 15, com a condição que:

i) o resíduo treonina em posição 8 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma valina; e/ou

ii) o resíduo asparagina em posição 10 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma serina;

c) CDR-H3: SEQ ID NO: 16, com a condição que:

i) o resíduo isoleucina em posição 5 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma tirosina; e/ou

ii) o resíduo alanina em posição 6 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma valina;

d) CDR-L1: SEQ ID NO: 17;

e) CDR-L2: SEQ ID NO: 18; e

f) CDR-L3: SEQ ID NO: 19.

[00154]Em algumas modalidades, tal anticorpo se liga a RGMc humana com um  $K_D$  de  $< 1$  nM (preferivelmente  $< 0,1$  nM) como medido em um ensaio de ligação *in vitro* apropriado, como Octet® ou MSD. Em modalidades preferidas, tal anticorpo é também específico de isoforma em que ele seletivamente se liga a e inibe a atividade de RGMc e não se liga a e inibe a atividade de RGMa e RGMb.

[00155]Em algumas modalidades, sequências de CDR de cadeia pesada e/ou CDR de cadeia leve não compreendem quaisquer mudanças de aminoácido. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 compreendendo uma sequência como

especificada em SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 9. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 11.

[00156]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9.

[00157]Em uma modalidade particular, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende as sequências de CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3 de cadeia pesada, como especificadas em SEQ ID NOs: 6, 7, e 8, respectivamente, sequências de CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3 de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NOs: 9, 10, e 11, respectivamente.

[00158]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 19.

[00159]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L3 tendo a

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17.

[00160]Em uma modalidade particular, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende as sequências de CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3 de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NOs: 14, 15, e 16, respectivamente, e sequências de CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3 de cadeia leve como especificada em SEQ ID NOs: 17, 18, e 19, respectivamente.

[00161]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO:

25. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO:

26. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO:

27.

[00162]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 27. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 26. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 25.

[00163]Em uma modalidade particular, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende as sequências de CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3 de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NOs: 22, 23, e 24, respectivamente, e sequências de CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3 de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NOs: 25, 26, e 27, respectivamente.

[00164]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 31. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 32. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 33. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 35.

[00165]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 32 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 35. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 31 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L2 tendo a sequência de aminoácido de

SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 33.

[00166]Em uma modalidade particular, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende as sequências de CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3 de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NOs: 30, 31, e 32, respectivamente, e sequências de CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3 de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NOs: 33, 34, e 35, respectivamente.

[00167]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 39. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-H3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L1 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 41. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L2 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO: 42. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma CDR-L3 compreendendo uma sequência como especificada em SEQ ID NO:

43.

[00168]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 40 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L3 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 39 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L2 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma CDR-H1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 38 e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma CDR-L1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41.

[00169]Em uma modalidade particular, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende as sequências de CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3 de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NOs: 38, 39, e 40, respectivamente, e sequências de CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3 de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NOs: 41, 42, e 43, respectivamente.

[00170]Aspectos da invenção referem-se a um anticorpo monoclonal, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga seletivamente a RGMc, e que compreende uma sequência de região variável de cadeia pesada e uma sequência de região variável de cadeia leve.

[00171]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de

ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, ou SEQ ID NO: 44. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, ou SEQ ID NO: 45.

[00172]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 12 e/ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 13. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 12 ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 13. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de

aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 13.

[00173]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 20 e/ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 21. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 20 ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 21. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 21.

[00174]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 28 e/ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo

menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 29. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 28 ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 29. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 28 e uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 29.

[00175]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 36 e/ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 37. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 36 ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 37. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 36 e uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 37.

[00176]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 44 e/ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 45. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 44 ou uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 45. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 44 e uma região variável de cadeia leve tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 45.

[00177]Em algumas modalidades, as sequências de região variável de cadeia pesada e/ou de região variável de cadeia leve não variam dentro de qualquer uma das sequências de CDR aqui providas. Por exemplo, em algumas modalidades, o grau de variação de sequência (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%) pode ocorrer dentro de uma sequência de aminoácido variável de cadeia pesada e/ou variável de cadeia leve, excluindo qualquer uma das sequências de CDR aqui providas.

[00178]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 12 e/ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 13. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 12 ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 13. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 12 e um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 13.

[00179]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de

aminoácido especificada em SEQ ID NO: 20 e/ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 21. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 20 ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 21. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 20 e um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 21.

[00180]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 28 e/ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 29. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 28 ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 29. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 28 e um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência

de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 29.

[00181]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 36 e/ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 37. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 36 ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 37. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 36 e um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 37.

[00182]Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 44 e/ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 45. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 44 ou um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 45. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou

fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 44 e um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 45.

[00183]Em algumas modalidades, a “identidade percentual” de duas sequências de aminoácido é determinada usando o algoritmo de Karlin e Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, modificado como em Karlin e Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Um tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, *et al.* J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. As buscas BLAST de proteínas podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação=50, comprimento de palavra=3 para obter sequências de aminoácido homólogas às moléculas de proteína de interesse. Onde existem lacunas entre duas sequências, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Quando utilizando programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros de *default* dos programas respectivos (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados.

[00184]Em qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno descritos aqui, uma ou mais mutações conservativas podem ser introduzidas nas CDRs ou sequências do quadro de leitura em posições onde os resíduos não estarão provavelmente envolvidos em uma interação anticorpo-antígeno. Em algumas modalidades, tais mutação(ões) conservativa(s) podem ser introduzidas nas CDRs ou sequências do quadro de leitura em posição(s) onde os resíduos não estarão provavelmente envolvidos na interação

com uma RGMc, como determinado com base na estrutura cristalina. Em algumas modalidades, a interface provável (por exemplo, resíduos envolvidos em uma interação antígeno-anticorpo) pode ser deduzida de informações estruturais conhecidas sobre outros antígenos que compartilham similaridades estruturais.

[00185]Como usado aqui, uma “substituição de aminoácido conservativa” refere-se a uma substituição de aminoácido que não altera a carga relativa ou característica de tamanho da proteína em que a substituição de aminoácido é feita. Variantes podem ser preparadas de acordo com os métodos para alterar a sequência de polipeptídeo conhecida do versado na arte como são encontradas em referências que compilam tais métodos, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, *et al.*, eds., 2<sup>a</sup>. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, ou *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. As substituições de aminoácidos conservativas incluem substituições feitas contra aminoácidos dentro dos seguintes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D.

[00186]Em algumas modalidades, os anticorpos providos aqui compreendem mutações que conferem propriedades desejáveis aos anticorpos. Por exemplo, para evitar complicações potenciais devido à troca do braço Fab, que é conhecido por ocorrer com IgG4 mAbs nativos, os anticorpos providos aqui podem compreender uma mutação ‘Adair’ estabilizante (Angal *et al.*, “A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric

mouse/human (IgG4) antibody", *Mol Immunol* 30, 105-108; 1993), onde serina 228 (numeração EU; numeração Kabat resíduo 241) é convertida em prolina resultando em uma sequência de dobradiça semelhante a IgG1 (CPPCP (SEQ ID NO: 48)). Consequentemente, qualquer um dos anticorpos pode incluir uma mutação 'Adair' estabilizante ou a sequência de aminoácido CPPCP (SEQ ID NO: 48). Em uma modalidade, um anticorpo descrito aqui compreende um domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada de uma IgG<sub>4</sub> humana tendo uma substituição da cadeia principal de Ser a Pro, que produz uma dobradiça tipo IgG1 e permite a formação de ligações dissulfeto inter-cadeias.

[00187]Anticorpos desta divulgação que seletivamente se ligam a RGMc podem compreender, opcionalmente, regiões constantes de anticorpo ou partes das mesmas. Por exemplo, um domínio V<sub>L</sub> pode ser fixado em sua extremidade C-terminal a um domínio constante de cadeia leve como C<sub>K</sub> ou C<sub>λ</sub>. Similarmente, um domínio V<sub>H</sub> ou fragmento do mesmo pode ser fixado a toda ou parte de uma cadeia pesada como IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e qualquer subclasse de isotipo. Anticorpos podem incluir regiões constantes apropriadas (ver, por exemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Assim, anticorpos dentro do escopo desta divulgação, incluem domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, combinados com qualquer região constante apropriada. Em modalidades exemplares, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, compreendem um domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada contendo todos ou um

fragmento de um domínio constante de IgG<sub>1</sub> humana ou uma IgG<sub>4</sub> humana. Em algumas modalidades, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio constante de imunoglobulina de cadeia leve contendo todos ou um fragmento de um domínio constante de Ig lambda humana ou um domínio constante de Ig kappa humana.

[00188]Em algumas modalidades, anticorpos que seletivamente se ligam a RGMc podem ou não incluir a região de quadro de leitura dos anticorpos divulgados aqui. Em algumas modalidades, anticorpos que seletivamente se ligam a RGMc são anticorpos murinos e incluem sequências de região de quadro de leitura de murinos. Em outras modalidades, os anticorpos são anticorpos quiméricos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em outra modalidade, os anticorpos são anticorpos humanizados, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em outra modalidade, os anticorpos são anticorpos completamente humanos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma região de quadro de leitura compreendendo uma sequência de aminoácido da linhagem germinativa humana.

[00189]Os anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, descritos aqui, podem ter qualquer configuração apropriada para ligação ao antígeno. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende quatro cadeias de polipeptídeos, incluindo duas regiões variáveis de cadeia pesadas e duas regiões variáveis de cadeia leves. Em outra modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada e

uma região variável de cadeia leve. Em modalidades exemplares, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento scFab, um scFv, ou um diacorpo.

[00190]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada de um domínio constante de IgG<sub>1</sub> humana ou um domínio constante de IgG<sub>4</sub> humana. Em uma modalidade exemplar, o domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada é um domínio constante de IgG<sub>4</sub> humana. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga ao epítipo conformacional. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga a um epítipo combinatorial ou descontínuo.

[00191]Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende um domínio constante de imunoglobulina de cadeia pesada de um domínio constante de IgG<sub>4</sub> humana tendo uma substituição da cadeia principal de Ser para Pro que produz uma dobradiça tipo IgG<sub>1</sub> e permite formação de ligações dissulfeto inter-cadeia. Em uma modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreende adicionalmente um domínio constante de imunoglobulina de cadeia leve compreendendo um domínio constante de Ig lambda humana, ou um domínio constante de Ig kappa humana.

[00192]Em uma modalidade, o anticorpo é uma IgG tendo quatro cadeias de polipeptídeo que são duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Em modalidades exemplares, o anticorpo pode ser um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, ou um anticorpo quimérico. Em uma modalidade, o anticorpo

compreende um quadro de leitura tendo uma sequência de aminoácido de linhagem germinativa humana.

[00193] Em uma modalidade, a invenção provê um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compete para ligação com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, descrito aqui. Em uma modalidade, a invenção provê um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga ao mesmo epítopo como um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, descrito aqui.

[00194] Em outro aspecto da invenção, uma classe de anticorpos específicos de RGMc é provida, cada uma das quais não se liga a RGMa e/ou RGMb. Tais anticorpos que especificamente se ligam a RGMc (como os anticorpos descritos aqui) se ligam com um  $K_D$  de  $\leq 5$  nM (por exemplo,  $\leq 5$  nM,  $\leq 4$  nM,  $\leq 3$  nM,  $\leq 2$  nM,  $\leq 1$  nM,  $\leq 0,5$  nM,  $\leq 0,1$  nM, e  $\leq 0,05$  nM). Em uma modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 5$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 4$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 3$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 2$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 1$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 0,5$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 0,1$  nM. Em outra modalidade, o anticorpo se liga à RGMc humana com um  $K_D$  de  $\leq 0,05$  nM. A técnica é familiarizada com técnicas e ensaios apropriados que podem ser empregados para determinar atividades de ligação *in vitro*.

[00195] Em modalidades preferidas, meios apropriados de

medir afinidades de um anticorpo para seu(s) antígeno(s) incluem mas não são limitados à assim chamada técnica de interferometria de biocamada (BLI) e ensaios com base em ressonância de plasmon de superfície (SPR). O primeiro inclui sistemas Octet® e o último inclui sistemas Biacore. Em outra modalidade, meios apropriados de medir afinidades de um anticorpo para seu antígeno(s) incluem descoberta de mesoescala (MSD).

[00196]Aspectos da divulgação referem-se a anticorpos que competem ou competem cruzado com qualquer um dos anticorpos específicos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, como providos aqui, por exemplo, um anticorpo tendo uma ou mais sequências de CDR (1, 2, 3, 4, 5, ou 6 sequências de CDR), como descrito acima. Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que competem ou competem cruzado com um anticorpo tendo sequências de CDR de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, e SEQ ID NO:8, e/ou sequências de CDR de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, e SEQ ID NO:11. Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos que competem ou competem cruzado com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tendo uma sequência de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:12, e/ou uma sequência de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:13.

[00197]Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que competem ou competem cruzado com um anticorpo tendo sequências de CDR de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, e SEQ ID NO:16, e/ou sequências de CDR de cadeia leve

como especificadas em SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, e SEQ ID NO:19. Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos que competem ou competem cruzado com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tendo uma sequência de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:20, e/ou uma sequência de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:21.

[00198]Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que competem ou competem cruzado com um anticorpo tendo sequências de CDR de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, e SEQ ID NO:24 e/ou sequências de CDR de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, e SEQ ID NO:27. Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos que competem ou competem cruzado com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tendo uma sequência de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:28, e/ou uma sequência de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:29.

[00199]Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que competem ou competem cruzado com um anticorpo tendo sequências de CDR de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, e SEQ ID NO:32, e/ou sequências de CDR de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, e SEQ ID NO:35. Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos que competem ou competem cruzado com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tendo uma sequência de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:36, e/ou uma sequência de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO:37.

[00200]Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que competem ou competem cruzado com um anticorpo tendo sequências de CDR de cadeia pesada como especificadas em SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, e SEQ ID NO:40, e/ou sequências de CDR de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, e SEQ ID NO:43. Em uma modalidade, a invenção provê anticorpos que competem ou competem cruzado com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tendo uma sequência de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:44, e/ou uma sequência de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:45.

[00201]Em algumas modalidades, um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga em ou próximo do mesmo epítipo como qualquer um dos anticorpos aqui providos. Em algumas modalidades, um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, se liga a próximo de um epítipo, se ele se liga em 15 ou menos resíduos de aminoácido do epítipo. Em algumas modalidades, qualquer um do anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como provido aqui, se liga em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 resíduos de aminoácido de um epítipo que é ligado por qualquer um dos anticorpos providos aqui.

[00202]Em outra modalidade, é provido aqui um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compete ou compete cruzado para ligação a qualquer um dos antígenos providos aqui (por exemplo, uma RGMc humana) com uma constante de dissociação de equilíbrio,  $K_d$ , entre o anticorpo e a proteína de menos do que  $10^{-8}$  M. Em outras modalidades,

um anticorpo compete ou compete cruzado para ligação a RGMc com um  $K_D$  em uma faixa de  $10^{-11}$  M a  $10^{-8}$  M. Em algumas modalidades, é provido aqui um anticorpo específico de RGMc, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compete para ligação com um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, descrito aqui. Em algumas modalidades, é provido aqui um anticorpo específico de RGMc, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga ao mesmo epítopo como um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, descrito aqui.

[00203]Os anticorpos providos aqui podem ser caracterizados usando quaisquer métodos apropriados. Por exemplo, um método é para identificar o epítopo ao qual o antígeno se liga, ou “mapeamento de epítopo”. Existem muitos métodos apropriados para mapeamento e caracterização do local de epítopos em proteínas, incluindo resolver a estrutura do cristal de um complexo anticorpo-antígeno, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmento de gene, e ensaios à base de peptídeo sintético, como descritos, por exemplo, em Capítulo 11 de Harlow e Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. Em um exemplo adicional, o mapeamento de epítopo pode ser usado para determinar a sequência à qual um anticorpo se liga. O epítopo pode ser um epítopo linear, isto é, contido em um trecho único de aminoácidos, ou um epítopo conformacional formado pela interação tridimensional de aminoácidos que, necessariamente, não precisa estar contida em um trecho único (sequência linear de estrutura primária).

[00204]Peptídeos de comprimentos variados (por exemplo,

pelo menos 4-6 aminoácidos de comprimento) podem ser isolados ou sintetizados (por exemplo, de modo recombinante) e usados para ensaios de ligação com um anticorpo. Em outro exemplo, o epítipo ao qual o anticorpo se liga pode ser determinado em uma triagem sistemática usando peptídeos de sobreposição derivados das sequências de antígeno alvo e determinando a ligação pelo anticorpo. De acordo com os ensaios de expressão de fragmento de gene, o quadro de leitura aberta codificando o antígeno alvo é fragmentado ou aleatoriamente ou por construções genéticas específicas e a reatividade dos fragmentos expressos do antígeno com o anticorpo a ser testado é determinada. Os fragmentos de genes podem, por exemplo, ser produzidos por PCR e então transcritos e traduzidos em proteína *in vitro*, na presença de aminoácidos radioativos. A ligação do anticorpo para os fragmentos de antígeno marcados radioativamente é, então, determinada por imunoprecipitação e eletroforese em gel. Alguns epítopos também podem ser identificados usando grandes bibliotecas de sequências aleatórias de peptídeos exibidas na superfície das partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, uma biblioteca definida de fragmentos de peptídeo de sobreposição pode ser testada para ligação ao anticorpo de teste em um ensaio simples de ligação. Em um exemplo adicional, mutagênese de um domínio de ligação ao antígeno, experimentos de troca de domínio e mutagênese de varredura de alanina podem ser realizados para identificar os resíduos requeridos, suficientes e/ou necessários para a ligação ao epítipo. Por exemplo, experimentos de troca de domínio podem ser realizados usando um mutante de um antígeno alvo em que vários fragmentos de RGMc foram substituídos

(trocados) com sequências a partir de uma proteína intimamente relacionada, mas antígenicamente distinta, como outro membro da família de proteínas de RGMc (por exemplo, RGMa ou RGMb). Ao avaliar a ligação do anticorpo à RGMc mutante, a importância do fragmento de antígeno particular para ligação ao anticorpo pode ser avaliada.

[00205]Alternativamente, ensaios de competição podem ser realizados usando outros anticorpos conhecidos para se ligar ao mesmo antígeno para determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítopo como os outros anticorpos. Ensaios de competição são bem conhecidos dos versados na arte.

[00206]Adicionalmente, a interação de qualquer um dos anticorpos providos aqui com um ou mais resíduos em RGMc pode ser determinada por tecnologia de rotina. Por exemplo, uma estrutura cristalina pode ser determinada, e as distâncias entre os resíduos em RGMc, e um ou mais resíduos no anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno), podem ser determinadas consequentemente. Com base em tal distância, se um resíduo específico em RGMc interage com um ou mais resíduos no anticorpo pode ser determinado. Adicionalmente, métodos apropriados, como ensaios de competição e ensaios de mutagênese alvo, podem ser aplicados para determinar a ligação preferencial do anticorpo candidato.

[00207]Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, da presente invenção, que seletivamente se ligam a RGMc, incluem uma ou mais de regiões determinantes de complementariedade (CDRs) como descritas aqui. Em algumas modalidades, a invenção provê uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo, ou

fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que seletivamente se liga a uma RGMc, como descrito aqui. Em uma modalidade, as moléculas de ácido nucleico codificam uma ou mais das sequências de CDR, como descrito aqui.

***Regiões de ligação ao anticorpo específico de RGMc por H/DX-MS***

[00208]No contexto da presente divulgação, “região(ões) de ligação” de um antígeno provê uma base estrutural para a interação anticorpo-antígeno. Como usado aqui, a “região de ligação” refere-se às áreas de interface entre o anticorpo e o antígeno, de modo que, quando ligadas a RGMc em uma solução fisiológica, o anticorpo ou o fragmento protege a região de ligação da exposição ao solvente, como determinado por técnicas apropriadas, como espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (H/DX-MS).

[00209]A técnica está familiarizada com H/DX-MS, que é uma técnica amplamente usada para explorar a conformação de proteína ou interações proteína-proteína em solução. Este método se baseia na troca de hidrogênios na cadeia principal de proteína amida com deutério presente na solução. Por medida das taxas de troca de hidrogênio/deutério, pode-se obter informação sobre a dinâmica e conformação de proteína (revisto em: Wei *et al.* (2014) “Hydrogen/deutério exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications”. Drug Disco Today. 19(1): 95-102; incorporado por referência). A aplicação desta técnica é baseada na premissa de que, quando um complexo anticorpo-antígeno se forma, a interface entre os parceiros de ligação pode obstruir o solvente, reduzindo ou prevenindo, assim, a taxa de troca de H/D devido à

exclusão estereoquímica do solvente.

[00210] Usando esta técnica, regiões de ligação de RGMc por um anticorpo (ou fragmento como Fab) podem ser determinadas. Em algumas modalidades, uma porção em RGMc humana identificada como sendo importante em ligação com um anticorpo ou fragmento, que satisfaça os critérios de seleção aqui estabelecidos, inclui pelo menos uma porção do trecho de aminoácido YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46), que está presente dentro do domínio de alfa-1 hélice de RGMc. A mesma região pode ser identificada em RGMc de comprimento completo (SEQ ID NO: 1) como resíduos de aminoácido 46-53. Como mostrado em **Figura 8B**, esta região de ligação mostra diversidade de sequência entre os membros da família RGM. Consequentemente, sem ser limitado por uma teoria em particular, é contemplado que esta primeira região de ligação (região A) pode contribuir para a especificidade de RGMc em vez de RGMa e RGMb. Em algumas modalidades, um epítipo para o anticorpo (ou o fragmento de ligação ao antígeno) compreende pelo menos um resíduo de aminoácido da região de ligação, YVSSTLSL. Em algumas modalidades, um epítipo para o anticorpo (ou o fragmento de ligação ao antígeno) compreende dois ou mais resíduos de aminoácido da região de ligação.

[00211] Em algumas modalidades, uma porção em RGMc humana identificada como sendo importante em ligação de um anticorpo ou fragmento, que satisfaça os critérios de seleção aqui estabelecidos, inclui pelo menos uma porção do trecho de aminoácido FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47), que está presente dentro do domínio Alfa-3 hélice de RGMc. Como mostrado no modelo estrutural RGMc/BMP2 (**FIG 8C**), a Alfa-3 hélice está em proximidade estreita com BMP2. Consequentemente, sem ser

limitado por uma teoria particular, é contemplado que esta segunda região de ligação (região B) pode contribuir para o efeito funcional (por exemplo, inibidor) dos anticorpos competitivos de BMP descritos aqui. Em algumas modalidades, um epítopo para o anticorpo (ou o fragmento de ligação ao antígeno) compreende pelo menos um resíduo de aminoácido da região de ligação, FHSVHGIEDL. Em algumas modalidades, um epítopo para o anticorpo (ou o fragmento de ligação ao antígeno) compreende dois ou mais resíduos de aminoácido da região de ligação.

[00212]Várias observações apoiam a noção de que anticorpos derivados de SR-RC-AB3 (por exemplo, SR-RC-AB9) se ligam a pelo menos um aminoácido em região A e/ou região B de RGMc.

[00213]Em primeiro lugar, com base nos dados de HDX-MS de RGMc com SR-RC-AB9 Fab, regiões A e B são relativamente flexíveis e acessíveis ao solvente. Assim, elas podem ser disponíveis para ligação ao anticorpo. a captação relativa de deutério destas regiões na forma não ligada de RGMc mostrou uma captação relativa de deutério de ~50-60%. Regiões que são menos acessíveis têm comumente menos de 30% de captação relativa de deutério. Dada a alta dinâmica conformacional do domínio de N-termo de RGMc, é provável que o domínio possa atingir várias conformações, o que aumenta a probabilidade de ligação ao anticorpo (ver, por exemplo, **Figura 8C**, PDB ID 4UI1, RGMc ligado a BMP2).

[00214]Em segundo lugar, regiões A e B também têm vários pontos de contato para BMP2 (ver **FIGs 8D e 8E**) sugerindo que estas regiões são “pontos quentes” para a interação de ligação. Além disso, por uma revisão mais próxima de regiões

A e B, alguns resíduos podem servir como determinantes estruturais de especificidade de RGMc em vez de RGMa e RGMb (ver **Figura 8E**).

[00215]Em terceiro lugar, as CDRs (H1-H3) do anticorpo podem se estender na superfície de regiões A e B do domínio N-termo de RGMc (ver **Figura 8F**). Isso pode sugerir que pelo menos um (por exemplo, um ou mais) resíduos de cada região participa como epítipo para ligação ao anticorpo. Além disso, o formato da curva de captação de deutério (Figura 8A) mostrou troca H/D significativa em pontos de tempo, sugerindo que a interação anticorpo-antígeno é bastante estável dentro das regiões A e B.

[00216]E, finalmente, os dados de ligação para o N-termo de RGMc com RGMc SR-RC-AB9 fab também podem iluminar a ideia de que ambas as hélices (1 e 3) podem ser requeridas para a ligação ao anticorpo. Em particular, a alta afinidade de ligação de SR-RC-AB9 a RGMc sugere que uma superfície enterrada interfacial significativa da interação antígeno/anticorpo deve estar presente. Estas áreas de superfície altamente enterradas podem ser possíveis quando ambas as regiões A (hélice 1) e B (hélice 3) participam na ligação para o anticorpo

[00217]Consequentemente, em uma modalidade, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46). Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSAVHGIEDL (SEQ ID NO: 47). Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e/ou pelo menos um

resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47). Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47). Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc se liga a um epítipo descontínuo compreendendo pelo menos um aminoácido de cada uma dentre uma primeira e uma segunda região de ligação dentro da RGMc humana, em que a primeira região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 46; e/ou em que a segunda região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 47. Em uma modalidade particular, o anticorpo específico de RGMc se liga a um epítipo descontínuo compreendendo pelo menos um aminoácido de cada uma dentre uma primeira e uma segunda região de ligação dentro da RGMc humana, em que a primeira região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 46; e em que a segunda região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 47.

[00218]Em alguma modalidade, os anticorpos específicos de RGMc humana providos aqui se ligam a pelo menos uma porção da região de ligação (região A) tendo uma sequência de aminoácido YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46). Em outra modalidade, os anticorpos específicos de RGMc providos aqui se ligam a pelo menos uma porção da região de ligação (região B) tendo uma sequência de aminoácido FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47). Em outra modalidade, os anticorpos específicos de RGMc providos aqui se ligam a pelo menos uma porção da região de ligação tendo uma sequência de aminoácido YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46), e/ou

uma porção da região de ligação tendo uma sequência de aminoácido FHSAVHGIEDL (SEQ ID NO: 47). Em outra modalidade, os anticorpos específicos de RGMc providos aqui se ligam a pelo menos uma porção da região de ligação tendo uma sequência de aminoácido YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46), e uma porção da região de ligação tendo uma sequência de aminoácido FHSAVHGIEDL (SEQ ID NO: 47), ou uma porção da mesma. Em uma outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc se liga a um epítipo descontínuo compreendendo pelo menos uma porção de uma primeira e uma segunda região de ligação dentro da RGMc humana, em que a primeira região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 46; e/ou em que a segunda região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 47. Em uma modalidade particular, o anticorpo específico de RGMc se liga a um epítipo descontínuo compreendendo pelo menos uma porção de uma primeira e uma segunda região de ligação dentro da RGMc humana, em que a primeira região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 46; e em que a segunda região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 47.

[00219]Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a um epítipo descontínuo dentro da RGMc humana, em que a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e b) o anticorpo se liga a uma primeira região de ligação compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46). Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a um epítipo

descontínuo dentro da RGMc humana, em que a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e b) o anticorpo se liga a uma segunda região de ligação compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47). Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc da invenção se liga a um epítipo descontínuo dentro da RGMc humana, em que a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; b) o anticorpo se liga a uma primeira região de ligação compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46); e c) o anticorpo se liga a uma segunda região de ligação compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47).

### ***Ácidos nucleicos***

[00220]Em algumas modalidades, anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, e/ou composições da presente divulgação podem ser codificados por moléculas de ácido nucleico. Tais moléculas de ácido nucleico incluem, sem limitação, moléculas de DNA, moléculas de RNA, polinucleotídeos, oligonucleotídeos, moléculas de mRNA, vetores, plasmídeos e similares. Em algumas modalidades, a presente divulgação pode compreender células programadas ou geradas para expressar moléculas de ácido nucleico codificando compostos e/ou composições da presente divulgação.

[00221]Em algumas modalidades, a invenção provê uma molécula de ácido nucleico que codifica os anticorpos precedentes, ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção provê uma

molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo compreendendo CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, ou CDRL3, ou combinações das mesmas, como descrito aqui. A molécula de ácido nucleico pode, em algumas modalidades, codificar um polipeptídeo compreendendo CDRH1, CDRH2, e CDRH3, como descrito aqui. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico pode codificar um polipeptídeo compreendendo CDRL1, CDRL2, e CDRL3, como descrito aqui. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo que pode conter até 5, 4, 3, 2, ou 1 variações de resíduo de aminoácido, como comparado com a região CDR correspondente em qualquer uma das CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, ou CDRL3, ou combinações das mesmas, descritas aqui.

[00222]Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 12, e/ou um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 13. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 20, e/ou um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 21. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo

compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 28, e/ou um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 29. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 36, e/ou um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 37. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica um polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 44, e/ou um domínio variável de cadeia leve tendo pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade para a sequência de aminoácido especificada em SEQ ID NO: 45.

[00223]Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada especificada em SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO: 44, e uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve especificada em SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:37, ou SEQ ID NO:45. Em algumas

modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada especificada em SEQ ID NO: 12, e uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve especificada em SEQ ID NO: 13. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada especificada em SEQ ID NO: 20, e uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve especificada em SEQ ID NO: 21. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada especificada em SEQ ID NO: 28, e uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve especificada em SEQ ID NO: 29. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada especificada em SEQ ID NO: 36, e uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve especificada em SEQ ID NO: 37. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico codifica um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada especificada em SEQ ID NO: 44, e uma sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve especificada em SEQ ID NO: 45.

[00224]Em alguns casos, ácidos nucleicos da divulgação

incluem ácidos nucleicos otimizados no códon. Métodos de gerar ácidos nucleicos otimizados no códon são conhecidos na técnica e podem incluir, mas não são limitados aos descritos em Patentes US Nºs. 5.786.464 e 6.114.148, o conteúdo de cada uma sendo aqui incorporado por referência em sua totalidade.

***Produção de anticorpos que se ligam a RGMc***

[00225]A invenção engloba métodos de triagem, métodos de produção e processos de fabricação de anticorpos ou fragmentos dos mesmos, que se ligam a RGMc com alta afinidade e não se ligam a RGMa e/ou RGMb, e composições farmacêuticas e kits relacionados compreendendo as mesmas. A técnica está familiarizada com várias técnicas e métodos que podem ser usados para a obtenção de anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, da divulgação. Por exemplo, anticorpos podem ser produzidos usando métodos de DNA recombinante, técnicas de hibridoma, tecnologias de exibição de fago ou levedura, animais transgênicos (por exemplo, um XenoMouse®) ou alguma combinação dos mesmos.

***i. Imunização e hibridomas***

[00226]Em alguns métodos descritos aqui, o antígeno especificado (por exemplo, um peptídeo ou proteína RGMc, por exemplo, um peptídeo ou proteína RGMc solúvel) pode ser usado para imunizar um animal não humano ("hospedeiro"), por exemplo, um roedor, por exemplo, um camundongo, hamster ou rato. Em uma modalidade, o animal não humano é um camundongo. Em outra modalidade, o hospedeiro pode ser um camelídeo. Em uma modalidade adicional, o hospedeiro pode ser um tubarão.

[00227]Após imunização, que pode incluir etapas únicas ou múltiplas de exposições ao antígeno (por exemplo, injeções), esplenócitos são coletados do animal e as células

B associadas são fusionadas com células de mieloma imortalizadas para formar hibridomas para produção de anticorpos. Hibridomas podem ser gerados de acordo com métodos conhecidos (ver, por exemplo, Kohler e Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499). Hibridomas formados deste modo são então triados usando métodos padrão, como ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), tecnologia de interferometria de biocamada (BLI) (por exemplo, OCTET) e análise de ressonância de plasmon de superfície (por exemplo, BIACORE), para identificar um ou mais hibridomas que produzem um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno especificado. Qualquer forma do antígeno especificado pode ser usada como o imunogene, por exemplo, antígeno recombinante, formas de ocorrência natural, quaisquer variantes ou fragmentos dos mesmos, bem como o peptídeo antigênico do mesmo (por exemplo, qualquer um dos epítomos aqui descritos como um epítipo linear ou dentro de um andaime como um epítipo conformacional).

*ii. Triagem de biblioteca/bibliotecas*

[00228]Em algumas modalidades, o método ou processo de produção ou identificação de anticorpos inclui a etapa de triar as bibliotecas de expressão de proteína que expressa anticorpos ou fragmentos dos mesmos (por exemplo, scFv), por exemplo, bibliotecas de exibição de fagos, leveduras ou ribossomas. Por exemplo, uma biblioteca de anticorpos combinatoriais humanos ou fragmentos de scFv pode ser sintetizada em fagos ou levedura, a biblioteca é, então, triada com o antígeno de interesse ou um fragmento de ligação ao anticorpo do mesmo, e o fago ou levedura que se liga ao antígeno é isolado, a partir do qual se pode obter os

anticorpos ou fragmentos imunorreativos (Vaughan *et al.*, 1996, PMID: 9630891; Sheets *et al.*, 1998, PMID: 9600934; Boder *et al.*, 1997, PMID: 9181578; Pepper *et al.*, 2008, PMID: 18336206).

[00229]A exibição de fagos é adicionalmente descrita, por exemplo, em Ladner *et al.*, Patente US No. 5.223.409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; Clackson *et al.* (1991) Nature, 352: 624-628; Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; e WO 90/02809. A exibição de levedura é adicionalmente descrita, por exemplo, em US 7.700,302 e US 8.877.688. Em métodos particulares, biblioteca de exibição de levedura expressa anticorpos de comprimento completo.

[00230]Kits para gerar bibliotecas de exibição de fagos ou leveduras são comercialmente disponíveis. Também existem outros métodos e reagentes que podem ser usados na geração e triagem de bibliotecas de exibição de anticorpos (ver US 5.223.409; WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; e Barbas *et al.*, 1991, PMID: 1896445). Tais técnicas permitem vantajosamente a triagem de números elevados de anticorpos candidatos.

[00231]Não importando como são obtidas, células produzindo anticorpos (por exemplo, colônias de leveduras, hibridomas, etc.) podem ser selecionadas, clonadas e adicionalmente triadas para características desejáveis incluindo, por exemplo, crescimento robusto, alta produção de anticorpos e características/ propriedades de anticorpos desejáveis, como alta afinidade e ligação específica ao

antígeno de interesse. Preferivelmente, tais anticorpos mostram atividades de ligação *in vitro* tendo um valor  $K_D$  de  $\leq 5$  nM, preferivelmente  $\leq 1$  nM, mais preferivelmente  $\leq 0,1$  nM. Assim, um anticorpo para RGMc englobado pela invenção aqui tem um valor  $K_D$  de  $\leq 5$  nM, preferivelmente  $\leq 1$  nM, mais preferivelmente  $\leq 0,1$  nM, para RGMc recombinante.

[00232]Outros critérios de seleção podem incluir pontuações de reagente poli-específico (PSR) e/ou tempo de retenção em cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Uma pontuação PSR é um método de determinar o grau/extensão de ligação geral a proteínas (isto é, ligação não específica). Por exemplo, em alguns casos, um reagente poli-específico (PSR) é uma preparação de membrana solúvel a partir de 293 e/ou células CHO. Uma pontuação PSR baixa (0,1 - 0,33) ou zero (0 - 0,10) é o perfil mais desejável, enquanto uma pontuação média (0,33 - 0,66) ou alta (0,66 - 1,00) é menos desejável. Método de determinar pontuações PSR são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos anti-ligação dos mesmos, descritos aqui, apresentam uma pontuação PSR de  $<0,1$ . Em outras modalidades, os anticorpos ou fragmentos anti-ligação dos mesmos, descritos aqui, tem uma pontuação PSR de 0.

[00233]Por outro lado, um tempo de retenção HIC é um método de determinar a propensão de anticorpos para auto-interagir, o que prevê se eles irão permanecer solúveis/monodispersos em solução (também referida como propensão à agregação). Um elevado tempo de retenção HIC indica maior propensão à agregação. Esta propriedade pode ser devido a pedaços de resíduos hidrofóbicos /aminoácidos

no anticorpo. Alternativamente, a presença de modificações pós-translacionais, particularmente açúcares, pode levar os anticorpos a ter baixos tempos de retenção HIC. Consequentemente, em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, descritos aqui, têm um baixo tempo de retenção HIC (por exemplo,  $< 10,5$  minutos). Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, descritos aqui, têm um tempo de retenção HIC médio (por exemplo,  $\geq 10,5$  min e  $< 11,5$  min). Em algumas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, descritos aqui, têm um tempo de retenção HIC elevado (por exemplo,  $\geq 11,5$  min).

[00234]Métodos de seleção, clonagem e expansão de colônias e/ou hibridomas são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Uma vez que os anticorpos desejados são identificados, o material genético relevante pode ser isolado, manipulado e expresso usando técnicas comuns bioquímicas e de biologia molecular reconhecidas pela arte.

### *iii. Humanização*

[00235]Os anticorpos ou fragmentos da presente invenção são preferivelmente anticorpos completamente humanos ou anticorpos humanizados. Assim, qualquer que seja a fonte, será apreciado que o método pode compreender humanização de um ou mais anticorpos ou fragmentos dos mesmos, em que as sequências de anticorpo humanos podem ser fabricadas usando técnicas de engenharia molecular conhecidas na arte e introduzidas nos sistemas de expressão e células hospedeiras como descritos aqui. Tais anticorpos humanos não naturais produzidos de modo recombinante (e composições em questão)

são inteiramente compatíveis com os ensinamentos desta divulgação e são expressamente considerados como estando dentro do escopo da presente invenção. Em certos aspectos selecionados, os anticorpos RGMc da invenção compreenderão um anticorpo humano produzido recombinantemente.

*iv. Amadurecimento de afinidade e otimização*

[00236]Em algumas modalidades, anticorpos produzidos pelos métodos descritos acima podem ser de afinidade moderada (por exemplo,  $K_a$  de cerca de  $10^6$  a  $10^7$   $M^{-1}$  ou um  $K_D$  de cerca de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M). Consequentemente, anticorpos ou fragmentos dos mesmos podem ser submetidos a um processo de amadurecimento de afinidade como parte da otimização, se desejado. O termo “amadurecimento de afinidade” deve ter o significado facilmente compreendido pelo especialista na técnica. Brevemente, ele refere-se à modificação adicional da sequência de aminoácido de anticorpos candidatos ou fragmentos (com frequência referidos como “pais” ou “parental”) para alcançar perfis de ligação melhorados para o antígeno específico. Tipicamente, um anticorpo parental e uma contraparte amadurecida por afinidade (às vezes referida como “progênie” ou “prole”) retém o mesmo epítopo. Os ensaios de ligação *in vitro* apropriados podem ser realizados para triar para ligantes aperfeiçoados em etapa(s) apropriada(s) durante o processo de amadurecimento de afinidade. Opcionalmente, em algumas modalidades, ensaios funcionais (por exemplo, ensaios de potência à base de células, ensaios funcionais *in vitro*, etc.) também podem ser realizados para confirmar a funcionalidade desejada.

[00237]Amadurecimento de afinidade tipicamente envolve diversificação e/ou mutagênese de sequência, embora os meios

exatos de introdução ou geração de mutações ou alterações de sequência não sejam limitantes. Em algumas modalidades, mutagênese compreende introduzir uma ou mais mudanças (por exemplo, substituições ou deleções) em resíduos de aminoácido de uma ou mais CDRs. Consequentemente, em algumas modalidades, as sequências de VR ou CDR descritas aqui podem compreender até uma, duas, três ou quatro mudanças de aminoácido relativas a uma sequência de referência (por exemplo, a de uma sequência parental). Em algumas modalidades, as sequências de VR ou CDR descritas aqui podem compreender até uma, duas, três ou quatro substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, as sequências de VR ou CDR descritas aqui podem compreender até uma, duas, três ou quatro deleções. Adicionalmente ou alternativamente, o processo de mutagênese pode compreender a assim chamada oligo-caminhada de regiões variáveis ou CDRs.

[00238] Por exemplo, amadurecimento de afinidade de anticorpos pode ser obtido por vários métodos incluindo mutagênese aleatória (Gram H., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89, 3576–3580, e Hawkins R. E., *et al.* J. Mol. Biol. (1992) 226, 889–896), mutagênese aleatória de sequências de CDR, por exemplo, ‘CDR-caminhada’ (Yang W. P., *et al.*, J. Mol. Biol. (1995) 254, 392–403), mutagenese dirigida de resíduos (Ho M., *et al.*, J. Biol. Chem. (2005) 280, 607–617 e Ho M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103, 9637–9642), e abordagens que reproduzem a hipermutação somática (SHM) *in vitro* (Bowers P. M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2011) 108, 20455–20460).

[00239] Em uma modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese nas

regiões de cadeia pesada variável ou cadeia leve variável. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese em qualquer uma das CDRs de cadeia pesada variável ou CDRs de cadeia leve variável. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese na CDR3 de cadeia pesada variável. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese na CDR2 de cadeia pesada variável. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese na CDR1 de cadeia pesada variável. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese na CDR3 de cadeia leve variável. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese variável na CDR2 de cadeia leve. Em outra modalidade, anticorpos podem ser amadurecidos por afinidade por condução de mutagênese na CDR1 de cadeia leve variável.

[00240]Em algumas modalidades, amadurecimento de afinidade envolve a triagem de uma biblioteca de anticorpos compreendendo variantes de uma ou mais CDRs ("repertório"), que podem ser combinadas com pelo menos uma CDR de um anticorpo parental. Este processo é às vezes chamado de embaralhamento de CDR ou diversificação de CDR. Em algumas modalidades, uma CDR3 de cadeia pesada variável (por exemplo, CDR-H3) pode ser usada para triar uma biblioteca que contém repertórios de CDR1 e CDR2 de cadeia pesada variável (por exemplo, CDR-H1 e CDR-H2) de variantes (também chamada diversificação de CDR-H1/H2). Em algumas modalidades, CDR3 de cadeia leve variável (por exemplo, CDR-L3) pode ser usada

para triar uma biblioteca que contém repertórios de CDR1 e CDR2 de cadeia leve variável (por exemplo, CDR-L1 e CDR-L2) de variantes (também chamada diversificação de CDR-L1/L2).

[00241]Em algumas modalidades, amadurecimento de afinidade envolve a triagem de uma biblioteca de anticorpos compreendendo variantes de cadeia leve ("repertório"), que podem ser combinadas com uma cadeia pesada de um anticorpo parental (embaralhamento de cadeia leve). Por exemplo, em algumas modalidades, cadeias pesadas selecionadas são introduzidas em uma biblioteca de anticorpos compreendendo variantes de cadeia leve, assim produzindo uma nova biblioteca de anticorpos que pode ser triada para uma afinidade melhorada. Em algumas modalidades, repertórios de variantes de região variável naturalmente ocorrendo podem ser obtidos a partir de doadores não imunizados. Exemplos de embaralhamento de cadeia pesada ou leve são descritos nos seguintes documentos: Marks *et al.*, (1992) *Nature Biotech* 10: 779-78; Schier *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 28-43; Park *et al.*, (2000) *BBRC.* 275. 553-557; e Chames *et al.*, (2002) *J. Immunol* 1110-1118. Em algumas modalidades, a biblioteca de cadeia leve compreende variantes de cadeias leves lambda. Em algumas modalidades, a biblioteca de cadeia leve compreende variantes de cadeias leves kappa. Em algumas modalidades, a biblioteca de cadeia leve compreende ambas as variantes de cadeias leves lambda e kappa.

[00242]Deve ser apreciado que vários métodos para amadurecimento de afinidade podem ser combinados em qualquer ordem. Por exemplo, em uma modalidade, um anticorpo de seleção pode sofrer diversificação de CDR de cadeia pesada, seguido por mutagênese de CDR-H3. Em outra modalidade, um

anticorpo de seleção pode sofrer diversificação de CDR de cadeia pesada, seguido por mutagênese de CDR-H3, seguido por embaralhamento de cadeia leve. Em outra modalidade, um anticorpo de seleção pode sofrer embaralhamento de CDR de cadeia pesada, seguido por embaralhamento de cadeia leve, seguido por mutagênese de CDR-H3. Em uma modalidade preferida, um anticorpo de seleção pode sofrer embaralhamento de cadeia leve, seguido por diversificação de CDR-H1/H2, seguido por mutagênese de CDR-H3.

[00243]Em qualquer um dos métodos para amadurecimento de afinidade descrito acima, os novos anticorpos resultantes podem ser selecionados para ligação ao antígeno alvo (por exemplo, RGMc solúvel) usando técnicas conhecidas (por exemplo, FACS). Especificidade de ligação e afinidade usando FACS podem ser testadas por variadas concentração e/ou competição de antígeno para antígeno não marcado (frio). Afinidade de ligação pode ser adicionalmente avaliada usando outras técnicas conhecidas na arte, como ELISA, BLI (por exemplo, OCTET), e SPR (por exemplo, BIACORE).

[00244]Além do processo de amadurecimento de afinidade discutido acima, otimização adicional pode ser realizada para atingir os perfis de produto desejados. Assim, anticorpos podem ser ainda submetidos a uma etapa de otimização e selecionados com base em certas propriedades físico-químicas que são vantajosas. Para anticorpos terapêuticos (biológicos), critérios físico-químicos para possibilidade de desenvolvimento que podem ser avaliados incluem, mas não são limitados a: solubilidade, estabilidade, imunogenicidade, falta de autoassociação ou agregação, funcionalidade Fc, perfis de internalização,

sensibilidade ao pH, glicosilação e capacidade de fabricação, como viabilidade celular e/ou expressão gênica. Em algumas modalidades, o processo de otimização envolve mutagênese de uma ou mais sequências de aminoácidos dentro das regiões constantes.

[00245]Em um aspecto, a invenção provê um método para produção de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que especificamente se liga à RGMc humana, e não se liga à RGMA humana ou RGMb humana; em que o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, inibe RGMc, mas não inibe RGMA ou RGMb, o método compreendendo etapas de i) prover pelo menos um antígeno compreendendo RGMc humana (como RGMc humana solúvel), ii) selecionar um primeiro *pool* de anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que especificamente se liga à RGMc humana de modo a prover ligantes específicos de RGMc humana; iii) selecionar um segundo *pool* de anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem sinalização de BMP6 associada a RGMc, de modo a gerar inibidores específicos de atividade de RGMc/BMP6; iv) formular um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que está presente no primeiro *pool* de anticorpos e no segundo *pool* de anticorpos na composição farmacêutica, assim produzindo a composição compreendendo o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[00246]Em uma modalidade preferida, o método compreende adicionalmente a etapa de remover a partir do primeiro *pool* de anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, quaisquer anticorpos, ou fragmentos de ligação ao

antígeno dos mesmos, que se ligam a RGMa humana e/ou RGMb humana. Em uma modalidade, o método compreende adicionalmente a etapa de determinar ou confirmar a especificidade dos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, selecionados em etapas (ii) e/ou (iii). Em uma modalidade, o método compreende adicionalmente a etapa de selecionar anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que são reativos cruzados com antígenos de humanos ou roedores. Em uma modalidade, o método compreende adicionalmente a etapa de gerar um anticorpo completamente humano ou humanizado, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, do anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que está presente no primeiro *pool* de anticorpos e no segundo *pool* de anticorpos. Em uma modalidade, o método compreende adicionalmente a etapa de submeter o anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que está presente no primeiro *pool* de anticorpos e no segundo *pool* de anticorpos para amadurecimento de afinidade e/ou otimização, de modo a fornecer um anticorpo amadurecido por afinidade e/ou otimizado ou fragmento do mesmo.

[00247]Em algumas modalidades, o método para produção da composição farmacêutica adicionalmente inclui a etapa de testar um ou mais inibidor(es) candidato(s) de RGMc em pelo menos um modelo *in vivo* para avaliar ou confirmar eficácia para alcançar ou corrigir regulação de ferro. Em algumas modalidades, o método para produzir a composição farmacêutica adicionalmente inclui a etapa de testar um ou mais inibidor(es) candidato(s) de RGMc (por exemplo, tais anticorpos que mostram eficácia *in vivo*) em pelo menos um modelo *in vivo* para avaliar segurança/tolerabilidade em

doses em ou maiores do que as doses terapeuticamente eficazes. Os anticorpos terapêuticos apropriados devem mostrar toxicidades aceitáveis em uma dosagem que é suficientemente maior do que a dosagem eficaz em modelos animais. Em algumas modalidades, estudos de eficácia *in vivo* e ou segurança podem ser realizados com o uso de anticorpo ou anticorpos que compreendem uma porção ou porções não CDR que mais se aproximam da espécie particular usada no estudo pré-clínico (por exemplo, homólogo murino, etc.).

[00248]Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal é obtido a partir do animal não humano e, então, modificado, por exemplo, tornado quimérico, usando técnicas de DNA recombinante apropriadas. Várias abordagens para produzir anticorpos quiméricos foram descritas. Ver, por exemplo, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda *et al.*, Nature 314:452, 1985, Cabilly *et al.*, Patente US No. 4.816.567; Boss *et al.*, Patente US No. 4.816.397; Tanaguchi *et al.*, Publicação de Patente Europeia EP171496; Publicação de Patente Europeia 0173494, Patente do Reino Unido GB 2177096B.

[00249]Para técnicas de produção de anticorpos adicionais, ver, por exemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. A presente divulgação não é necessariamente limitada a qualquer fonte particular, método de produção, ou outras características de um anticorpo.

[00250]Alguns aspectos da presente divulgação referem-se a células hospedeiras transformadas com um polinucleotídeo ou vetor. As células hospedeiras podem ser células procarióticas ou eucarióticas. O polinucleotídeo ou

vetor que está presente na célula hospedeira pode ser ou integrado no genoma da célula hospedeira ou ele pode ser mantido extracromossomicamente. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica, como uma célula de bactéria, inseto, fungo, planta, animal ou humana. Em algumas modalidades, células de fungos são, por exemplo, as do gênero *Saccharomyces*, em particular as da espécie *S. cerevisiae*. O termo "procariótica" inclui todas as bactérias que podem ser transformadas ou transfectadas com umas moléculas de DNA ou de RNA para a expressão de um anticorpo ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes. Hospedeiros procarióticos podem incluir bactérias gram negativas, assim como gram positivas como, por exemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. O termo "eucarióticas" inclui células de levedura, plantas superiores, insetos e vertebrados, por exemplo, células de mamíferos, como células NSO e CHO. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, os anticorpos ou cadeias de imunoglobulina codificados pelos polinucleotídeo podem ser glicosilados ou pode ser não glicosilados. Anticorpos ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes também podem incluir um resíduo de aminoácido metionina inicial.

[00251]Em algumas modalidades, uma vez que um vetor foi incorporado em um hospedeiro apropriado, o hospedeiro pode ser mantido sob condições apropriadas para uma expressão de nível elevado das sequências de nucleotídeo, e, como desejado, a coleção e purificação das cadeias leves de imunoglobulina, cadeias pesadas, dímeros de cadeia leve/pesada ou anticorpos intactos, fragmentos de ligação ao

antígeno ou outras formas de imunoglobulina que se seguem; ver, Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979). Assim, polinucleotídeos ou vetores são introduzidas nas células que, por sua vez, produzem o anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno. Além disso, animais transgênicos, preferivelmente mamíferos, compreendendo as células hospedeiras acima mencionadas, podem ser usados para a produção em larga escala do anticorpo ou fragmentos do anticorpo.

[00252]As células hospedeiro transformadas podem ser cultivadas em fermentadores e cultivadas usando quaisquer técnicas apropriadas para alcançar crescimento celular ótimo. Uma vez expressos, os anticorpos completos, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, outras formas de imunoglobulina, ou fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão na arte, incluindo precipitação de sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e similares; ver, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). O anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno pode ser então isolado do meio de crescimento, lisados celulares, ou frações de membrana celular. O isolamento e purificação dos, por exemplo, anticorpos expressos de modo microbiano, ou fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser por qualquer um dos meios convencionais como, por exemplo, separações cromatográficas preparativas e separações imunológicas como as envolvendo o uso de anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos, por exemplo, contra a região constante do anticorpo.

[00253]Aspectos da divulgação referem-se a um hibridoma,

que provê uma fonte indefinidamente prolongada de anticorpos monoclonais. Como uma alternativa à obtenção de imunoglobulinas diretamente a partir da cultura de hibridomas, células de hibridoma imortalizadas podem ser usadas como uma fonte de *loci* rearranjados de cadeia pesada e cadeia leve para a subsequente expressão e/ou manipulação genética. Os genes de anticorpo rearranjados podem ser transcritos de modo reverso a partir de mRNAs apropriados para produzir cDNA. Em algumas modalidades, região constante de cadeia pesada pode ser trocada por uma de um diferente isotipo ou eliminada de todo. As regiões variáveis podem ser ligadas para codificar regiões Fv de cadeia única. As regiões Fv múltiplas podem ser ligadas para conferir estabilidade da ligação a mais do que um alvo ou combinações quiméricas de cadeia pesada e leve podem ser empregadas. Qualquer método apropriado pode ser usado para clonagem de regiões variáveis de anticorpo e geração de anticorpos recombinantes.

[00254]Em algumas modalidades, um ácido nucleico apropriado que codifica regiões variáveis de uma cadeia pesada e/ou leve é obtido e inserido em um vetor de expressão que pode ser transfectado em células hospedeiras recombinantes padrão. Várias destas células hospedeiras podem ser usadas. Em algumas modalidades, células hospedeiras de mamíferos podem ser vantajosas para um processamento e produção eficazes. As linhagens celulares de mamíferos típicas, utilizáveis para este fim, incluem células CHO, células 293, ou células NS0. A produção do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno pode ser realizada por cultivo de um hospedeiro recombinante modificado, sob condições de cultura apropriadas para o

crescimento das células hospedeiras e a expressão das sequências de codificação. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno podem ser recuperados por isolamento dos mesmos da cultura. Os sistemas de expressão podem ser projetados para incluir peptídeos de sinal, de modo que os anticorpos resultantes são secretados no meio; no entanto, produção intracelular também é possível.

[00255]A divulgação também inclui um polinucleotídeo codificando pelo menos a região variável de uma cadeia de imunoglobulina dos anticorpos descritos aqui. Em algumas modalidades, a região variável codificada pelo polinucleotídeo compreende pelo menos uma região determinante de complementariedade (CDR) de VH e/ou VL da região variável do anticorpo produzido por qualquer um dos hibridomas acima descritos.

[00256]Polinucleotídeos codificando anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno podem ser, por exemplo, DNA, cDNA, RNA ou DNA ou RNA produzidos sinteticamente ou uma molécula de ácido nucleico quimérica recombinantemente produzida compreendendo qualquer um destes polinucleotídeos, ou sozinhos ou em combinação. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo faz parte de um vetor. Tais vetores podem compreender adicionalmente genes como genes marcadores que permitem para  $\beta$  do vetor em célula hospedeira apropriada e sob condições apropriadas.

[00257]Em algumas modalidades, um polinucleotídeo é ligado operacionalmente às sequências de controle de expressão permitindo a expressão em células procarióticas ou eucarióticas. Expressão do polinucleotídeo compreende transcrição do polinucleotídeo em um mRNA traduzível.

Elementos reguladores assegurando a expressão em células eucarióticas, preferivelmente células de mamíferos, são bem conhecidos dos versados na técnica. Eles podem incluir sequências regulatórias que facilitam a iniciação de transcrição e, opcionalmente, sinais poli-A que facilitam a terminação de transcrição e estabilização do transcrito. Os elementos reguladores adicionais podem incluir intensificadores transcripcionais assim como tradicionais, e/ou regiões de promotor naturalmente associadas ou heterólogas. Os elementos reguladores possíveis, permitindo a expressão em células hospedeiras procarióticas, incluem, por exemplo, o promotor PL, Lac, Trp ou Tac em *E. coli*, e exemplos de elementos reguladores permitindo a expressão em células hospedeiras eucarióticas são o promotor AOX1 ou GAL1 em levedura ou o promotor CMV, promotor SV40, promotor RSV (vírus de sarcoma de Rous), intensificador de CMV, intensificador de SV40 ou um íntron globina em células de mamíferos e outros animais.

[00258] Além dos elementos que são responsáveis pela iniciação da transcrição, tais elementos reguladores também podem incluir sinais de terminação da transcrição, como o sítio SV40-poli-A ou o sítio tk-poli-A, a jusante do polinucleotídeo. Além disso, dependendo do sistema de expressão empregado, as sequências líder capazes de direcionar o polipeptídeo para um compartimento celular ou secretar o mesmo no meio podem ser adicionadas à sequência de codificação do polinucleotídeo e foram descritas previamente. A(s) sequência(s) líder é (são) montada(s) em fase apropriada com as sequências de tradução, iniciação e terminação e, preferivelmente, uma sequência líder capaz de

direcionar a secreção da proteína traduzida, ou uma porção da mesma, para, por exemplo, o meio extracelular. Opcionalmente, uma sequência polinucleotídica heteróloga pode ser usada que codifica uma proteína de fusão incluindo um peptídeo de identificação C- ou N-terminal conferindo características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada do produto recombinante expresso.

[00259]Em algumas modalidades, os polinucleotídeos que codificam pelo menos o domínio variável da cadeia leve e/ou pesada podem codificar os domínios variáveis de ambas as cadeias de imunoglobulina ou apenas uma. Da mesma forma, polinucleotídeos podem estar sob o controle do mesmo promotor ou podem ser controlados separadamente para expressão. Além disso, alguns aspectos se referem a vetores, particularmente plasmídeos, cosmídeos, vírus e bacteriófagos usados convencionalmente em engenharia genética que compreendem um polinucleotídeo codificando um domínio variável de uma cadeia de imunoglobulina de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno; opcionalmente em combinação com um polinucleotídeo que codifica o domínio variável da outra cadeia de imunoglobulina do anticorpo.

[00260]Em algumas modalidades, as sequências de controle de expressão são providas como sistemas de promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, mas sequências de controle para hospedeiros procarióticos. Os vetores de expressão derivados de vírus, como retrovírus, vírus vaccinia, vírus adenoassociados, vírus do herpes ou vírus do papiloma bovino, podem ser usados para a entrega dos polinucleotídeos ou vetor na população de células-alvo (por

exemplo, para modificar uma célula para expressar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno). Uma variedade de métodos apropriados pode ser usada para construir vetores virais recombinantes. Em algumas modalidades, polinucleotídeos e vetores podem ser reconstituídos em lipossomas para entrega às células alvo. Os vetores contendo os polinucleotídeos (por exemplo, o(s) domínio(s) variável(is) pesado(s) e/ou leves das sequências de codificação das cadeias de imunoglobulina e sequências de controle de expressão) podem ser transferidos para a célula hospedeira por métodos apropriados, que variam dependendo do tipo de hospedeiro celular.

[00261]Consequentemente, em um aspecto da invenção, método para produção de uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpo neutralizante) é provido, o método compreendendo as etapas de: i) identificar anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno quanto à capacidade para se ligar seletivamente a RGMc em vez de RGMa e RGMb; ii) identificar os anticorpos ou fragmento de ligação ao antígeno com base na etapa (i) quanto à capacidade de inibir/neutralizar a atividade RGMc *in vivo*; iii) selecionar um anticorpo inibidor/neutralizante com base nas etapas (i) e (ii) para formulação em uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, etapa (i) compreende uma seleção positiva e, opcionalmente, compreende adicionalmente uma seleção negativa. Em algumas modalidades, a etapa de identificação (i) compreende triagem de uma biblioteca. Em algumas modalidades, a biblioteca é uma biblioteca de fagos ou uma biblioteca de leveduras. Em algumas modalidades, a etapa de

identificação (ii) compreende medir um parâmetro de ferro selecionado do grupo consistindo em: ferro sérico, capacidade de ligação de ferro total (TIBC), capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC), e saturação de transferrina. Em algumas modalidades, etapa (ii) compreende medir expressão de hepcidina. Em algumas modalidades, a expressão de hepcidina são níveis de hepcidina no fígado e/ou níveis de hepcidina sérica. Em algumas modalidades, etapa (ii) compreende identificação de anticorpos neutralizantes ou fragmentos de ligação ao antígeno capazes de elevar níveis de ferro sérico e/ou suprimir expressão de hepcidina *in vivo*. Em algumas modalidades, etapa (i) compreende confirmação seletivamente para RGMc em vez de RGMa e RGMb.

[00262]Em outra modalidade, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno produzidos pelos métodos divulgados aqui se ligam a um epítipo que exclui um sítio de ligação a BMP6. Em algumas modalidades, o epítipo exclui um sítio de ligação a neogenina. Em algumas modalidades, o epítipo exclui ambos, um sítio de ligação a BMP6 e um sítio de ligação a neogenina. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno preferivelmente se liga a RGMc ligada à membrana em vez de RGMc solúvel. Em algumas modalidades, o anticorpo induz internalização de um complexo anticorpo-antígeno.

[00263]Em outra modalidade, a composição farmacêutica produzida pelo método divulgado aqui é formulada para administração intravenosa ou subcutânea.

### **Modificações**

[00264]Anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno

dos mesmos, da divulgação podem ser modificados com um marcador detectável ou porção detectável, incluindo, mas não se limitando a, uma enzima, grupo prostético, material fluorescente, material luminescente, material bioluminescente, material radioativo, metal emissor de pósitrons, íon metálico paramagnético não radioativo e marcador de afinidade para detecção e isolamento de RGMc. A substância ou porção detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente aos polipeptídeos da divulgação ou indiretamente, através de um intermediário (como, por exemplo, um ligante (por exemplo, um ligante clivável)) usando técnicas apropriadas. Exemplos não limitativos de enzimas apropriadas incluem peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, glicose oxidase ou acetilcolinesterase; exemplos não limitativos de complexos de grupos prostéticos apropriados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos não limitativos de materiais fluorescentes adequados incluem biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rhodamina, diclorotriazinlamina fluoresceína, cloreto de dansila, ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos não limitativos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de materiais radioativos apropriados incluem um íon metálico radioativo, por exemplo, alfa emissores ou outros radioisótopos como, por exemplo, iodo ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), enxofre ( $^{35}\text{S}$ ), trítio ( $^3\text{H}$ ), índio ( $^{115\text{m}}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ), e tecnécio ( $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), tálio ( $^{201}\text{Tl}$ ), gálio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), paládio ( $^{103}\text{Pd}$ ), molibdênio ( $^{99}\text{Mo}$ ), xênon ( $^{133}\text{Xe}$ ),

flúor (18F), 153Sm, Lu, 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 86R, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, e estanho (113Sn, 117Sn).

[00265]A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada ou diretamente aos anticorpos da divulgação que se ligam especificamente a RGMc, ou indiretamente, através de um intermediário (como, por exemplo, um ligante) usando técnicas apropriadas. Qualquer um dos anticorpos providos aqui que são conjugados a uma substância detectável podem ser usados para qualquer um dos ensaios diagnósticos, como os descritos aqui.

[00266]Além disso, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, da divulgação também podem ser modificados com um fármaco. O fármaco pode ser acoplado ou conjugado ou diretamente aos polipeptídeos da divulgação, ou indiretamente, através de um intermediário (como, por exemplo, um ligante (por exemplo, um ligante clivável), usando técnicas apropriadas.

### ***Composições farmacêuticas, formulações***

[00267]Adicionalmente são providas composições farmacêuticas/ formulações usadas como medicamentos apropriados para administração em indivíduos humanos e não humanos. Por exemplo, um ou mais antagonistas específicos de RGMc (por exemplo, anticorpos) englobados pela invenção podem ser formulados ou misturados com um carreador farmacêuticamente aceitável (excipiente), incluindo, por exemplo, um tampão, para formar uma composição farmacêutica. Tais formulações podem ser usadas para o tratamento de uma doença ou distúrbio que envolve sinalização de RGMc. Em

modalidades particularmente preferidas, as formulações podem ser usadas para o tratamento de anemia como descrito aqui.

[00268]As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas aos pacientes para aliviar uma indicação relacionada com RGMc. Por exemplo, uma indicação relacionada com RGMc pode ser uma anemia com restrição de ferro. Exemplos de anemias com restrição de ferro englobados pela presente invenção incluem, mas não são limitados a anemia de doença crônica (por exemplo, CKD), anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro (IRIDA), anemia induzida por câncer, e/ou anemia induzida por quimioterapia.

[00269]"Aceitável" significa que o carreador é compatível com o ingrediente ativo da composição (e preferivelmente, capaz de estabilizar o ingrediente ativo) e não deletério para o indivíduo a ser tratado. Exemplos de excipientes farmacêuticamente aceitáveis (carreadores), incluindo tampões, devem ser evidentes para o especialista na técnica e foram descritos anteriormente. Ver, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup>. Ed. (2000) Lippincott Williams e Wilkins, Ed. K. E. Hoover.

[00270]As composições farmacêuticas a serem usadas nos presentes métodos podem compreender carreadores, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis, na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup>. Ed. (2000) Lippincott Williams e Wilkins, Ed. K. E. Hoover).

[00271]Como usado aqui, "carreador farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores de absorção,

e similares que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o carreador é apropriado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, por exemplo, anticorpo, imunoconjugado, ou molécula biespecífica, pode ser revestido no material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[00272]Os compostos farmacêuticos descritos aqui podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parental e não transmite quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (ver, por exemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fósforo e similares, bem como os de ácidos orgânicos não tóxicos, como ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanóicos substituídos por fenila, ácidos hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino-terrosos, como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, como N, N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

[00273]Uma composição farmacêutica descrita aqui também

pode incluir um antioxidante farmacologicamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacologicamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e similares; e (3) agentes quelantes de metal, como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similares.

[00274]Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos apropriados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas aqui descritas incluem água, etanol, polióis (como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e similares) e misturas apropriadas dos mesmos, óleos vegetais, como azeite e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pelo uso de tensoativos.

[00275]Estas composições também podem conter adjuvantes, como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada por procedimentos de esterilização, supra, e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso,

absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que retardam absorção, como monoestearato de alumínio e gelatina.

[00276]Outros carreadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para receptores nas dosagens e concentrações usadas e podem compreender tampões, como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, como polivinilpirrolidona; aminoácidos, como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextranos; agentes quelantes como EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal, como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos, como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG). Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis são adicionalmente descritos aqui.

[00277]Em alguns exemplos, a composição farmacêutica descrita aqui compreende lipossomas contendo um anticorpo que especificamente se liga a RGMc, que podem ser preparados por qualquer método apropriado, como descrito em Epstein et

*al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); e Patente US Nos. 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomas com tempo de circulação intensificado são divulgados em Patente US No. 5.013.556. Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeos compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado.

[00278]Os anticorpos descritos aqui também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli- (metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Técnicas exemplares foram descritas previamente, ver, por exemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup>. Ed. Mack Publishing (2000).

[00279]Em outros exemplos, a composição farmacêutica descrita aqui pode ser formulada em formato de liberação sustentada. Os exemplos de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos conformados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo,

poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (Patente US No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinila não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico, como o LUPRON DEPOT™ microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarose e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[00280]As composições farmacêuticas a serem usadas para a administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis. Composições terapêuticas de anticorpos são geralmente colocadas em um recipiente tendo uma abertura de acesso estéril, por exemplo, uma bolsa ou frasco pequeno de solução intravenosa tendo uma rolha de retenção perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00281]As composições farmacêuticas descritas aqui podem estar em formas de dosagem unitária, como comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões ou supositórios, para administração oral, parenteral ou retal, ou administração por inalação ou insuflação.

[00282]Para preparar composições sólidas como comprimidos, o principal ingrediente ativo pode ser misturado com um carreador farmacêutico, por exemplo, ingredientes convencionais de comprimidos, como amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato dicálcico ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos, por exemplo, água, para formar uma composição de pré-formulação sólida, contendo uma mistura homogênea do composto da presente divulgação, ou um sal

farmaceuticamente aceitável não tóxico do mesmo. Quando fazendo referência às composições de pré-formulação como homogênea, significa que o ingrediente ativo é disperso uniformemente por toda a composição de modo que a composição possa ser facilmente subdividida em formas de dosagem unitária igualmente eficazes, como comprimidos, pílulas e cápsulas. Esta composição de pré-formulação sólida é então subdividida em formas de dosagem unitária do tipo descrito acima contendo de 0,1 mg a cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente divulgação. Os comprimidos ou pílulas da nova composição podem ser revestidos ou de outra forma compostos para fornecer uma forma oferecendo a vantagem de uma ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula pode compreender um componente de dosagem interna e um de dosagem externa, o último estando na forma de um envelope sobre o primeiro. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago e permitir que o componente interno passe intacto para o duodeno ou seja retardado na liberação. Uma variedade de materiais pode ser usada para tais camadas ou revestimentos entéricos, tais materiais incluindo uma série de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais como goma-laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

[00283]Os agentes tensoativos apropriados incluem, em particular, agentes não iônicos, como polioxietileno sorbitanos (por exemplo Tween™ 20, 40, 60, 80 ou 85) e outros sorbitanos (por exemplo Span™ 20, 40, 60, 80 ou 85). Composições com um agente tensoativo irão compreender convenientemente entre 0,05 e 5% agente tensoativo, e estar

entre 0,1 e 2,5%. Será apreciado que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, manitol ou outros veículos farmacêuticamente aceitáveis, se necessário.

[00284]Emulsões apropriadas podem ser preparadas usando emulsões de gordura comercialmente disponíveis Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ e Lipiphysan™. O ingrediente ativo pode ser dissolvido em uma composição de emulsão pré-misturada ou, alternativamente, pode ser dissolvido em um óleo (por exemplo, óleo de soja, óleo de cártamo, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de milho ou óleo de amêndoa) e uma emulsão formada após a mistura com um fosfolipídeo (por exemplo, fosfolipídeos de ovo, fosfolipídeos de soja ou lecitina de soja) e água. Será apreciado que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. Emulsões apropriadas conterão tipicamente até 20% de óleo, por exemplo, entre 5 e 20%.

[00285]As composições de emulsão podem ser as preparadas por mistura de um anticorpo da invenção com Intralipid™ ou os componentes dos mesmos (óleo de soja, fosfolipídeos de ovo, glicerol e água).

[00286]As composições farmacêuticas para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos farmacêuticamente aceitáveis, ou misturas dos mesmos, e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmacêuticamente aceitáveis apropriados, como especificado acima. Em algumas modalidades, as composições são administradas por via respiratória oral ou nasal para efeito local ou sistêmico.

[00287]Composições em solventes farmacêuticamente

aceitáveis e preferivelmente estéreis podem ser nebulizadas para uso de gases. Soluções nebulizadas podem ser respiradas diretamente do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser conectado a uma máscara facial, tenda ou máquina de respiração de pressão positiva intermitente. As composições em solução, suspensão ou pó podem ser administradas, preferivelmente por via oral ou nasal, a partir de dispositivos que entregam a formulação de modo apropriado.

***Uso terapêutico, métodos de tratamento, populações de pacientes***

[00288]Anormalidades em homeostase de ferro estão associadas a uma série de doenças que podem ser difíceis de diagnosticar e tratar. Tais distúrbios podem ser amplamente classificados em duas categorias, i) doenças de sobrecarga de ferro que incluem cirrose, cardiomiopatia, diabetes, etc; e ii) doenças com deficiência de ferro, incluindo anemia, anemia de doença crônica ("ACD"), etc. Anemia por deficiência de ferro (IDA) pode ser separada em duas formas principais: deficiência de ferro absoluta (AID) e deficiência de ferro funcional (FID). AID é definida por uma diminuição nos estoques de ferro do corpo, enquanto FID é um distúrbio em que os estoques de ferro do corpo total são normais ou aumentados, mas o suprimento de ferro para a medula óssea (por exemplo, mobilização de ferro) é desregulado ou inadequado.

[00289]Opções atuais de tratamento para doenças relacionadas ao ferro incluem suplementação de ferro externa, como ferro IV e terapia ESA (por exemplo, EPO e agentes similares). No entanto, essas terapias estão

associadas a efeitos colaterais indesejados. Por exemplo, foi demonstrado que pacientes com anemia crônica que recebem suplementos de ferro frequentes, como ferro IV, podem desenvolver sobrecarga de ferro. Excesso de ferro corporal pode ser altamente tóxico, o que pode afetar vários órgãos, levando a uma variedade de condições sérias, como doença do fígado, doença cardíaca, diabetes mellitus, anormalidades hormonais e sistema imune disfuncional. Similarmente, pacientes que recebem transfusão de sangue correm o risco de toxicidades associadas com sobrecarga de ferro. Por exemplo, em pacientes que recebem inúmeras transfusões, notadamente aqueles com talassemia maior, doença falciforme, síndrome mielodisplásica, anemia aplástica, anemia hemolítica e anemias sideroblásticas refratárias, que podem se tornar dependentes de transfusão, o excesso de ferro a partir dos eritrócitos transfundidos (aproximadamente 250 mg por transfusão) acumula-se gradualmente em vários tecidos, causando morbidade e mortalidade. Assim, o excesso de ferro induzido pelo tratamento no corpo pode causar reações adversas severas, incluindo toxicidades para os sistemas cardiovascular, gastrointestinal, imune, ósseo/cartilaginoso, reprodutivo e renal.

[00290] Como uma opção de tratamento adicional ou alternativa ao ferro IV, terapia com ESA (por exemplo, EPO) foi extensivamente administrada a uma ampla faixa de populações de pacientes, incluindo aqueles que sofrem de anemia relacionada ao câncer e induzida por quimioterapia em pacientes. Paradoxalmente, no entanto, estudos pré-clínicos e clínicos recentes indicam que ESAs podem acelerar potencialmente o crescimento do tumor e comprometer a

sobrevivência em pacientes com câncer.

[00291]Estabilizadores de HIF, em vez de eritropoietina adicionada exogenamente ou seus equivalentes, têm como objetivo estimular a capacidade do corpo de produzir eritropoietina endógena a fim de aumentar as células vermelhas do sangue através da cascata de sinalização de HIF. Foi hipotetizado que esta abordagem pode reduzir potencialmente fatores de risco associados com terapias ESA, como progressão do câncer aumentada e eventos cardíacos adversos importantes (por exemplo, derrame). Até o momento, no entanto, segurança melhorada ainda não foi claramente estabelecida.

[00292]Mais recentemente, anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a RGMa/RGMc mostraram aumentar ferro sérico em ratos e macacos cinomolgos pela regulação negativa da hepcidina (Böser et al. (2015) AAPS J. 2015 Jul; 17 (4): 930-938) Neste caso, os investigadores não observaram toxicidades óbvias em animais saudáveis que receberam os anticorpos RGMa/RGMc e normalização de parâmetros sanguíneos foi vista após um período de recuperação (~ 12 semanas) após um período de dosagem. No entanto, os riscos potenciais associados com inibição simultânea de RGMa, por exemplo, no sistema nervoso e efeitos imunomoduladores, não são discerníveis a partir do trabalho publicado.

[00293]Assim, terapias melhoradas para alcançar homeostase de ferro são necessárias que podem ser usadas de modo eficiente e seguro para tratar pacientes com doenças e distúrbios envolvendo desequilíbrio em homeostase de ferro, por exemplo, anemia.

[00294]Consequentemente, em um aspecto, a presente

invenção provê métodos melhorados para tratar e/ou prevenir condições associadas com perturbações em metabolismo de ferro, particularmente condições associadas com deficiência de ferro (por exemplo, anemia). Os inibidores seletivos de RGMc (por exemplo, anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que seletivamente se ligam e inibem RGMc, mas não RGMa/b) podem ser usados no tratamento de condições envolvendo deficiência funcional de ferro em indivíduos. O uso terapêutico compreende administração de um ou mais dos inibidores seletivos de RGMc, de acordo com a presente divulgação, em uma quantidade eficaz para tratar o indivíduo. O tratamento pode incluir alívio, atenuação, normalização ou manutenção de um ou mais sintomas/parâmetros de anemia, como níveis de ferro sérico, saturação de transferrina (TAST), teor de hemoglobina de reticulócitos (CHr), contagem de reticulócitos, contagem de células vermelhas do sangue, hemoglobina e hematócrito. O inibidor seletivo de RGMc pode proporcionar benefícios clínicos em termos do grau dos efeitos terapêuticos e/ou a cinética ou o momento de tais efeitos (como alívio mais rápido, efeitos mais prolongados, etc.). O inibidor seletivo de RGMc pode proporcionar benefícios clínicos em termos de reduzir toxicidades ou eventos adversos associados com terapia destinada a tratar anemia ou sublinhando a doença que causa a anemia.

[00295]Tais condições que podem ser tratadas e/ou evitadas usando os métodos da presente invenção incluem qualquer doença, distúrbio, ou síndrome associada com perturbações em metabolismo de ferro. Perturbações em metabolismo de ferro podem estar associadas com distúrbios

em um ou mais de captação de ferro, absorção de ferro, transporte de ferro, armazenamento de ferro, processamento de ferro, mobilização de ferro e utilização de ferro. Geralmente, perturbações em metabolismo de ferro resultam em sobrecarga de ferro ou deficiência de ferro.

[00296]Uma doença ou distúrbio de metabolismo ferro pode ser qualquer doença ou distúrbio em que homeostase de ferro é perturbada no indivíduo. Essa homeostase depende da regulação apropriada dos níveis de ferro no plasma adequados. O ferro circula no plasma ligado à transferrina, que é um veículo para a entrega do ferro às células. Transferrina plasmática é normalmente cerca de 30% saturada com ferro. Consequentemente, a saturação da transferrina deve ser mantida em níveis fisiológicos apropriados em resposta a uma variedade de sinais das vias envolvidas no consumo de ferro.

[00297]Doenças associadas com deficiência de ferro incluem, mas não são limitadas a, anemia de doença crônica, anemias deficiência de ferro, deficiência de ferro absoluta, deficiência funcional de ferro, e anemia microcítica. Esta disruptura de homeostase de ferro também pode resultar em anemia de doença crônica, em que um indivíduo com a doença exibe níveis elevados de hepcidina no sangue. O termo “anemia de doença crônica” (ACD) refere-se a qualquer anemia que se desenvolve como um resultado de, por exemplo, infecção prolongada, inflamação, distúrbios neoplásicos, etc. A anemia que se desenvolve é com frequência caracterizada por um ciclo de vida encurtado das células vermelhas do sangue e sequestro de ferro em macrófagos, que resulta em uma diminuição da quantidade de ferro disponível para produzir novas células vermelhas do sangue. Condições associadas com

anemia de doença crônica incluem, mas não são limitadas a, endocardite bacteriana crônica, osteomielite, febre reumática, colite ulcerativa, doença renal crônica e distúrbios neoplásicos.

[00298]Adicionalmente, indivíduos tendo uma doença associada com deficiência de ferro (por exemplo, ACD) podem ter, ou estar em risco de, uma doença ou distúrbio como fadiga, dor nas articulações, doença óssea ou articular (osteoartrite, osteoporose), artrite reumatoide, doença inflamatória do intestino, falta de ar, batimento cardíaco irregular, problemas hepáticos, diabetes, infertilidade, impotência, depressão, distúrbios de humor ou mentais, habilidades cognitivas fracas ou doenças neurodegenerativas, anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro, anemia de doença renal crônica, resistência a agentes estimulantes de eritropoiese, anemia aplásica, câncer, anemias hipoplásicas, hemoglobinúria paroxismal noturna, doença de von Willebrand, e hemofilia, telangiectasia hemorrágica hereditária.

[00299]Condições adicionais incluem doenças e distúrbios associados com infecção, inflamação, e neoplasmas, incluindo, por exemplo, infecções inflamatórias (por exemplo, abscesso pulmonar, tuberculose, etc), distúrbios inflamatórios não infecciosos (por exemplo, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, hepatite, doença de intestino inflamatório, etc.), e vários cânceres, tumores e malignidades (por exemplo, carcinoma, sarcoma, linfoma, etc.). Anemia por deficiência de ferro também pode resultar de tratamento com quimioterapia ou condições como gravidez, menstruação, primeira e segunda

infância, perda de sangue devido a lesões, etc.

[00300]Condições associadas com sobrecarga de ferro incluem ambas as doenças, síndromes ou distúrbios de sobrecarga de ferro, primárias e secundárias, incluindo, mas não limitadas a, hemocromatose hereditária, porfiria cutânea tardia, esferocitose hereditária, anemia hiperocrômica, anemia hiseritropoiética (CDAI), anemia diseritropoiética congênita (CDAII), displasia facio-genital (FGDY), síndrome de Aarskog, atranferrinemia, anemia sideroblástica (SA), anemia sidero-blástica responsiva à piridoxina, enzimopatias de células vermelhas, como glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PD) ou deficiência de piruvato quinase (PKD) e hemoglobinopatias, como talassemia e células falciformes. Alguns estudos têm sugerido uma associação entre distúrbios de metabolismo de ferro, como talassemia e hemocromatose, e vários estados doentes, como tipo II (não dependente de insulina) diabetes mellitus e aterosclerose (A.J. Matthews *et al.*, J. Surg. Res., 1997, 73: 3540; T. P. Tuomainen *et al.*, Diabetes Care, 1997, 20: 426-428).

[00301]Estudos também sugerem que o metabolismo de ferro desempenha um papel em vários outros estados doentes, incluindo doença cardiovascular (ver, por exemplo, P. Tuomainen *et al.*, Circulation, 1997, 97: 1461-1466; J. M. McCord, Circulation, 1991, 83: 1112-1114; J. L. Sullivan, J. Clin. Epidemiol., 1996, 49: 1345-1352).

[00302]O papel da hepcidina e de ferro em condições neurológicas foi proposto recentemente. Por exemplo, níveis de hepcidina aumentados foram mostrados em várias doenças neurológicas, incluindo, por exemplo, isquemia cerebral focal/reperfusão, hemorragia intracerebral, hemorragia

subaracnoide, derrame isquêmico agudo, derrame isquêmico, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ELA), e estresse crônico leve (Vela *et al.*, *J Transl Med* 2018;16:25).

[00303]Adicionalmente, metabolismo de ferro também pode desempenhar um papel chave na síndrome das perdas inquietas (Daubian-Nose P. *et al.*, *Sleep Sci* 2014;7(4):234-7 e Connor *et al.*, *Sleep Medicine* 2017;31:61-70). De fato, níveis aumentados de pro-hepcidina foram mostrados em tecido do cérebro de pacientes tendo síndrome das perdas inquietas, enquanto níveis diminuídos de pro-hepcidina foram observados em fluido cerebrospinal em doença de início precoce (Clardy *et al.*, *J Neurol Sci* 2006;247:173-9). Os depósitos de ferro no cérebro de pacientes RLS são baixos e relacionados com maior expressão de hepcidina no cérebro (Rizzo G. *et al.*, *Mov Disord* 2013;28:1886-90 e Clardy *et al.*, *J Neurol Sci* 2006;247:173-9). Níveis baixos de ferro no cérebro de pacientes RLS persistem mesmo na presença de HH (Haba-Rubio J. *et al.*, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1009-10). Além disso, expressão do receptor de transferrina na microvasculatura do cérebro de pacientes RLS é baixa, sugerindo baixo transporte de ferro através do BBB (Connor JR *et al.*, *Brain* 2011;134:959-68). De modo interessante, a síndrome das perdas inquietas foi sugerida como uma comorbidade em artrite reumatoide – ambas as doenças tendo ligações com a desregulação de ferro (John A. Gjevre e Regina M. Taylor Gjevre, *Autoimmune Diseases* 2013; Article ID 352782).

*i. Anemia com deficiência de ferro refratária ao ferro (IRIDA)*

[00304]A anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro é um transtorno autossômico recessivo causado por mutações em *Tmprss6*. *TMPRSS6* é um regulador negativo da hepcidina por clivagem FR RGMc ligado à membrana para produzir uma RGMc solúvel (s-RGMc) que atua como um receptor chamariz para BMP6. Sinalização reduzida de BMP6 leva a uma redução na expressão de Hepsidina. Assim, mutações que inibem a função de *TMPRSS6* promovem o acúmulo de RGMc ligada à membrana, o que leva a aumentos em expressão de Hepsidina e anemia por deficiência de ferro. Pacientes tendo IRIDA têm muito pouco ferro no sangue, o que faz com que as células vermelhas do sangue sejam pequenas (microcíticas) e de cor pálida (hipocrômicas). Outros fenótipos da doença podem incluir baixa saturação de transferrina, baixa ferritina sérica e baixos níveis de ferro sérico. Infelizmente, os altos níveis de hepcidina nesses pacientes os tornam refratários à administração oral de ferro.

[00305]Dado o mecanismo bem definido de IRIDA, resultados em um aumento na RGMc ligada à membrana (e níveis aumentados de hepcidina), agentes que se ligam especificamente à RGMc e reduzem os níveis de hepcidina, enquanto limitam os efeitos colaterais potenciais de direcionar proteínas RGM relacionadas (por exemplo, RGMa e RGMb), seriam benéficos.

[00306]Consequentemente, um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpos monoclonais divulgados aqui, derivados dos mesmos, anticorpos monoclonais que competem com os mesmos, e moléculas modificadas compreendendo um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) pode ser usado para o tratamento de IRIDA em um indivíduo (por exemplo,

paciente humano). Assim, em um aspecto, métodos para tratamento, prevenção ou melhora de sintomas associados com IRIDA são divulgados. Em uma modalidade, o método compreende a administração de um antagonista de RGMc para um paciente tendo IRIDA. Em outra modalidade, o método compreende a administração ao paciente tendo anticorpos para IRIDA que especificamente se ligam a RGMc e inibem sua função. Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc não se liga à (ou tem ligação reduzida) a RGMa e/ou RGMb. Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc é qualquer um dos anticorpos específicos de RGMc descritos aqui ou quaisquer derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc (seletivo de RGMc) compete (por exemplo, compete cruzado ou bloqueia cruzado) na ligação ao antígeno com um ou mais dos anticorpos de RGMc divulgados aqui.

*ii. Anemia de doença crônica (ACD)*

[00307]Anemia de doença crônica (por exemplo, anemia de inflamação crônica) é uma forma de anemia que é o resultado de infecção crônica, ativação imune crônica (por exemplo, inflamação), e/ou malignidade, etc, e é a forma mais comum de anemia em pacientes hospitalizados.

[00308]Tipicamente, ACD começa com uma resposta inflamatória, seguida por uma liberação de citocina inflamatória mediando a progressão da doença. As citocinas reduzem a produção de eritrócitos, facilitam a lise dos eritrócitos e estimulam macrófagos a armazenar e reter ferro como ferritina, o que acaba levando à disponibilidade insuficiente de ferro. Além disso, ocorre uma elevação maciça de interleucina-6 (IL-6) que estimula a expressão de hepcidina, que, por sua vez, induz degradação da

ferroportina, bloqueando, assim, a liberação de ferro dos macrófagos e enterócitos para a circulação. Além da resposta inflamatória, outros mecanismos também podem desempenhar um papel em ACD, por exemplo, eritropoiese reduzida ao diminuir a capacidade da medula óssea de responder à eritropoietina.

[00309]Como sugerido acima, existem muitas condições que podem causar inflamação que leva à anemia, incluindo: doenças autoimunes, por exemplo, artrite reumatoide (AR) ou lúpus, câncer, infecções crônicas, por exemplo, HIV/AIDS e tuberculose, doença renal crônica (CKD), condições inflamatórias gastrointestinais, como doença inflamatória do intestino (IBD), incluindo doença de Crohn e colite ulcerosa, diabetes e insuficiência cardíaca. Embora as anemias inflamatórias tenham geralmente um desenvolvimento lento, anemia de doença crítica pode se desenvolver rapidamente em pacientes que estão hospitalizados por infecções agudas graves, trauma ou outras condições que podem causar inflamação. Além disso, tratamentos com fármacos particulares, como quimioterapia, podem induzir rapidamente inflamação e anemia.

[00310]Outras doenças inflamatórias relacionadas com anemia podem incluir, por exemplo, síndrome de Castleman, doença renal crônica, diabetes, insuficiência cardíaca/doença cardíaca, anemia hemolítica autoimune idiopática, hipertensão arterial pulmonar idiopática, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, e artrite idiopática juvenil sistêmica. Doenças infecciosas causando anemia podem incluir, por exemplo, endocardite infecção por *Helicobacter pylori*, hepatite, vírus da imunodeficiência humana, e

malária. Doenças neurológicas associadas com anemia podem incluir, por exemplo, derrame isquêmico agudo, esclerose lateral amiotrófica, isquemia/reperfusão cerebral focal, hemorragia cerebral intracraniana e hemorragia subaracnoidea.

[00311]Consequentemente, um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpos monoclonais divulgados aqui, derivados dos mesmos, anticorpos monoclonais que competem com os mesmos e moléculas modificadas compreendendo um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos) podem ser usados para o tratamento de ACD (como uma ou mais de indicações de ACD incluídas aqui) em um indivíduo (por exemplo, paciente humano). Assim, em um aspecto, métodos para o tratamento de (por exemplo, prevenção ou melhora dos sintomas associados com) anemia de doença crônica (ACD) em pacientes humanos são divulgados. Em algumas modalidades, o método compreende a administração de um antagonista de RGMc a um paciente tendo ACD. Em algumas modalidades, o método compreende a administração, a um paciente tendo ACD, de anticorpos que especificamente se ligam a RGMc e inibem sua função. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc (seletivo de RGMc) não se liga à (ou tem ligação reduzida) a RGMa e/ou RGMb. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc é qualquer um dos anticorpos específicos de RGMc descritos aqui, ou quaisquer derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc (seletivo de RGMc) compete (por exemplo, compete cruzado ou bloqueia cruzado) com a ligação de antígeno com um ou mais dos anticorpos RGMc divulgados aqui.

### *iii. Anemia relacionada com câncer*

[00312]Aproximadamente 30-90% de pacientes com câncer são afetados por anemia (Knight *et al.*, *Am J Med* 2004;116 Suppl 7A:11S-26S). Por exemplo, aproximadamente 32% de pacientes com linfoma não de Hodgkin e 49% de pacientes com câncer ginecológico apresentam anemia no diagnóstico. (Moullet *et al.*, *Ann Oncol* 1998;8:1109-1115 e Ludwig *et al.*, *Eur J Cancer* 2004;40:2293-2306). A anemia pode ser causada por fatores relacionados ao próprio câncer (anemia induzida por câncer), ou em consequência da quimioterapia (anemia induzida por quimioterapia). Além disso, a radioterapia para o esqueleto tem sido mostrada como estando associada à toxicidade hematológica (Jefferies *et al.*, *Radiother Oncol* 1998;48:23-27). A patologia da anemia pode ser agrupada em três categorias: 1) produção diminuída de células vermelhas no sangue funcionais (RBCs); 2) destruição aumentada de RBCs; e 3) perda de sangue. No entanto, as causas da anemia podem ser multifatoriais, o que pode complicar a avaliação e o tratamento. A anemia pode ser causada por sangramento, hemólise, deficiências nutricionais, doença hereditária, insuficiência renal, disfunção hormonal e/ou uma combinação dos mesmos. Adicionalmente, as próprias células cancerosas podem levar a e/ou exacerbar a anemia por infiltração na medula óssea, produção de citocinas que levam ao sequestro de ferro (levando à produção reduzida de RBCs), diminuição da sobrevivência de RBCs e/ou alterações na coagulação.

[00313]Além disso, os pacientes com câncer também podem apresentar perda crônica de sangue no sítio do tumor devido a vasos sanguíneos ou danos a órgãos. Outros fatores que contribuem para a anemia em pacientes com câncer podem incluir perda de apetite, hemólise por anticorpos

imunomediados ou alterações na capacidade de coagulação.

[00314]Finalmente, a anemia também foi identificada como um fator prognóstico adverso em pacientes com câncer. Por exemplo, foi previsto que há um risco aumentado de 65% de morte e um custo médio anual de cuidados de saúde quase quatro vezes maior por paciente. Consequentemente, os objetivos do tratamento da anemia em pacientes com câncer são melhorar a qualidade de vida (QV) dos pacientes e reduzir a dependência de transfusões de sangue. As transfusões de sangue estão associadas ao risco potencial de transmissão de doenças infecciosas, reações à transfusão, lesão pulmonar e aloimunização. As transfusões também podem aumentar o risco de mortalidade e morbidade, incluindo derrame, infarto do miocárdio, insuficiência renal aguda e recorrência de câncer. (Annals of Oncology 21 (Supplement 7): vii167-vii172, 2010; PLOS ONE, DOI: 10,1371/journal.pone.0163817 (Sept 28, 2016); Annals of Oncology 23:1954-1962, 2012; e Annals of Clinical & Laboratory Science, vol.47, no.2, 2017).

[00315]O termo “câncer” como usado aqui refere-se à condição fisiológica em eucariotos multicelulares que é tipicamente caracterizada por proliferação celular desregulada e malignidade. O termo abrange amplamente malignidades sólidas e líquidas, incluindo tumores, cânceres do sangue (por exemplo, leucemias, linfomas e mielomas), bem como mielofibrose. Os cânceres que causam anemia podem incluir, por exemplo, leucemia aguda, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica, mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica, distúrbios mieloproliferativos (por exemplo, mielofibrose), linfoma não de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenström, bexiga, mama,

colorretal, gástrico, cabeça e pescoço, hepatocelular, pulmão, ovariano, próstata, pancreático, cérebro, hepatocelular, célula renal, testicular e tireoide (Maccio *et al.*, *Haematologica* 2015;100(1):124-132 e Vela *et al.*, *Exp & Mol Medicine* 2018; 50:e436).

[00316]Consequentemente, um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpos monoclonais divulgados aqui, derivados dos mesmos, anticorpos monoclonais que competem com os mesmos, e moléculas modificadas compreendendo um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) pode ser usado para tratamento anemia induzida por câncer ou associada ao câncer em um indivíduo (por exemplo, paciente humano). Assim, em um aspecto, métodos para o tratamento (por exemplo, prevenção ou melhora dos sintomas associados com) de anemia induzida por câncer. Em algumas modalidades, o método compreende a administração de um antagonista de RGMc a um paciente tendo anemia induzida por câncer. Em algumas modalidades, o câncer é leucemia aguda, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica, mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica, linfoma não-Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenström, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço, câncer hepatocelular, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pâncreas, câncer de cérebro, câncer de células renais, câncer de testículo, câncer de tireoide ou mielofibrose. Em algumas modalidades, o método compreende a administração ao paciente de anticorpos que especificamente se ligam a RGMc e inibem sua função. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc não se liga à (ou tem ligação reduzida) a RGMa e/ou

RGMb. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc é qualquer um dos anticorpos específicos de RGMc descritos aqui ou quaisquer derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc (seletivo de RGMc) compete (por exemplo, compete cruzado ou bloqueia cruzado) a ligação ao antígeno com um ou mais dos anticorpos de RGMc divulgados aqui.

*iv. Anemia induzida por tratamento*

[00317]Várias terapias administradas a pacientes estão associadas a efeitos colaterais indesejados que incluem anemia em pacientes tratados. Em alguns casos, os pacientes já podem sofrer de anemia, mas as terapias que recebem podem agravar ainda mais a condição.

[00318]Uma fração significativa de pacientes que recebem tratamento contra o câncer, como quimioterapia e radioterapia, experimenta anemia induzida por tratamento. Tipicamente, essas terapias têm como objetivo matar células cancerosas no corpo, mas também afetam células saudáveis, incluindo células de sangue (por exemplo, células hematopoiéticas e células-tronco hematopoiéticas), que resultam em anemia.

[00319]Foi demonstrado que agentes quimioterapêuticos induzem a anemia ao prejudicar diretamente hematopoiese na medula óssea. Adicionalmente, os efeitos de citotóxicos na função renal podem levar à anemia por meio de produção diminuída de eritropoietina. Em particular, os regimes à base de platina que são comumente usados em câncer de pulmão, ovário e cabeça e pescoço são conhecidos por induzir anemia por meio da medula óssea e toxicidades renais. (Groopman *et al.*, *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1616-1634). Além disso,

ciclos repetidos de quimioterapia também demonstraram aumentar a severidade de anemia nesses pacientes (Ludwig *et al.*, *Eur J Cancer* 2004;40:2293-2306).

[00320]De modo interessante, dados recentes sugerem que imunoterapias também podem causar (e/ou aumentar o risco de) anemia em pacientes com câncer. Por exemplo, um estudo recente identificou anemia hemolítica como uma complicação potencial de tratamento com nivolumab (um anticorpo anti-PD-1) (Palla *et al.*, *Case Rep Oncol* 2016;9:691-697). Outros casos de anemia hemolítica autoimune foram relatados após o uso de nivolumab, incluindo casos de anemia em pacientes recebendo ipilimumab (um anticorpo anti-CTLA-4) e pembrolizumab (um anticorpo anti-PD-1). Consequentemente, anemia que é causada, ou tem uma chance/risco aumentada de ocorrer, pela administração de agentes anticâncer/fármacos, incluindo imunoterapias, é englobada pelo termo “anemia induzida por quimioterapia”.

[00321]Finalmente, como notado acima, a presença de anemia foi implicada como um fator prognóstico para sobrevivência ao câncer (Caro JJ *et al.*, *Cancer* 2001 15;91(12):2214-21). Consequentemente, há uma forte razão para tratar a anemia em pacientes com câncer ou sofrendo quimioterapia, uma vez que pode resultar em melhores resultados. Além disso, em vista da ligação bem descrita entre câncer, quimioterapia e anemia, a National Comprehensive Cancer Network (NCCN) publica periodicamente diretrizes para o diagnóstico, avaliação e tratamento de anemia induzida por câncer e quimioterapia (ver, por exemplo, Rodgers *et al.*, *Cancer- and Chemotherapy Induced Anemia, JNCCN* 2012;10:628-53).

[00322]Consequentemente, um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpos monoclonais divulgados aqui, derivados dos mesmos, anticorpos monoclonais que competem com os mesmos, e moléculas modificadas compreendendo um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) podem ser usados para o tratamento de anemia induzida por tratamento (como anemia induzida por quimioterapia) em um indivíduo (por exemplo, paciente humano).

[00323]Assim, em um aspecto, métodos para tratamento, prevenção ou melhora de sintomas associados com anemia induzida por quimioterapia são providos. Em uma modalidade, o método compreende a administração de um antagonista de RGMc a um paciente tendo anemia induzida por quimioterapia.

[00324]Em outra modalidade, o método compreende a administração ao paciente de anticorpos que especificamente se ligam a RGMc e inibem sua função. Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc não se liga a (ou tem ligação reduzida) a RGMa e/ou RGMb. Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc é qualquer um dos anticorpos específicos de RGMc descritos aqui ou qualquer um dos derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc (seletivo de RGMc) compete (por exemplo, compete cruzado ou bloqueia cruzado) com a ligação antígeno com um ou mais dos anticorpos de RGMc divulgados aqui.

*v. Doença renal crônica (CKD)*

[00325]Anemia é uma complicação comum associada com doença renal crônica (CKD). De fato, aproximadamente 14% da população americana adulta teve CKD em 2007-2010 e anemia foi quase duas vezes mais prevalente nas pessoas com CKD, 15,4% em pacientes CKD versus 8,4% na população geral

(Stauffer e Fan, *PLoS One* 2014;9:e84943).

[00326]Enquanto os rins são conhecidos por atuarem como filtros do sangue, removendo resíduos e controlando o equilíbrio de fluidos e eletrólitos, um papel menos conhecido dos rins é o de produzir eritropoietina que estimula a produção célula vermelha do sangue. Assim, perturbações na função renal têm o potencial de produzir anemia. Além disso, a inflamação subjacente em pacientes com CKD também pode causar e/ou exacerbar a anemia nesses pacientes.

[00327]CKD é caracterizada pela perda gradual da função renal ao longo de um período de tempo (meses ou anos). Causas de CKD incluem, por exemplo, diabetes, hipertensão, glomerulonefrite e doença policística renal. No entanto, existem também casos idiopáticos (isto é, tendo causas desconhecidas), que são com frequência associadas com rins pequenos.

[00328]Tratamento para retardar ou interromper a progressão da CKD geralmente envolve o tratamento das doenças originais, no entanto, controlar a pressão arterial com inibidores de enzima de conversão de angiotensina ou antagonistas de receptor da angiotensina II é um tratamento comum, uma vez que foi descoberto que eles retardam a progressão da doença. No entanto, em casos severos (por exemplo, doença renal em estágio terminal), o paciente terá que se submeter a diálise ou mesmo transplante de rim. O paciente pode ser dependente de diálise (por exemplo, pacientes de hemodiálise crônica); o paciente não precisa ser dependente de diálise.

[00329]Pacientes CKD com anemia podem ser tratados com ferro oral ou intravenoso. Em alguns casos, tratamento pode

incluir injeções de uma forma geneticamente modificada de eritropoietina (EPO) e/ou transfusões de sangue. No entanto, a reposição de ferro nem sempre é eficaz; por exemplo, alguns pacientes são ou desenvolvem hiporresponsividade a terapias ESA. Além disso, ESAs, como o tratamento com EPO, têm sido associadas à possibilidade aumentada de eventos cardiovasculares, como ataque cardíaco e derrame. Assim, terapias aprimoradas que podem regular níveis de ferro com efeitos colaterais reduzidos são necessárias.

[00330]Consequentemente, um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpos monoclonais divulgados aqui, derivados dos mesmos, anticorpos monoclonais que competem com os mesmos, e moléculas modificadas compreendendo um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) pode ser usado para tratamento de anemia induzida por câncer ou associada com câncer em um indivíduo (por exemplo, paciente humano). Assim, em um aspecto, métodos para tratamento, prevenção ou melhora de sintomas associados com doença renal crônica (por exemplo, anemia) são providos. Em uma modalidade, o método compreende a administração de um antagonista de RGMc a um paciente tendo doença renal crônica. Em outra modalidade, o método compreende a administração ao paciente de anticorpos que especificamente se ligam a RGMc e inibem sua função. Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc não se liga a (ou tem ligação reduzida) RGMa e/ou RGMb. Em outra modalidade, o anticorpo específico de RGMc é qualquer um dos anticorpos específicos de RGMc descritos aqui ou quaisquer derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo específico de RGMc (seletivo de RGMc) compete (por exemplo, compete cruzado ou bloqueia cruzado) com a ligação ao

antígeno com um ou mais dos anticorpos de RGMc divulgados aqui.

[00331]Em qualquer uma das modalidades acima no tratamento de anemia, ou doença, caracterizadas por ou associadas com anemia, a terapia com inibidor de RGMc descrita aqui pode substituir parcialmente ou completamente a terapia padrão ou corrente ou terapias administradas aos pacientes, como ESAs, estabilizadores de HIF, suplementos de ferro (por exemplo, ferro IV) e transfusão de sangue. Em algumas modalidades, adição da terapia com inibidor de RGMc nos regimes terapêuticos, de acordo com a presente divulgação, permite aos pacientes receber uma reduzida dosagem ou frequência de administração de tal tratamento. Isso pode aliviar ou evitar efeitos colaterais indesejados ou outros riscos como sobrecarga de ferro nos pacientes. Em algumas modalidades, terapia com inibidor de RGMc pode substituir completamente outras terapias para tratar anemia em pacientes.

[00332]Em qualquer uma das modalidades acima no tratamento de anemia ou doença caracterizada por ou associada com anemia, a terapia com inibidor de RGMc aqui descrita pode ser usada em conjunto com outra terapia como uma terapia de adição ou adjuvante. Em certas modalidades, pacientes podem receber ou continuar a receber outra terapia para tratar anemia, mas em dose mais baixa ou em menor frequência. Em algumas modalidades, pacientes que são resistentes ou pouco responsivos a tal terapia podem se tornar mais responsivos (por exemplo, sensibilizados) à terapia quando tratados com o inibidor de RGMc em conjunto com a terapia.

***Seleção de indivíduos para tratamento com inibidores***

**RGMc**

[00333]Os métodos de tratamento descritos aqui, também podem incluir a etapa de medição de um ou mais fatores para determinar a presença e/ou severidade de uma doença (por exemplo, anemia) em um indivíduo. Geralmente, a definição de anemia é Hb <12 g/dl em mulheres e Hb <13 g/dl em homens. Enquanto a medição de hemoglobina é aceita como uma medição de anemia, a determinação do tipo (AID ou FID) e a causa da anemia podem envolver muitos testes diferentes. Por exemplo, existem vários testes bem conhecidos que podem ajudar a determinar o tipo e a severidade de anemia em um indivíduo, incluindo, mas não limitados a, medições de hemoglobina (Hb), ferritina sérica (SF), saturação de transferrina (TSAT), receptor de transferrina solúvel (sTfR), índice de ferritina ( $FI = sTfR / \log SF$ ), reticulócitos hipocrômicos (CHR) e proteína C-reativa (CRP). O volume corpuscular médio (MCV) ou concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) são também medições que podem correlacionar com o tipo de anemia.

[00334]Os critérios exatos para definir AID e FID são objeto de debate e variam dependendo do estudo, doença, sexo e autoridade. Por exemplo, sem ser limitado a uma teoria particular, FID pode ser definido como 1) saturação de transferrina sérica (TSAT) < 20 % e ferritina  $\geq 100$  ng/mL (Ludwig *et al.*, *Ann Oncol* 2013;24(7):1886-1892); 2) TSAT < 16% e ferritina > 100ng/ml (suave) ou ferritina sérica 30-100 ng/ml (moderada) (Bach *et al.*, *Clinical Interventions In Aging* 2014;9:1187-1196); 3) TSAT 20-50% e ferritina 30-800 ng/ml (Gilreath *et al.*, *Am J Hematol* 2014;89(2):203-212); 4) TSAT < 20% e ferritina > 30 ng/ml e > 100 ng/ml em pacientes com câncer (Ludwig *et al.*, *Wien Klin Wochenschr* 2015;127:907-

919) ou 5) TSAT < 20% e ferritina > 30 ng/ml (mulheres) ou > 40 ng/ml (homens) (Hedenus *et al.*, *Med Oncol* 2014;31(12):302). Em outros casos, a porcentagem de células vermelhas hipocrômicas pode ser usada para detectar FID (ver, por exemplo, Bovy *et al.*, *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(4):1156-1162 e Murphy *et al.*, *Ann Hematol* 2006;85(7):455-457). Em outros casos, FID é definido como quando um paciente tem Hb < 110 g/l, eritropoiese com restrição de ferro (% hipocromia > 5), inflamação sistêmica (CRP > 10), e, opcionalmente, índice de ferritina de 30-800 ng/ml (Neoh *et al.*, *Support Care Cancer* 2017;25:1209-1214).

[00335]Por outro lado, sem ser limitado por uma teoria particular, AID pode ser definido, por exemplo, como 1) TSAT < 20% e ferritina < 30 ng/ml (Ludwig *et al.*, *Ann Oncol* 2013;24(7):1886-1892); 2) TSAT < 20% e ferritina < 100 ng/ml em pacientes com câncer (Ludwig *et al.*, *Wien Klin Wochenschr* 2015;127:907-919); ou 3) TSAT < 20% e níveis de ferritina < 40 ug/L (Hashemi *et al.*, *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2017;11(3):192-198).

[00336]Os métodos de tratamento também podem envolver a medição de outros marcadores, como discutido aqui e conhecido na técnica. Por exemplo, medição de hepcidina (ver, por exemplo, US20150202224A1 e Kroot *et al.* *Clinical Chemistry* 2011;57(12):1650-1669), neogenina, fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF-15), lipocalina associada a neutrófilo gelatinase (NGAL), interleucina 6 (IL-6), e/ou BMP6.

[00337]Adicionalmente, a identificação de outros fatores de risco e/ou doenças pode auxiliar na determinação da presença e do tipo de anemia, por exemplo, o paciente pode ter uma infecção, câncer ou doença renal crônica. Testes

genéticos também podem ser úteis para determinar doenças relacionadas ao ferro particulares, por exemplo, anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro (IRIDA), talassemia, esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária, abetalipoproteinemia, anemia falciforme, anemia diseritropoiética congênita, hemocromatose hereditária (HH) e hemocromatose juvenil.

[00338]O indivíduo em qualquer um dos métodos descritos aqui, pode ser um indivíduo tendo, diagnosticado com, suspeito de ter, ou em risco de desenvolver anemia por deficiência de ferro ou uma doença, distúrbio ou condição associada à anemia por deficiência de ferro. O indivíduo pode ser um mamífero, que pode ser humano ou não humano. Em uma modalidade particular, o indivíduo é um indivíduo humano. Em outra modalidade, o indivíduo pode ser um indivíduo humano do sexo masculino. Em outra modalidade, o indivíduo pode ser um indivíduo humano do sexo feminino. Em outra modalidade, o indivíduo pode ser um paciente de cuidados intensivos, submetido a quimioterapia, se recuperando de cirurgia, ou pode estar em risco de, ou ter, uma infecção, câncer, uma doença ou distúrbio autoimune, doença crônica de órgão e/ou inflamação, e/ou rejeição crônica de um órgão após o transplante de órgão sólido. A infecção pode ser aguda ou crônica. A infecção pode ser viral, bacteriana, parasitária ou fúngica. O câncer pode ser qualquer câncer, como hematológico ou um tumor sólido. A doença autoimune pode ser qualquer doença autoimune, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e doenças do tecido conjuntivo, vasculite, sarcoidose e doença inflamatória intestinal. A doença crônica do órgão pode ser doença renal crônica, na

qual o indivíduo pode ou não estar sofrendo diálise. A infecção viral pode ser infecção por hepatite B ou C ou infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Qualquer uma das doenças e distúrbios pode ser uma causa subjacente de ACD. A cirurgia pode ser perioperatória ou pós-operatória. A cirurgia pode ser uma cirurgia oncológica.

[00339]Um indivíduo em necessidade para tratamento será tipicamente avaliado por um histórico e exame físico consistente com a doença ou condição em questão. O diagnóstico das várias condições tratáveis pelos métodos aqui descritos está dentro da habilidade do versado na técnica. Um antagonista de RGMc aqui descrito pode ser administrado a um indivíduo onde há uma necessidade clínica de entregar ferro ou em indivíduo com deficiência funcional de ferro, como aqueles em terapia com eritropoietina. Uma determinação da necessidade para tratamento com ferro parenteral ou i.v. está ao alcance de um versado na técnica. Por exemplo, a necessidade pode ser avaliada monitorando a situação de ferro do indivíduo. O diagnóstico de deficiência de ferro pode ser baseado em testes laboratoriais apropriados, como descrito acima, por exemplo, o nível de Hg de acordo com **Tabela 2** ou >2 g/dl abaixo da linha de base e/ou células vermelhas do sangue com um MCV de menos do que 80 femtolitros (fL). Outras medições para diagnosticar a deficiência de ferro podem ser baseadas em medições de ferritina sérica (SF), saturação de transferrina (TSAT), receptor de transferrina solúvel (sTfR), índice de ferritina ( $FI = sTfR / \log SF$ ), reticulócitos hipocrômicos (CHR), proteína C-reativa (CRP), volume corpuscular médio (MCV) e/ou concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC).

**Tabela 2.** Limiares WHO de hemoglobina como em 2011

| <b>Grupo de idade ou gênero</b>  | <b>Limiar Hb (g/dl)</b> |
|----------------------------------|-------------------------|
| Crianças (0.5-5,0 anos)          | 11,0                    |
| Crianças (5-12 anos)             | 11,5                    |
| Adolescentes (12-15 anos)        | 12,0                    |
| Mulheres, não grávidas (>15anos) | 12,0                    |
| Mulheres, grávidas               | 11,0                    |
| Homens (>15anos)                 | 13,0                    |

[00340]Um indivíduo em necessidade de tratamento também pode ser determinado através do diagnóstico de um indivíduo sofrendo de uma doença, distúrbio, ou condição que é associada com anemia com deficiência de ferro. Por exemplo, muitos pacientes com insuficiência renal crônica recebendo eritropoietina precisarão de um agente de ferro para manter os níveis-alvo de ferro. Como outro exemplo, a maioria dos pacientes em hemodiálise irá requerer a administração de um agente de ferro devido à perda de sangue associada à diálise e ao equilíbrio de ferro negativo resultante.

[00341]O monitoramento da frequência pode depender da doença, distúrbio ou condição que o indivíduo está sofrendo em risco de sofrer. Por exemplo, em um indivíduo iniciando terapia com eritropoietina, os índices de ferro são monitorados mensalmente. Como outro exemplo, em indivíduos que atingiram a faixa alvo de Hb ou estão recebendo terapia de ferro intravenoso, níveis de TSAT e ferritina podem ser monitorados a cada 3 meses

[00342]A situação de ferro de um indivíduo pode ser indicativa de uma deficiência absoluta de ferro (AID) ou uma deficiência funcional de ferro (FID), ambas as quais podem ser tratadas com as composições e métodos terapêuticos aqui descritos. Uma deficiência absoluta de ferro ocorre quando uma quantidade insuficiente de ferro está disponível para atender às necessidades do corpo. A insuficiência pode ser

devida à ingestão inadequada de ferro, biodisponibilidade reduzida do ferro da dieta, utilização aumentada de ferro ou perda crônica de sangue. A deficiência de ferro prolongada pode levar à anemia por deficiência de ferro - uma anemia microcítica e hipocrômica na qual há estoques inadequados de ferro. AID é geralmente indicada quando TSAT <20% e Ferritina <100 ng/mL.

[00343]TSAT é a razão de ferro sérico e capacidade de ligação a ferro total, multiplicada por 100. A partir da transferrina que é disponível para se ligar a ferro, o valor TSAT comunica ao médico clínico a quantidade de ferro sérico que está realmente ligada. Por exemplo, um valor de 15% significa que 15% de sítios de ligação a ferro de transferrina estão sendo ocupados por ferro.

[00344]FID pode ocorrer onde há uma falha na liberação de ferro com rapidez suficiente para acompanhar as demandas da medula óssea para eritropoiese, apesar dos estoques corporais totais de ferro apropriados. Nesses casos, os níveis de ferritina podem ser normais ou altos, mas o fornecimento de ferro para o eritron é limitado, como mostrado por uma baixa saturação de transferrina e um número aumentado de eritrócitos microcíticos, hipocrômicos. FID pode ser caracterizado pelas seguintes características: resposta inadequada de hemoglobina a eritropoietina; ferritina sérica pode ser normal ou elevada; saturação de transferrina (TSAT) comumente <20%; e/ou volume corpuscular médio reduzido (MCV; por exemplo, menor do que 80 fL) ou concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC; por exemplo, menor do que  $34 \pm 2$  g/dl) em casos severos. A deficiência de ferro funcional (isto é, estoques de ferro

são considerados adequados, mas indisponíveis para entrega de ferro) é geralmente indicada onde TSAT<20% e Ferritina >100 ng/mL.

[00345]Avaliação da necessidade para terapia com ferro pode ser de acordo com, por exemplo, o National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. Ver NKF-K/DOQI, Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease (2000); Am J Kidney Dis (2001) 37(suppl 1), S182-S238. O DOQI apresenta ótimas práticas clínicas para o tratamento de anemia em falha renal crônica. As diretrizes de DOQI especificam o tratamento com ferro intravenoso de doença renal baseado em hemoglobina, saturação de transferrina (TSAT), e níveis de ferritina.

[00346]Diretrizes adicionais para gerenciamento de ferro e determinação de AID versus FID em pacientes com câncer e/ou quimioterapia também foram sugeridas, por exemplo, ver Steinmetz *et al.*, *Ther Adv Hematol* 2012;3(3):177-91, Mikhael *et al.*, *Curr Oncol* 2007;14:209-217, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC; Bokemeyer *et al.*, *Eur J Cancer* 2007;43:258-270; e Aapro and Link, *Oncologist* 2008;13(Suppl. 3):33-36), American Society of Hematology (ASH) e a American Society of Clinical Oncology (ASCO) (ver, por exemplo, Rizzo *et al.*, *Blood* 2010;100:2303-2320), National Comprehensive Cancer Network (NCCN) diretrizes, versão 3.2018, Cancer- and Chemotherapy-induced Anemia, European Society for Medical Oncology (ESMO) (ver, por exemplo, Aapro *et al.*, *Annals of Oncology* 2018;0:1-15) e National institute for Health and Care Excellence (NICE) (ver, por exemplo, Technology appraisal guidance, publicado em 26 Nov 2014; nice.org.uk/guidance/ta323).

[00347]Um indivíduo em necessidade de tratamento pode ser determinado pelo nível de ferro alvo de um indivíduo. Por exemplo, o nível de hemoglobina alvo de um indivíduo pode ser selecionado como 11,0 g/dL a 12,0 g/dL (hematócrito de aproximadamente 33% a 36%). Para atingir a hemoglobina alvo com doses ótimas de eritropoietina, ferro suficiente pode ser fornecido para manter TSAT  $\geq$  20% e ferritina 100 ng/mL. O alcance dos níveis-alvo de hemoglobina com doses ótimas de eritropoietina está associado ao fornecimento de ferro suficiente para manter TSAT acima de 20%.

[00348]Terapia com ferro pode ser dada para manter hemoglobina alvo enquanto prevenindo a deficiência de ferro e também prevenindo a sobrecarga de ferro. O ajuste da dosagem de ferro para manter os níveis alvo de hemoglobina, hematócritos, e parâmetros laboratoriais de armazenamento de ferro está de acordo com o conhecimento do versado. Por exemplo, quando um indivíduo é anêmico ou em deficiência de ferro, um agente de ferro pode ser administrado quando um paciente tem uma ferritina <800 ng/mL, uma TSAT <50%, e/ou uma Hemoglobina <12 g/dL. Sobrecarga de ferro pode ser evitada retendo ferro para TSAT >50% e/ou ferritina >800 ng/mL.

[00349]Quando um indivíduo não é anêmico ou deficiente em ferro, mas ainda está em necessidade de um antagonista de RGMc, por exemplo, um indivíduo que sofre de síndrome das pernas inquietas, os níveis de hemoglobina e TSAT não são necessariamente relevantes, enquanto ferritina > 800 ainda pode fornecer um ponto de corte geral para administração.

### ***Administração***

[00350]Para praticar o método divulgado aqui, uma

quantidade eficaz da composição farmacêutica descrita acima pode ser administrada a um indivíduo (por exemplo, um humano) em necessidade do tratamento por uma via apropriada, tal como administração intravenosa, por exemplo, como um *bolus* ou por infusão contínua durante um período de tempo, por vias intramusculares, intraperitoneais, intracerebroespinais, subcutâneas, intra-articulares, intrassinoviais, intratecais, orais, inalações ou tópicas. Nebulizadores comercialmente disponíveis para formulações líquidas, incluindo nebulizadores a jato e nebulizadores ultrassônicos, são úteis para a administração. Formulações líquidas podem ser nebulizadas diretamente e pó liofilizado pode ser nebulizado após reconstituição. Alternativamente, anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que especificamente se ligam a um RGMc podem ser aerossolizados usando uma formulação de fluorocarbono e um inalador de dosagem medida, ou inalados como um pó liofilizado e moído.

[00351]O indivíduo a ser tratado pelos métodos descritos aqui pode ser um mamífero, mais preferivelmente um humano. Mamíferos incluem, mas não estão limitados a, animais de fazenda, animais de esporte, animais de estimação, primatas, cavalos, cães, gatos, camundongos e ratos. Um indivíduo humano que necessita de tratamento pode ser um paciente humano tendo, em risco de, ou suspeito de ter uma indicação relacionada a RGMc, tais como as mencionadas acima (por exemplo, anemia). Um indivíduo tendo uma indicação relacionada a RGMc pode ser identificado por exame médico de rotina, por exemplo, testes de laboratório, testes funcionais de órgãos, varreduras CT, ou ultrassons. Um

indivíduo suspeito de ter qualquer uma de tal indicação deve mostrar um ou mais sintomas da indicação. Um indivíduo em risco para a indicação pode ser um indivíduo tendo um ou mais dos fatores de risco para aquela indicação.

[00352] Como usado aqui, os termos "quantidade eficaz" e "dose eficaz" se referem a qualquer quantidade ou dose de um composto ou composição que é suficiente para atender a seu(s) propósito(s) planejado(s), isto é, uma resposta biológica ou medicinal (clínica) desejada em um tecido ou indivíduo em uma razão de benefício/risco aceitável. Por exemplo, em certas modalidades da presente invenção, a finalidade pretendida pode ser inibir a atividade de RGMc *in vivo*, para alcançar um resultado clinicamente significativo associado à inibição de RGMc. Por exemplo, efeitos clinicamente significativos podem incluir, ferro sérico aumentado, restauração ou normalização de hemoglobina ou contagens de células vermelhas, saturação de transferrina aumentada, etc. Em algumas modalidades, efeitos clinicamente significativos podem incluir toxidades reduzidas ou risco de danos, como risco cardiovascular (por exemplo, derrame ou insuficiência cardíaca) e câncer. Em algumas modalidades, efeitos clinicamente significativos podem incluir necessidades reduzidas de outras terapias, como suplementos de ferro. Em algumas modalidades, efeitos clinicamente significativos podem incluir qualidade de vida melhorada ou bem-estar geral percebido pelos pacientes. Em algumas modalidades, efeitos clinicamente significativos podem incluir alívio acelerado ou mais rápido de um ou mais parâmetros indicativos de anemia. Tal alívio pode ser alcançado por uma terapia adicional ou de combinação compreendendo o inibidor de RGMc

e outra terapia (por exemplo, ESAs, estabilizadores de HIF, etc.). Por exemplo, tipicamente, quando a terapia com EPO (por exemplo, monoterapia) é começada, ela leva 1-2 meses (por exemplo, 6-8 semanas) para o tratamento mostrar efeitos. Por esta razão, pacientes sofrendo de anemia severa podem necessitar adicionalmente ferro IV ou transfusão durante este tempo. Usado em conjunto com um inibidor seletivo de RGMc, como o descrito aqui, no entanto, o início de efeitos terapêuticos pode ser significativamente mais rápido (por exemplo, 1-4 semanas), o que pode reduzir a necessidade de ferro IV adicional ou transfusão.

[00353]Quantidades eficazes variam, como reconhecido pelos versados na técnica, dependendo da condição particular sendo tratada, da gravidade da condição, dos parâmetros individuais do paciente, incluindo idade, condição física, tamanho, gênero e peso, a duração do tratamento, a natureza da terapia simultânea (se alguma), a via específica de administração e fatores similares dentro do conhecimento e experiência do profissional de saúde. Estes fatores são bem conhecidos pelos versados na técnica e podem ser abordados apenas com experimentação de rotina. É geralmente preferido que uma dose máxima dos componentes individuais ou combinações dos mesmos seja usada, isto é, a dose segura mais alta de acordo com o parecer do julgamento médico. No entanto, será entendido pelos versados na técnica, que um paciente pode insistir em uma dose mais baixa ou dose tolerável por razões médicas, razões psicológicas ou virtualmente por qualquer outra razão.

[00354]Considerações empíricas, como meia-vida, contribuirão geralmente para a determinação da dosagem. Por

exemplo, anticorpos que são compatíveis com o sistema imune humano, como anticorpos humanizados ou anticorpos completamente humanos, podem ser usados para prolongar a meia-vida do anticorpo e evitar que o anticorpo seja atacado pelo sistema imune do hospedeiro. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada no decorrer da terapia, e é geralmente, mas não necessariamente, com base no tratamento e/ou supressão e/ou melhora e/ou retardo de uma indicação relacionada a RGMc. Alternativamente, formulações de liberação contínua sustentadas de um anticorpo que especificamente se liga a RGMc podem ser apropriadas. Várias formulações e dispositivos para alcançar liberação sustentada serão evidentes para os versados na técnica e estão dentro do escopo desta descrição.

[00355]Em um exemplo, dosagens para um anticorpo que especificamente se liga a RGMc, como descrito aqui, podem ser determinadas empiricamente em indivíduos que receberam uma ou mais administração(ões) do anticorpo. Os indivíduos recebem dosagens incrementais do antagonista de RGMc. Para avaliar a eficácia, um indicador da indicação relacionada a RGMc pode ser seguido. Por exemplo, métodos para medir anemia são bem conhecidos na técnica e são descritos adicionalmente aqui.

[00356]A presente invenção engloba o reconhecimento que agentes capazes de modular especificamente a sinalização de RGMc, em oposição a RGMA e/ou RGMb, podem fornecer perfis de segurança melhorados quando usados como um medicamento. Consequentemente, a invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se ligam e inibem a ativação de RGMc, mas não RGMA e/ou RGMb,

conferindo assim inibição específica de sinalização de RGMc *in vivo* enquanto minimizando efeitos colaterais indesejados de afetar a sinalização de RGMA e/ou RGMb.

[00357]Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, como descritos aqui, não são tóxicos quando administrados em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, como descritos aqui, exibem toxicidade diminuída quando administrados em um indivíduo em comparação com um anticorpo que especificamente se liga a ambos RGMc e RGMA. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, como descritos aqui, exibem toxicidade reduzida quando administrados em um indivíduo em comparação com um anticorpo que especificamente se liga a ambos RGMc e RGMb. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, como descritos aqui, exibem toxicidade reduzida quando administrados em um indivíduo em comparação com um anticorpo que especificamente se liga a RGMA, RGMb e RGMc.

[00358]Geralmente, para a administração de qualquer um dos anticorpos descritos aqui, uma dosagem candidata adicional pode ser cerca de 0,1-20 mg/kg, por exemplo, 1-20 mg/kg por administração, por exemplo, semanalmente, a cada 2 semanas, a cada 3 semanas, mensalmente, a cada três meses, etc. Por exemplo, pacientes podem receber uma injeção de cerca de 1-10 mg/kg por 1 semana, por 2 semanas, por 3 semanas, ou por 4 semanas, etc., em uma quantidade eficaz para tratar uma doença (por exemplo, câncer) em que a quantidade é bem tolerada (dentro de toxicidades aceitáveis ou eventos adversos).

[00359]Para a finalidade da presente divulgação, uma dosagem típica (por administração, como uma injeção e infusão) pode estar na faixa de cerca de qualquer uma de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg a 2 mg/kg a 3 mg/kg a 5 mg/kg a 10 mg/kg a 20 mg/kg a 30 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais longas, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que uma supressão desejada dos sintomas ocorra ou até que níveis terapêuticos suficientes sejam alcançados para aliviar uma indicação relacionada a RGMc, ou um sintoma da mesma.

[00360]Um regime de dosagem exemplar compreende administrar uma dose inicial, seguida por uma ou mais doses de manutenção, em que a última é tipicamente menor do que a primeira. Por exemplo, uma dose inicial pode estar entre cerca de 2 e 30 mg/kg, por exemplo, uma vez por semana ou duas vezes por semana. Depois disso, a(s) dose(s) de manutenção pode(m) seguir, por exemplo, entre cerca de 0,1 e 20 mg/kg (por exemplo, 1, 2, 3, 5, 10, 15 mg/kg), por exemplo, uma vez por semana, semana sim, semana não, uma vez por mês, etc. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de declínio farmacocinético que o profissional deseje alcançar. Experimentos farmacodinâmicos (PD) mostraram que existe um efeito PD sustentado (por exemplo, níveis aumentados de ferro sérico) por pelo menos 3 semanas após a administração de um anticorpo divulgado aqui (por exemplo, Ab8; 20 mg/kg) em um modelo animal pré-clínico (por exemplo, um modelo de rato). Sem desejar ser limitado por qualquer teoria particular, este efeito sustentado após a administração pode ser vantajoso

uma vez que o anticorpo pode ser administrado menos frequentemente enquanto mantendo uma concentração clinicamente eficaz de soro no indivíduo ao qual o anticorpo é administrado (por exemplo, um indivíduo humano). Em algumas modalidades, a frequência de dosagem é uma vez por semana, a cada 2 semanas, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas, a cada 5 semanas, a cada 6 semanas, a cada 7 semanas, a cada 8 semanas, a cada 9 semanas, ou a cada 10 semanas; ou uma vez por mês, a cada 2 meses, ou a cada 3 meses, ou mais longa. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais. O regime de dosagem (incluindo o anticorpo usado) pode variar ao longo do tempo.

[00361]Em algumas modalidades, para um paciente adulto de peso normal, doses na faixa de cerca de 0,3 a 5,00 mg/kg podem ser administradas. O regime de dosagem particular, por exemplo, dose, tempo e repetição, dependerá do indivíduo particular e do histórico médico do indivíduo, assim como das propriedades dos agentes individuais (como a meia-vida do agente, e outras considerações relevantes).

[00362]Para a finalidade da presente divulgação, a dosagem apropriada de um anticorpo que especificamente se liga a RGMc dependerá do anticorpo específico (ou composições do mesmo) empregado, o tipo e gravidade da indicação, se o anticorpo é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapia prévia, a história clínica do paciente e resposta ao antagonista, e critério do médico. Em algumas modalidades, um clínico irá administrar um anticorpo que especificamente se liga a RGMc, até que uma dosagem seja alcançada que atinja o resultado desejado. A administração de um anticorpo que especificamente se liga a RGMc pode ser

contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do receptor, se o propósito da administração é terapêutico ou profilático, e outros fatores conhecidos pelos profissionais qualificados. A administração de anticorpo que especificamente se liga a RGMc pode ser essencialmente contínua durante um período pré-selecionado de tempo ou pode ser em uma série de doses espaçadas, por exemplo, ou antes, durante, ou após o desenvolvimento de uma indicação relacionada a RGMc (por exemplo, anemia).

[00363]Como usado aqui, o termo "tratamento" refere-se à aplicação ou administração de uma composição incluindo um ou mais agentes ativos em um indivíduo, que tem uma indicação relacionada a RGMc, um sintoma da indicação, ou uma predisposição para a indicação, com o propósito de curar, cuidar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, melhorar, aperfeiçoar ou afetar a indicação, o sintoma da indicação, ou a predisposição para a indicação.

[00364]Aliviar uma indicação relacionada a RGMc com um anticorpo, que especificamente se liga a RGMc, inclui retardar o desenvolvimento ou progressão da indicação, ou reduzir a gravidade da indicação. Aliviar a indicação não requer necessariamente resultados curativos. Como usado aqui, "retardar" o desenvolvimento de uma indicação associada com uma indicação relacionada a RGMc significa adiar, impedir, atrasar, retardar, estabilizar, e/ou postergar a progressão da indicação. Este retardo pode ser de períodos variados de tempo dependendo da história da indicação e/ou indivíduos sendo tratados. Um método que "retarda" ou alivia o desenvolvimento de uma indicação, ou retarda o início da indicação, é um método que reduz a

probabilidade de desenvolvimento de um ou mais sintomas da indicação em um dado prazo de tempo e/ou reduz a extensão dos sintomas em um dado prazo de tempo, quando comparado a não usar o método. Tais comparações são tipicamente com base em estudos clínicos, usando um número suficiente de indivíduos para obter um resultado estatisticamente significativo.

### ***Terapias de combinação***

[00365]A divulgação engloba adicionalmente composições farmacêuticas e métodos relacionados usados como terapias de combinação para tratar indivíduos que podem se beneficiar da inibição de RGMc *in vivo*. Em qualquer uma destas modalidades, tais indivíduos podem receber terapias de combinação que incluem uma primeira composição compreendendo pelo menos um antagonista de RGMc, por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, descrito aqui, em conjunto com uma segunda composição compreendendo pelo menos um terapêutico adicional planejado para tratar a mesma ou uma doença em sobreposição ou condição clínica. A primeira e segunda composições podem atuar, ambas, no mesmo alvo celular, ou em alvos celulares discretos. Em algumas modalidades, a primeira e segunda composições podem tratar ou aliviar o mesmo ou conjunto sobreposto de sintomas ou aspectos de uma doença ou condição clínica. Em algumas modalidades, a primeira e segunda composições podem tratar ou aliviar um conjunto separado de sintomas ou aspectos de uma doença ou condição clínica. Para apresentar apenas um exemplo, a primeira composição pode tratar uma doença ou condição (por exemplo, CKD ou câncer), enquanto a segunda composição pode tratar inflamação, eritropoiese reduzida, ou

anemia associada com a mesma doença, etc. Tais terapias de combinação podem ser administradas em conjunto umas com as outras. A frase “em conjunto com”, no contexto de terapias de combinação, significa que efeitos terapêuticos de uma primeira terapia se sobrepõem temporariamente e/ou espacialmente com efeitos terapêuticos de uma segunda terapia no indivíduo recebendo a terapia de combinação. Assim, as terapias de combinação podem ser formuladas como uma única formulação para administração simultânea, ou como formulações separadas, para administração sequencial das terapias.

[00366]Em modalidades preferidas, terapias de combinação produzem efeitos sinérgicos no tratamento da doença. O termo “sinérgico” se refere a efeitos que são maiores do que efeitos aditivos (por exemplo, eficácia maior) de cada monoterapia no agregado.

[00367]Em algumas modalidades, terapias de combinação podem alcançar efeitos terapêuticos mais rápidos do que monoterapia.

[00368]Em algumas modalidades, terapias de combinação compreendendo uma composição farmacêutica descrita aqui produzem eficácia que é totalmente equivalente à produzida por outra terapia (como monoterapia de um segundo agente), mas estão associadas com menos efeitos adversos indesejados ou toxicidade menos grave associada com o segundo agente, em comparação com a monoterapia do segundo agente. Em algumas modalidades, tais terapias de combinação permitem dosagem menor do segundo agente, mas mantêm eficácia total. Tais terapias de combinação podem ser particularmente apropriadas para populações de pacientes onde um tratamento de longo

prazo é garantido e/ou envolvendo pacientes pediátricos.

[00369]Consequentemente, em um aspecto, a invenção provê composições farmacêuticas e métodos para uso em terapias de combinação para a redução de atividade de RGMc e o tratamento ou prevenção de doenças ou condições associadas com sinalização de RGMc, como descrito aqui. Consequentemente, os métodos ou as composições farmacêuticas compreendem adicionalmente uma segunda terapia. Em algumas modalidades, a segunda terapia pode ser útil no tratamento ou prevenção de doenças ou condições associadas com sinalização de RGMc. A segunda terapia pode diminuir ou tratar pelo menos um(vários) sintoma(s) associado(s) com a doença direcionada. A primeira e segunda terapias podem exercer seus efeitos biológicos por mecanismos similares ou não relacionados de ação; ou tanto uma como ambas da primeira e segunda terapias podem exercer seus efeitos biológicos por uma multiplicidade de mecanismos de ação. Por exemplo, no contexto de anemia, um inibidor de RGMc poderia ser administrado em combinação (por exemplo, sequencialmente ou simultaneamente) com uma segunda terapia que aumenta eritropoiese (por exemplo, uma terapia EPO, transfusão, etc.). Alternativamente, no contexto de anemia de doença crônica, um inibidor de RGMc poderia ser administrado em combinação (por exemplo, sequencialmente ou simultaneamente) com uma segunda terapia que trata a doença subjacente tal como câncer e distúrbios imunes (por exemplo, quimioterapia, terapia com radiação, imunoterapia, etc.).

[00370]Deve ser entendido que as composições farmacêuticas descritas aqui podem ter a primeira e segunda terapias no mesmo carreador farmaceuticamente aceitável ou

em um carreador farmacologicamente aceitável diferente para cada modalidade descrita. Deve ser entendido adicionalmente que a primeira e segunda terapias podem ser administradas simultaneamente ou sequencialmente nas modalidades descritas.

[00371]O um ou mais inibidores de RGMc (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) da invenção podem ser administrados em pacientes que receberam ou estão recebendo um ou mais de agentes terapêuticos adicionais. Um exemplo de agentes terapêuticos adicionais que podem ser usados com um anticorpo RGMc ou a invenção incluem, mas não estão limitados a, agentes estimuladores de eritropoietina (ESAs), estabilizadores de fator indutível de hipóxia (HIF), antagonistas de hepcidina, suplementos de ferro (por exemplo, oral ou intravenoso), anti-inflamatórios, e/ou fármacos anticâncer.

[00372]ESAs são medicamentos que estimulam a medula óssea a produzir células vermelhas e são úteis no tratamento de vários tipos de anemia em pacientes. No entanto, mesmo na presença de produção aumentada de células vermelhas, sem ferro suficiente a anemia irá persistir. Isto é porque as células vermelhas necessitam de hemoglobina para transportar oxigênio, e, ferro é crítico na síntese de hemoglobina. Assim, sem ferro suficiente, as células vermelhas recentemente produzidas terão falta de hemoglobina e serão hipocrômicas (falta de pigmento de hemoglobina vermelha) e microcíticas (menor do que o normal).

[00373]Consequentemente, em uma modalidade, os antagonistas de RGMc (por exemplo, anticorpos RGMc) descritos aqui podem ser administrados em pacientes que

tenham recebido ou estejam recebendo um ESA para tratar uma doença relacionada ao ferro. Exemplos de ESAs incluem, mas não estão limitados a, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta (por exemplo, Dynepo®), epoetina omega (por exemplo, Epomax®), darbepoetina alfa (Aranesp®), Epocept® (Lupin pharma), Nanokine® (Nanogen Pharmaceutical biotechnology), Epofit® (Intas pharma), Epogen® (fabricado por Amgen), Epogin® (Chugai Pharma), Eprex® (fabricado por Janssen-Cilag), Binocrit® (fabricado por Sandoz), PDpoetin® (fabricado por Pooyeshdarou Biopharmaceutical company), Procrit®, Bioyetin® (fabricado por Probiomed), NeoRecormon® (fabricado por Hoffmann-La Roche), Silapo®/Retacrit® (fabricado por Stada/Hospira), EPOTrust® (fabricado por Panacea Biotec Ltd), Erypro Safe™ (fabricado por Biocon Ltd.), Repoitin® (fabricado por Serum Institute of India Limited), Vintor® (fabricado por Emcure Pharmaceuticals), Erykine (fabricado por Intas Biopharmaceutica), Wepox® (fabricado por Wockhardt Biotech), Espogen™ (fabricado por LG life sciences), ReliPoietin™ (fabricado por Reliance Life Sciences), Shanpoietin™ (fabricado por Shantha Biotechnics Ltd), Zyrop® (fabricado por Cadila Healthcare Ltd.), EPIA0® (rHuEPO) (fabricado por Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co. LTD.), e China Cinnapoietin® (fabricado por CinnaGen biopharmaceutical Iran).

[00374]ESAs são geralmente eficazes, mas existem evidências de que um subconjunto de pacientes não responde ao tratamento mesmo com altas doses (Solak Y, *et al. Blood Purification*. 2016;42(2):160-7). Em adição, vários estudos mostraram que o uso de ESAs pode levar a taxas mais altas de eventos cerebrovasculares e cardiovasculares (CV) e

mortalidade (Biggar P. *et al.*, *Kidney Research and Clinical Practice* 2017 Sep;36(3):209-223). ESAs também podem estar associados com um risco aumentado de câncer em alguns pacientes e, em alguns casos, uma resposta mais pobre ao tratamento anticâncer. Consequentemente, sem ser limitado por uma teoria particular, o uso de um inibidor de RGMc em pacientes que receberam ou estão recendo um ESA, pode melhorar as taxas de resposta e reduz a dose necessária de ESA para ter um efeito, e, assim, reduzindo as ocorrências de toxicidades adversas.

[00375]Inibidores da enzima prolil hidroxilase (PH) do fator indutível por hipóxia (HIF) (também conhecidos como HIF-PHIs ou estabilizadores de HIF) são uma classe de agentes para o tratamento de anemia. Estes agentes trabalham para estabilizar o complexo HIF e estimulando a produção endógena de eritropoietina. Assim, inibidores de HIF-PH que aumentam a produção de eritropoietina podem ser complementados por um fármaco que aumenta os níveis de ferro sérico (por exemplo, um inibidor de RGMc). Consequentemente, em algumas modalidades, os inibidores de RGMc (por exemplo, anticorpos RGMc) descritos aqui podem ser administrados em pacientes que receberam ou estão recebendo um estabilizador de HIF ou inibidor da enzima prolil hidroxilase (PH) para tratar uma doença relacionada ao ferro. Exemplos de estabilizadores de HIF ou inibidores de HIF-PH incluem, mas não estão limitados a, Roxadustat (FG-4592), Vadadustat (AKB-6548), Daprodustat (GSK-1278863), Molidustat (BAY 85-3934), Desidustat (ZYN1), DMOG (metil éster de N-(2-Metoxi-2-oxoacetil)glicina), IOX2 (N-[[1,2-di-hidro-4-hidroxi-2-oxo-1-(fenilmetil)-3-quinolinil]carbonil] glicina), JNJ-42041935 (ácido 1-[6-

cloro-5-(trifluorometoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-pirazol-4-carboxílico), N-oxalilglicina (ácido 2-(carboximetilamino)-2-oxoacético), ácido 1,4-dihidrofenontrolin-4-ona-3-carboxílico, e adaptaquina (7-[(4-clorofenil)[(3-hidroxi-2-piridinil)amino]metil]-8-quinolinol).

[00376]Em algumas modalidades, os inibidores específicos de RGMc descritos aqui podem ser administrados em pacientes que receberam ou estão recebendo suplementos de ferro (por exemplo, ferro (i.v.) oral ou intravenoso). Exemplos de formulações de ferro i.v. incluem, mas não estão limitados a, ferro e dextrano, complexo de hidróxido férrico-dextrano, complexo de hidróxido férrico-sacarose, gluconato férrico, gluconato férrico de sódio, sacarose de ferro, sacarato de Fe, ferumoxitol, carboximaltose férrica, e isomaltosídeo de ferro. Exemplos de suplementos de ferro orais podem incluir, mas não estão limitados a, pirofosfato férrico, gluconato ferroso, sulfato ferroso, fumarato ferroso, carbonato ferroso e ferro carbonila.

[00377]Suplementos intravenosos e orais de ferro também são geralmente eficazes, mas estudos demonstraram uma variedade de toxidades ou eventos adversos associados com ferro. Exemplos de eventos adversos incluem citotoxicidade, insuficiência tubular, alterações na função de neutrófilos, promoção de aterosclerose, promoção de crescimento de tumor, e a geração de radicais livres (Cancado e Munoz, *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33(6):461-9). Consequentemente, sem ser limitado por uma teoria particular, o uso de um inibidor específico de RGMc com ferro i.v. ou oral, pode melhorar as taxas de resposta e reduz a dose necessária de ferro para

ter um efeito terapêutico, e, reduzindo assim a ocorrência e/ou graus de eventos adversos/toxidades.

[00378]É reconhecido que certos fármacos que são projetados para tratar várias condições de doença frequentemente induzem ou exacerbam anemia no paciente sendo tratado (por exemplo, anemia induzida por tratamento ou fármaco, como anemia induzida por quimioterapia e anemia induzida por terapia de radiação). Em algumas modalidades, o paciente é tratado com um fármaco mielossupressor que pode causar efeitos colaterais que incluem anemia. Tal paciente pode se beneficiar do inibidor de RGMc da presente divulgação usado em conjunto com a terapia mielossupressora. Exemplos de terapias mielossupressoras incluem, mas não são limitados a: peginterferon alfa-2a, interferon alfa-n3, peginterferon alfa-2b, aldesleucina, gemtuzumab ozogamicina, interferon alfacon-1, rituximabe, ibritumomabe tiuxetano, tositumomabe, alemtuzumabe, bevacizumabe, L-Fenilalanina, bortezomibe, cladribina, carmustina, amsacrina, clorambucila, raltitrexede, mitomicina, bexaroteno, vindesina, floxuridina, tioguanina, vinorelbina, dexrazoxano, sorafenibe, estreptozocina, gemcitabina, teniposídeo, epirrubicina, cloranfenicol, lenalidomida, altretamina, zidovudina, cisplatina, oxaliplatina, ciclofosfamida, fluorouracil, propiltiouracila, pentostatina, metotrexato, carbamazepina, vinblastina, linezolide, imatinibe, clofarabina, pemetrexede, daunorrubicina, irinotecano, metimazol, etoposido, dacarbazina, temozolomida, tacrolimo, sirolimo, mecloretamina, azacitidina, carboplatina, dactinomicina, citarabina, doxorubicina, hidroxiureia, busulfano,

topotecano, mercaptopurina, talidomida, melfalano, fludarabina, flucitosina, capecitabina, procarbazona, trióxido de arsênio, idarubicina, ifosfamida, mitoxantrona, lomustina, paclitaxel, docetaxel, dasatinibe, decitabina, nelarabina, everolimo, vorinostat, tiotepa, ixabepilona, nilotinibe, belinostat, trabectedina, trastuzumabe emtansina, tensirolimo, bosutinibe, bendamustina, cabazitaxel, eribulina, ruxolitiniba, carfilzomibe, tofacitinibe, ponatinibe, pomalidomida, obinutuzumabe, fosfato de tedizolida, blinatumomabe, ibrutinibe, palbociclibe, olaparibe, dinutuximabe e colchicina.

[00379] Em algumas modalidades, os inibidores específicos de RGMc descritos aqui podem ser administrados em pacientes que receberam ou estão recebendo terapia de câncer. Tal terapia de câncer pode incluir, mas não está limitada a, quimioterapia, radioterapia/terapia de radiação, fármacos de molécula pequena, ou anticorpos terapêuticos, por exemplo, vacinas contra câncer; terapias de células imunes engenheiradas; quimioterapias; terapias de radiação; um agonista de VEGF; um agonista de IGF1; um agonista de FXR; um inibidor de CCR2; um inibidor de CCR5; um inibidor duplo CCR2/CCR5; um inibidor de lisil oxidase-tipo-2; um inibidor de ASK1; um inibidor de Acetil-CoA Carboxilase (ACC); um inibidor de quinase p38; Pirfenidona; Nintedanibe; um inibidor de M-CSF (por exemplo, antagonista do receptor M-CSF e agentes neutralizantes de M-CSF); um inibidor de MAPK (por exemplo, inibidor de Erk), um agonista ou antagonista de ponto de verificação imune (por exemplo, anti-PD-1 e anti-PD-L1); um antagonista de IL-11; e antagonista de IL-6, e similares. Outros exemplos dos agentes

terapêuticos adicionais que podem ser usados como os inibidores específicos de RGMc incluem, mas não são limitados a, um inibidor de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), um inibidor de tirosina quinase, inibidor de Ser/Thr quinase, um inibidor de quinase duplo específico. Em algumas modalidades, tal agente pode ser um inibidor de PI3K, um inibidor de PKC, ou um inibidor de JAK. Em algumas modalidades, o inibidor de JAK pode ser um inibidor de JAK1 e/ou inibidor de JAK2, que pode ser usado no tratamento de distúrbios mieloproliferativos, como mielofibrose primária.

[00380] Também é entendido que outros tratamentos contra câncer, tal como radioterapia, podem causar anemia em pacientes com câncer. Consequentemente, em uma modalidade, os inibidores específicos de RGMc descritos aqui podem ser usados em conjunto com radioterapia.

[00381] Em algumas modalidades, o agente adicional a ser administrado como uma terapia de combinação ou usado em conjunto com o inibidor de RGMc, é ou compreende um inibidor de um membro da superfamília TGF $\beta$  de fatores de crescimento ou reguladores do mesmo. Em algumas modalidades, tal inibidor é ou compreende um inibidor de TGF $\beta$ , tal como anticorpos neutralizantes de TGF $\beta$ . Em algumas modalidades, o inibidor de TGF $\beta$  é um anticorpo que inibe TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$  2. Em algumas modalidades, o inibidor de TGF $\beta$  é um anticorpo que inibe TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$  3. Em algumas modalidades, o inibidor de TGF $\beta$  é um inibidor seletivo de isoforma de TGF $\beta$ 1, tais como inibidores de ativação de TGF $\beta$ 1. Em algumas modalidades, o inibidor de TGF $\beta$  é um inibidor seletivo de isoforma de TGF $\beta$ 3, tais como inibidores de ativação de TGF $\beta$ 3.

[00382] Em algumas modalidades, terapia de combinação a

ser usada no tratamento de câncer em um indivíduo compreende uma imunoterapia contra câncer (como um inibidor de ponto de verificação), um inibidor seletivo de  $\text{TGF}\beta 1$ , e o inibidor seletivo de RGMc divulgado aqui, em que, opcionalmente, o inibidor de ponto de verificação é um anticorpo PD-(L)1, e adicionalmente opcionalmente, o inibidor seletivo de  $\text{TGF}\beta 1$  é um inibidor de ativação seletiva de  $\text{TGF}\beta 1$ .

[00383]Em algumas modalidades, os inibidores específicos de RGMc descritos aqui podem ser usados em conjunto com outros compostos, fármacos, e/ou agentes usados para o tratamento de doenças associadas à inflamação ou doença renal crônica. tais compostos, fármacos, e/ou agentes podem incluir, mas não estão limitados a, fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs), inibidores de enzima de conversão de angiotensina (ACE), bloqueadores do receptor de angiotensina II (ARBs), diuréticos,  $\beta$ -bloqueadores, bloqueadores de canal de cálcio, agentes simpatolíticos centrais, suplemento de bicarbonato, insulina, suplementos de vitamina D, redutores de ácido úrico (por exemplo, alopurinol), inibidores de HMG-CaA redutase (estatinas), pirfenidona, inibidores da via de  $\text{TGF}\beta$ , anti-inflamatórios (incluindo fármacos anti-inflamatórios não esteroidais), moduladores de inflamação antioxidantes (por exemplo, metil bardoxolona), antagonistas de endotelina-1 (por exemplo, avosentana e atrasentana), inibidores do produto final de glicano avançado, aspirina, metformina, aminoguanidina, calcitriol, eritropoietinas, andrógenos, aglutinantes de fosfato, vitamina B12, e vitamina B6 e derivados dos mesmos (por exemplo, piridoxamina).

[00384]Em algumas modalidades, os inibidores específicos

de RGMc descritos aqui podem ser usados em conjunto com um fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) ou derivados do mesmo, por exemplo, Neupogen®, Granix®, ou Zarxio®. G-CSFs são glicoproteínas usadas para estimular a produção de células vermelhas (por exemplo, células brancas ou células-tronco hematopoiéticas) e promovem sua capacidade para atuar. Assim, G-CSFs são úteis para reduzir o risco de um paciente desenvolver infecções, anemia e problemas de sangramento após receber um tratamento mielossupressor (por exemplo, quimioterapia). No entanto, existem efeitos colaterais com relação ao uso de G-CSFs, que incluem: trombocitopenia, náusea, febre, dor nos ossos, lactato desidrogenase elevada, fosfatase alcalina elevada, petequial, dor nas costas, epistaxia (sangramentos nasais), tosse, e/ou dispneia (falta de ar). Consequentemente, é contemplado que inibidores específicos de RGMc, como descritos aqui, podem complementar os efeitos farmacológicos de G-CSFs (por exemplo, reduz anemia e promove a produção de células vermelhas) e/ou para reduzir a dosagem eficaz de G-CSF a fim de reduzir efeitos colaterais e aumentar a tolerabilidade. Consequentemente, em uma modalidade, os inibidores específicos de RGMc, como descritos aqui, podem ser administrados em pacientes que receberam ou estão recebendo uma terapia G-CSF. Em outra modalidade, os inibidores específicos de RGMc, como descritos aqui, reduzem a dosagem eficaz de G-CSF necessária para alcançar um efeito farmacológico favorável, por exemplo, promover produção de células vermelhas e/ou reduzir anemia. Em outra modalidade, os inibidores específicos de RGMc, como descritos aqui, complementam os efeitos de G-CSFs, por exemplo, aumentam

adicionalmente a produção de células vermelhas e/ou reduzem anemia.

[00385]Terapias de combinação contempladas aqui podem utilizar com vantagem dosagens menores dos agentes terapêuticos administrados, evitando assim possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias monoterapias. Em algumas modalidades, o uso de um inibidor específico de RGMc pode tornar aqueles que são fracamente responsivos ou não responsivos a uma terapia (por exemplo, padrão de cuidado) mais responsivos. Em algumas modalidades, o uso de um inibidor específico de RGMc descrito aqui pode permitir dosagem reduzida da terapia (por exemplo, padrão de cuidado) que ainda produz eficácia clínica equivalente em pacientes, mas em graus menores ou inferiores de toxicidades relacionadas ao fármaco ou eventos adversos.

#### ***Inibição de atividade de RGMc***

[00386]Métodos da presente divulgação incluem métodos de inibição da atividade de RGMc. Em um ou mais sistemas biológicos, tais métodos podem incluir contatar um ou mais sistemas biológicos com um anticorpo e/ou composição da divulgação. Inibidores (por exemplo, anticorpos) e/ou composições de acordo com tais métodos podem incluir, mas não são limitados a biomoléculas, incluindo, mas não limitados a proteínas recombinantes, complexos de proteína e/ou anticorpos, ou fragmentos de antígeno dos mesmos, como descritos aqui.

[00387]Os inibidores, por exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, descritos aqui que seletivamente se ligam a uma RGMc podem ser usados em uma ampla variedade de aplicações em que modulação da

atividade de RGMc é desejada. Em uma modalidade, a invenção provê um método de inibição de ativação de RGMc por exposição de um peptídeo ou proteína de RGMc a um inibidor, por exemplo, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que seletivamente se liga a RGMc. O método acima pode ser realizado *in vitro*, por exemplo, para inibir a atividade de RGMc em células cultivadas. O método acima também pode ser realizado *in vivo*, por exemplo, em um indivíduo em necessidade de inibição de RGMc, ou em um modelo animal em que o efeito de inibição de RGMc deve ser avaliado.

[00388]Qualquer inibidor, por exemplo, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, descrito aqui que seletivamente se liga a RGMc, e qualquer composição farmacêutica compreendendo tal inibidor ou anticorpo, é apropriado para uso nos métodos da invenção.

[00389]Consequentemente, em um aspecto da invenção, um método de inibir a atividade de RGMc por exposição de uma RGMc a um inibidor, por exemplo, um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que seletivamente se liga à RGMc, é provido. Em algumas modalidades, os inibidores (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) competem com BMP para ligação a RGMc. Em algumas modalidades, a BMP é BMP2 e/ou BMP6. Em algumas modalidades, a BMP é BMP6.

[00390]Em outra modalidade, os inibidores (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) inibem ligação de neogenina a RGMc. Em algumas modalidades, os inibidores (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) competem com neogenina para ligação a RGMc.

[00391]Em algumas modalidades, os inibidores (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) não inibem a ligação de neogenina à RGMc. Em algumas modalidades, os inibidores (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) não competem com neogenina para ligação a RGMc.

[00392]Em outra modalidade, os inibidores (por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos) inibem a ligação de RGMc a outros parceiros ou proteínas de ligação que complexam com RGMc. Por exemplo, outros parceiros de ligação que complexam com RGMc, BMP, e/ou neogenina incluem HFE, TFR2, ALK2, ALK3, BMPR2, ACVR2A e Tmprss6.

[00393]Em outra modalidade, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc também podem modular outros processos biológicos (por exemplo, efeitos a jusante). Por exemplo, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc reduzem a expressão de hepcidina em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc aumentam a expressão de ferroportina em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc aumentam a saturação de transferrina em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc, aumentam a eritropoiese em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc, diminuem a capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC)

em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc, diminuem a capacidade de ligação de ferro total (TIBC) em um indivíduo. Em algumas modalidades, os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que inibem atividade de RGMc, aumentam os níveis de ferritina sérica em um indivíduo.

[00394]Em algumas modalidades, os métodos descritos aqui podem ser realizados em um indivíduo. O indivíduo a tratado pelos métodos descritos aqui podem ser um mamífero, mais preferivelmente um humano. Mamíferos incluem, mas não são limitados a, animais de fazenda, animais de esporte, animais de estimação, primatas, cavalos, cães, gatos, camundongos e ratos. Um indivíduo humano que necessita de tratamento pode ser um paciente humano tendo, sob risco de, ou suspeita de ter uma indicação relacionada a RGMc, como as mencionadas acima (por exemplo, anemia).

[00395]Consequentemente, em uma modalidade, um método para aumentar os níveis de ferro sérico em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor específico de RGMc, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para regular para baixo hepcidina no indivíduo. Em algumas modalidades, um método para regular para baixo hepcidina em um indivíduo é provido, o método compreendendo a administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor específico de RGMc, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para regular para baixo hepcidina no indivíduo. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica

reduz os níveis de mRNA de hepcidina no fígado. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica reduz os níveis de proteína de hepcidina no fígado, níveis de proteína hepcidina sérica (circulantes), ou ambos.

[00396]Em uma modalidade, um método para aumentar os níveis de ferro sérico em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor específico de RGMc, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para aumentar expressão de ferroportina no indivíduo, como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, um método para aumentar a expressão de ferroportina em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor específico de RGMc, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para aumentar a expressão de ferroportina no indivíduo. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica aumenta os níveis da proteína de ferroportina nos enterócitos (intestinal). Em algumas modalidades, a composição farmacêutica aumenta níveis da proteína ferroportina nos hepatócitos (fígado). Em algumas modalidades, a composição farmacêutica aumenta níveis da proteína ferroportina nos macrófagos. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica aumenta níveis da proteína ferroportina nos adipócitos.

[00397]Em algumas modalidades, um método para aumentar saturação de transferrina em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um

inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para aumentar saturação de transferrina (TSAT) no indivíduo. Em algumas modalidades, o método aumenta a saturação de transferrina por  $\geq 1\%$ ,  $\geq 2\%$ ,  $\geq 3\%$ ,  $\geq 4\%$ ,  $\geq 5\%$ ,  $\geq 6\%$ ,  $\geq 7\%$ ,  $\geq 8\%$ ,  $\geq 9\%$ , ou  $\geq 10\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 1\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 2\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 3\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 4\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 5\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 6\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 7\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 8\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 9\%$ , como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina por  $\geq 10\%$ , como comparado com a linha de base.

[00398]Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 15\%$ ,  $\geq 16\%$ ,  $\geq 17\%$ ,  $\geq 18\%$ ,  $\geq 19\%$ ,  $\geq 20\%$ ,  $\geq 21\%$ ,  $\geq 22\%$ ,  $\geq 23\%$ ,  $\geq 24\%$ , ou  $\geq 25\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 15\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em

um indivíduo a um nível de  $\geq 16\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 17\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 18\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 19\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 20\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 21\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 22\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 23\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 24\%$ . Em algumas modalidades, o método aumenta saturação de transferrina em um indivíduo a um nível de  $\geq 25\%$ .

[00399]Em algumas modalidades, um método para aumentar eritropoiese em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para aumentar eritropoiese no indivíduo.

[00400]Em algumas modalidades, um método para aumentar os níveis de hemoglobina (Hb) em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para aumentar níveis de hemoglobina. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de Hb por  $\geq 1$ ,

$\geq 2$ , ou  $\geq 3$  g/dl, como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de Hb por  $\geq 1$  g/dl, como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de Hb por  $\geq 2$  g/dl, como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de Hb por  $\geq 3$  g/dl, como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta Hb em um indivíduo a um nível de  $\geq 10$  g/dl. Em algumas modalidades, o método aumenta Hb a um nível de  $\geq 11$  g/dl. Em algumas modalidades, o método aumenta Hb a um nível de  $\geq 12$  g/dl. Em algumas modalidades, o método aumenta Hb a um nível de  $\geq 13$  g/dl.

[00401]Em algumas modalidades, um método para diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) em um indivíduo é provido, o método compreendendo administração para o indivíduo de uma composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado no indivíduo. Uma faixa típica para UIBC em um indivíduo é 120 – 470 ug/dL (21 – 84 umol/L), embora os níveis possam variar entre as populações. Consequentemente, em algumas modalidades, o indivíduo tem um UIBC de  $\geq 400$ ,  $\geq 450$ ,  $\geq 500$ ,  $\geq 550$ ,  $\geq 600$ ,  $\geq 650$ ,  $\geq 700$ ,  $\geq 750$ , ou  $\geq 800$  ug/dL. Em outras modalidades, a quantidade eficaz de inibidor de RGMc específico diminui UIBC no indivíduo por  $\geq 50$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 150$ ,  $\geq 200$ ,  $\geq 250$ ,  $\geq 300$ ,  $\geq 350$ , ou  $\geq 450$  ug/dL.

[00402]Em algumas modalidades, um método para diminuir capacidade de ligação de ferro total (TIBC) em um indivíduo é provido, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica da invenção (por

exemplo, um inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para diminuir capacidade de ligação de ferro total no indivíduo. Uma faixa típica para TIBC é 255 – 450 ug/dL, embora os níveis variem entre as populações. Consequentemente, em algumas modalidades, o indivíduo tem um TIBC de  $\geq 400$ ,  $\geq 450$ ,  $\geq 500$ ,  $\geq 550$ ,  $\geq 600$ ,  $\geq 650$ ,  $\geq 700$ ,  $\geq 750$ , ou  $\geq 800$  ug/dL. Em outras modalidades, a quantidade eficaz de inibidor de RGMc específico diminui TIBC no indivíduo por  $\geq 50$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 150$ ,  $\geq 200$ ,  $\geq 250$ ,  $\geq 300$ ,  $\geq 350$ , ou  $\geq 450$  ug/dL.

[00403]Em algumas modalidades, um método para aumentar níveis de ferritina sérica em um indivíduo é provido, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica da invenção (por exemplo, inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para aumentar níveis de ferritina sérica no indivíduo. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 5$ ,  $\geq 10$ ,  $\geq 15$ ,  $\geq 20$ ,  $\geq 30$ ,  $\geq 40$ ,  $\geq 50$ ,  $\geq 60$ ,  $\geq 70$ ,  $\geq 80$ ,  $\geq 90$ , ou  $\geq 100$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 5$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 10$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 15$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 20$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 30$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta

níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 40$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 50$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 60$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 70$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 80$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 90$  ng/ml como comparado com a linha de base. Em algumas modalidades, o método aumenta níveis de ferritina sérica em um indivíduo por  $\geq 100$  ng/ml como comparado com a linha de base.

[00404]Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 30$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 40$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 50$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 60$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 70$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 80$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível de  $\geq 90$  ng/ml. Em algumas modalidades, o método aumenta ferritina sérica em um indivíduo a um nível

de  $\geq 100$  ng/ml.

[00405]Em algumas modalidades, um método para tratamento de uma doença associada com RGMc em um indivíduo é provido, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica da invenção (por exemplo, um inibidor de RGMc específico, como divulgado aqui) em uma quantidade eficaz para tratar a doença. Em algumas modalidades, a doença associada com RGMc é anemia. Em algumas modalidades, a anemia é anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro (IRIDA). Em algumas modalidades, a anemia é anemia de doença crônica (ACD). Em algumas modalidades, a ACD é uma anemia relacionada com câncer. Em outras modalidades, a ACD é anemia associada com doença renal crônica (CKD). Em algumas modalidades, a anemia é uma anemia induzida por quimioterapia.

***Kits para uso no alívio de doenças/distúrbios associados com uma indicação relacionada a RGMc***

[00406]A presente divulgação também provê kits para uso no alívio de doenças/distúrbios associados com uma indicação relacionada a RGMc (por exemplo, anemia). Tais kits podem incluir um ou mais recipientes compreendendo um inibidor, por exemplo, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que seletivamente se liga à RGMc.

[00407]Em algumas modalidades, o kit pode compreender instruções para uso de acordo com qualquer um dos métodos descritos aqui. As instruções incluídas podem compreender uma descrição da administração do inibidor, por exemplo, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga seletivamente a RGMc para tratar, atrasar o início ou aliviar uma doença alvo, como descrito aqui. O kit pode

compreender adicionalmente uma descrição da seleção de um indivíduo apropriado para tratamento com base na identificação de se esse indivíduo tem a doença alvo. Em ainda outras modalidades, as instruções compreendem uma descrição da administração de um anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, a um indivíduo em risco da doença alvo

[00408]As instruções relacionadas ao uso de inibidores, por exemplo, anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que se ligam seletivamente à RGMc, geralmente incluem informações quanto à dosagem, cronograma de dosagem e via de administração para o tratamento desejado. Os recipientes podem ser de doses unitárias, embalagens a granel (por exemplo, embalagens multidoses) ou doses subunitárias. Instruções dadas nos kits da divulgação são tipicamente instruções escritas em um rótulo ou folheto informativo (por exemplo, uma folha de papel incluída no kit), mas as instruções legíveis por máquina (por exemplo, instruções transportadas em um disco de armazenamento magnético ou óptico) também são aceitáveis. O rótulo ou folheto informativo pode indicar que a composição é usada para tratar, retardar o início e/ou aliviar uma doença ou distúrbio associado a uma indicação relacionada a  $TGF\beta$ . Instruções podem ser dadas para a prática de qualquer um dos métodos descritos aqui.

[00409]Os kits desta divulgação podem ser fornecidos em embalagens apropriadas. A embalagem apropriada inclui, mas não é limitada a, frascos, garrafas, potes, embalagens flexíveis (por exemplo, bolsas de Mylar seladas ou de plástico) e similares. Também são contempladas embalagens

para uso em combinação com um dispositivo específico, como um inalador, dispositivo de administração nasal (por exemplo, um atomizador) ou um dispositivo de infusão, como uma minibomba. Um kit pode ter uma abertura de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasquinho com uma rolha de retenção perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O recipiente também pode ter uma abertura de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um fraquinho com uma rolha de retenção perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um inibidor, por exemplo, anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga seletivamente a RGMc, como descrito aqui.

[00410]Kits podem, opcionalmente, fornecer componentes adicionais, como tampões e informações interpretativas. Normalmente, o kit compreende um recipiente e um rótulo ou folheto(s) na embalagem ou associado ao recipiente. Em algumas modalidades, a divulgação provê artigos de fabricação compreendendo o conteúdo dos kits descritos acima.

[00411]Embora várias modalidades da presente divulgação tenham sido descritas e ilustradas aqui, os versados na técnica prontamente imaginarão uma variedade de outros meios e/ou estruturas para realizar as funções e/ou obter os resultados e/ou uma ou mais das vantagens descritas aqui, e cada uma de tais variações e/ou modificações é considerada como estando dentro do escopo da presente divulgação. Mais geralmente, os versados na técnica apreciarão prontamente que todos os parâmetros, dimensões, materiais e

configurações aqui descritos se destinam a ser exemplares e que os parâmetros, dimensões, materiais e/ou configurações reais dependerão da aplicação ou aplicações específicas em que os ensinamentos da presente divulgação serão usados. Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar, usando apenas experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da divulgação aqui descrita. Deve, portanto, ser entendido que as modalidades anteriores são apresentadas a título de exemplo apenas e que, dentro do escopo das reivindicações anexas e equivalentes às mesmas, a divulgação pode ser praticada de outro modo diferente do especificamente descrito e reivindicado. A presente divulgação é dirigida a cada característica, sistema, artigo, material e/ou método individual aqui descrito. Além disso, qualquer combinação de dois ou mais destas características, sistemas, artigos, materiais e/ou métodos, caso estas características, sistemas, artigos, materiais e/ou métodos não sejam mutuamente inconsistentes, está incluída no escopo da presente divulgação.

#### **LISTA DE MODALIDADES PREFERIDAS**

[00412]1. Um anticorpo isolado que especificamente se liga à molécula de orientação repulsiva humana C (RGMc), em que:

a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo;

b) o anticorpo não se liga à molécula de orientação repulsiva humana A (RGMa) e molécula de orientação repulsiva humana B (RGMb); e

c) o anticorpo inibe ou reduz interação de RGMc com BMP6.

[00413]3. O anticorpo de modalidade 1 ou modalidade 2, em que o anticorpo se liga a um epítopo descontínuo compreendendo pelo menos um fragmento de cada uma de primeira e segunda região de ligação dentro de RGMc humana, em que a primeira região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 46, em que, opcionalmente, a segunda região de ligação compreende a sequência de aminoácido como especificada em SEQ ID NO: 47.

[00414]4. Um anticorpo isolado que se liga a um epítopo dentro da RGMc humana, em que:

a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e

b) o anticorpo se liga a um epítopo compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e/ou pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSAVHGIEDL (SEQ ID NO: 47).

[00415]5. O anticorpo de modalidade 4, em que o epítopo compreende pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSAVHGIEDL (SEQ ID NO: 47).

[00416]6. O anticorpo de modalidade 4 ou 5, em que o anticorpo não se liga à RGMa humana e RGMb humana.

[00417]7. O anticorpo de qualquer uma de modalidades 4-76, em que o anticorpo inibe ou reduz interação de RGMc com BMP6.

[00418]8. O anticorpo de qualquer uma de modalidades 4-7, em que o anticorpo não inibe ou reduz interação de RGMc com neogenina.

[00419]9. Um anticorpo isolado que especificamente se liga a RGMc humana, em que o anticorpo é um anticorpo de

comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, e em que o anticorpo compreende pelo menos três das seguintes seis CDRs:

- a) CDR-H1: SEQ ID NO: 14, com a condição que:
  - i. o resíduo serina em posição 4 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma arginina;
  - ii. o resíduo alanina em posição 7 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma serina; e/ou
  - iii. o resíduo serina em posição 9 de SEQ ID NO: 14 pode ser substituído com uma glutamina;
- b) CDR-H2: SEQ ID NO: 15, com a condição que:
  - i. o resíduo treonina em posição 8 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma valina; e/ou
  - ii. o resíduo asparagina em posição 10 de SEQ ID NO: 15 pode ser substituído com uma serina;
- c) CDR-H3: SEQ ID NO: 16, com a condição que:
  - i. o resíduo isoleucina em posição 5 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma tirosina; e/ou
  - ii. o resíduo alanina em posição 6 de SEQ ID NO: 16 pode ser substituído com uma valina;
- d) CDR-L1: SEQ ID NO: 17;
- e) CDR-L2: SEQ ID NO: 18; e,
- f) CDR-L3: SEQ ID NO: 19.

[00420]10. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo compreende sequências de CDR1 de cadeia pesada (H-CDR1), CDR2 de cadeia pesada (H-CDR2), e CDR3 de cadeia pesada (H-CDR3) como especificadas em SEQ ID NOs: 30, 31, e 32, respectivamente, e sequências de CDR1 de cadeia leve (L-CDR1), CDR2 de cadeia leve (L-CDR2), e CDR3 de cadeia leve (L-CDR3) como especificadas em

SEQ ID Nos: 33, 34, e 35, respectivamente; em que opcionalmente:

o resíduo R em posição 4 da H-CDR1 é substituído com um K ou S; o resíduo S em posição 5 da H-CDR1 é substituído com um T; o resíduo S em posição 7 da H-CDR1 é substituído com um A; e/ou o resíduo S em posição 9 da H-CDR1 é substituído com um Q;

em que ainda opcionalmente:

o resíduo V em posição 8 da H-CDR2 é substituído com um H ou T; e/ou o resíduo N em posição 10 da H-CDR2 é substituído com um S, T ou E.

[00421]11. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 36; e/ou

b) uma região variável de cadeia leve variável tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 37.

[00422]12. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo compreende:

a) uma sequência de região variável de cadeia pesada como especificada em SEQ ID NO: 36; e

b) uma sequência de região variável de cadeia leve como especificada em SEQ ID NO: 37.

[00423]13. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo compreende CDR1 de cadeia pesada, CDR2, e sequências de CDR3 como especificadas em SEQ ID NOs: 38, 39, e 40, respectivamente, e sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve como especificadas em SEQ ID NOs:

41, 42, e 43, respectivamente.

[00424]14. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo compreende:

c) uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: SEQ ID NO: 44; e/ou

d) uma região variável de cadeia leve variável tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 45.

[00425]15. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo compreende:

a) uma sequência de região variável de cadeia pesada como especificada em SEQ ID NO: 44; e

b) uma sequência de região variável de cadeia leve como especificada em SEQ ID NO: 45.

[00426]16. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo é um anticorpo completamente humano ou humanizado.

[00427]17. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, que é um anticorpo de IgG1, IgG2 ou IgG4 humano.

[00428]18. O anticorpo de qualquer uma das reivindicações precedentes, que é um anticorpo de IgG4 humano, em que, opcionalmente, o anticorpo de IgG4 humano compreende uma substituição da cadeia principal de Ser para Pro que produz uma dobradiça tipo IgG1.

[00429]19. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo se liga a uma célula expressando RGMc humana ligada à membrana.

[00430]20. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo se liga à RGMc com um valor

$K_D$  de menos do que  $0,1 \times 10^{-9}$  (0,1 nM).

[00431]21. O anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes, em que o anticorpo modula interação de RGMc com uma ou mais das seguintes proteínas de interação; HFE, TFR2, ALK2, ALK3, BMPR2, ACVR2A e Tmprss6.

[00432]22. Um anticorpo isolado que especificamente se liga a RGMc humana, em que o anticorpo compete para ligação a RGMc humana com, e/ou se liga ao mesmo epítipo como, um anticorpo de qualquer uma das modalidades 4-21.

[00433]23. Uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo de qualquer uma das modalidades precedentes e um carreador farmacêuticamente aceitável.

[00434]24. A composição de modalidade 23 para uso em um método para o tratamento de uma doença associada com RGMc em um indivíduo humano, em que o tratamento compreende administração da composição ao indivíduo em uma quantidade eficaz para tratar a condição.

[00435]25. A composição para uso de acordo com modalidade 24, em que a doença associada com RGMc é anemia.

[00436]26. A composição para uso de acordo com modalidade 25, em que a anemia é anemia por deficiência de ferro refratária ao ferro (IRIDA) ou anemia de doença crônica (ACD).

[00437]27. A composição para uso de acordo com modalidade 26, em que a ACD é uma anemia relacionada com câncer.

[00438]28. A composição para uso de acordo com modalidade 25, em que a anemia é uma anemia induzida por quimioterapia.

[00439]29. A composição para uso de acordo com modalidade 26, em que a ACD é anemia associada com doença renal crônica (CKD).

[00440]30. A composição para uso de acordo com qualquer uma de modalidades 24-29, em que a composição é administrada em combinação com um agente terapêutico adicional.

[00441]31. A composição para uso de acordo com modalidade 30, em que o agente terapêutico adicional é um agente estimulador de eritropoietina(ESA), estabilizador de HIF, suplemento de ferro ou transfusão.

[00442]32. A composição para uso de acordo com modalidade 31, em que o método reduz toxicidades associadas com ESAs, estabilizadores de HIF, suplemento de ferro ou transfusão.

[00443]33. A composição para uso de acordo com modalidade 32, em que as toxicidades incluem sobrecarga de ferro, um risco de câncer e/ou risco de eventos cardiovasculares (por exemplo, eventos adversos cardíacos maiores, como derrame).

[00444]34. A composição para uso de acordo com qualquer uma de modalidades 24-33, em que o indivíduo está:

- a) na terapia com ferro, mas se beneficia da dosagem reduzida da terapia com ferro;
- b) recebeu a terapia com ferro, mas interrompeu devido a toxicidades;
- c) recebeu a terapia com ferro e se beneficia com a dosagem reduzida da terapia com ferro;
- d) está em risco de câncer; e/ou
- e) foi diagnosticado com câncer.

[00445]35. Um método para tratamento de uma doença associada com RGMc em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para tratar a doença.

[00446]36. Um método para aumentar os níveis de ferro sérico em um indivíduo, o método compreendendo a

administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para aumentar níveis de ferro sérico no indivíduo.

[00447]37. Um método para regular para baixo hepcidina em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para regular para baixo hepcidina no indivíduo.

[00448]38. O método de modalidade 37, em que a composição farmacêutica reduz níveis de mRNA de hepcidina no fígado.

[00449]39. O método de modalidade 37, em que a composição farmacêutica reduz níveis de proteína de hepcidina no fígado, níveis de proteína hepcidina sérica (circulantes), ou ambos.

[00450]40. Um método para aumentar saturação de transferrina em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para aumentar saturação de transferrina no indivíduo.

[00451]41. Um método para aumentar eritropoiese em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 ou 24 em uma quantidade eficaz para aumentar eritropoiese no indivíduo.

[00452]42. Um método para diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado no indivíduo.

[00453]43. Um método para diminuir capacidade de ligação

de ferro total (TIBC) em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para diminuir capacidade de ligação de ferro total no indivíduo.

[00454]44. Um método para aumentar níveis de ferritina sérica em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo da composição farmacêutica de modalidade 23 em uma quantidade eficaz para aumentar níveis de ferritina sérica no indivíduo.

[00455]45. O método de modalidade 44, em que a quantidade é uma quantidade eficaz para alcançar os níveis de ferritina sérica de  $\geq 20$  nanogramas por mililitro de sangue.

[00456]46. A composição farmacêutica para uso de acordo com qualquer uma de modalidades 24-34 ou o método de acordo com qualquer uma de modalidades 35-45, em que o indivíduo recebeu uma terapia com eritropoietina (por exemplo, EPO), terapia com estabilizador HIF, suplementação de ferro IV, ou combinação das mesmas.

[00457]47. A composição farmacêutica para uso de acordo com qualquer uma de modalidades 24-34 ou o método de acordo com qualquer uma de modalidades 35-45, em que o indivíduo manifestou ou está em risco de um evento adverso associado à terapia de EPO ou à suplementação de ferro IV.

[00458]48. Um método para produzir uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpo neutralizante), o método compreendendo as etapas de:

i) identificar anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno quanto à capacidade para se ligar seletivamente a RGMc em vez de RGMa e RGMb;

ii) identificar os anticorpos ou fragmento de ligação ao antígeno com base na etapa (i) quanto à capacidade para inibir/neutralizar a atividade RGMc *in vivo*;

iii) selecionar um anticorpo inibidor/ neutralizante com base nas etapas (i) e (ii) para formulação em uma composição farmacêutica.

[00459]49. O método de modalidade 48, em que etapa (i) compreende uma seleção positiva e, opcionalmente, compreende adicionalmente uma seleção negativa.

[00460]50. O método de modalidade 48 ou 49, em que o epítopo exclui um sítio de ligação a neogenina.

[00461]51. O método de modalidade 48 ou modalidade 49, em que o anticorpo preferivelmente se liga a RGMc ligado a membrana em vez de RGMc solúvel.

[00462]52. O método de modalidade 48 ou modalidade 49, em que o anticorpo induz internalização de um complexo anticorpo-antígeno.

[00463]53. O método de qualquer uma de modalidades 48-52, em que a etapa de identificação (i) compreende triagem de uma biblioteca.

[00464]54. O método de modalidade 53, em que a biblioteca é uma biblioteca de fagos ou uma biblioteca de leveduras.

[00465]55. O método de qualquer uma de modalidades 48-54, em que a etapa de identificação (ii) compreende medir um parâmetro de ferro selecionado do grupo consistindo em: ferro sérico, capacidade de ligação de ferro total (TIBC), capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC), e saturação de transferrina.

[00466]56. O método de qualquer uma de modalidades 48-55, em que etapa (ii) compreende medir expressão de

hepcidina.

[00467]57. O método de modalidade 56, em que a expressão de hepcidina são níveis de hepcidina no fígado e/ou níveis de hepcidina sérica.

[00468]58. O método de qualquer uma de modalidades 48-57, em que etapa (ii) compreende identificação de anticorpos neutralizantes ou fragmentos de ligação ao antígeno capazes de elevar níveis de ferro sérico e/ou suprimir expressão de hepcidina *in vivo*.

[00469]59. O método de qualquer uma de modalidades 48-58, em que a composição farmacêutica é formulada para administração intravenosa ou subcutânea.

[00470]60. O método de qualquer uma de modalidades 48-59, em que etapa (i) compreende confirmação seletivamente para RGMc em vez de RGMa e RGMb.

[00471]61. Um inibidor seletivo de RGMc para uso em um método para tratamento de distúrbio de ferro em um indivíduo, em que o inibidor seletivo de RGMc não inibe RGMa e RGMb, e em que o distúrbio de ferro causa anemia no indivíduo.

[00472]62. Um inibidor seletivo de RGMc para uso em um método para redução de toxicidades associadas com uma terapia com ferro, em que o método compreende a administração de uma quantidade eficaz do inibidor seletivo de RGMc para o indivíduo.

[00473]63. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 62, em que a terapia com ferro é uma terapia EPO, suplemento de ferro ou transfusão.

[00474]64. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 62 ou 63, em que as toxicidades incluem sobrecarga de ferro ou risco de câncer.

[00475]65. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com qualquer uma de modalidades 62-64, em que o indivíduo está a) na terapia com ferro, mas se beneficia da dosagem reduzida da terapia com ferro; b) recebeu a terapia com ferro, mas interrompeu devido a toxicidades; c) recebeu a terapia com ferro e se beneficia com a dosagem reduzida da terapia com ferro; d) está em risco de câncer; e) foi diagnosticado com câncer.

[00476]66. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com qualquer uma de modalidades 61-65, em que o inibidor seletivo de RGMc é um anticorpo seletivo de RGMc, em que, opcionalmente, o anticorpo seletivo de RGMc é um anticorpo neutralizante.

[00477]67. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 66, em que o anticorpo seletivo de RGMc se liga a uma porção extracelular de RGMc ou um complexo compreendendo a mesma.

[00478]68. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 67, em que o anticorpo seletivo de RGMc se liga a uma porção extracelular de RGMc ou um complexo compreendendo a mesma presente em superfície celular.

[00479]69. Um inibidor seletivo de RGMc para uso no tratamento de deficiência funcional de ferro em um indivíduo, em que o indivíduo recebeu um ESA e/ou estabilizador de HIF.

[00480]70. Um inibidor seletivo de RGMc e uma terapia com eritropoietina (por exemplo, ESAs, estabilizadores de HIF) para uso no tratamento de deficiência funcional de ferro em um indivíduo.

[00481]71. O inibidor seletivo de RGMc e a terapia com eritropoietina (por exemplo, ESAs, estabilizadores de HIF)

para uso de acordo com modalidade 70, em que o tratamento alcança alívio mais rápido ou início do benefício terapêutico em comparação com a terapia de eritropoietina sozinha, em que, opcionalmente, o benefício terapêutico compreende ferro sérico aumentado, saturação de transferrina aumentada, hemoglobina aumentada, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00482]72. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 70, em que o inibidor seletivo de RGMc sensibiliza a terapia com eritropoietina.

[00483]73. Um inibidor seletivo de RGMc para uso em redução da dosagem ou frequência de uma terapia com ferro selecionado dentre suplementos de ferro oral ou IV, transfusão, ESAs e estabilizadores de HIF, em que o inibidor seletivo de RGMc alcança benefícios terapêuticos quando administrado em conjunto com a terapia com ferro.

[00484]74. Um inibidor seletivo de RGMc para uso no tratamento de anemia em um indivíduo que tem câncer.

[00485]75. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 74, em que o indivíduo é um candidato para ou está recebendo quimioterapia.

[00486]76. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 74, em que o indivíduo recebeu quimioterapia.

[00487]77. O inibidor seletivo de RGMc para uso de acordo com modalidade 74, em que o indivíduo não é um candidato para receber uma terapia com ESA ou terapia com estabilizador HIF.

[00488]78. Um inibidor seletivo de RGMc para uso no tratamento de deficiência funcional de ferro em um indivíduo que é hiporresponsivo a uma terapia com eritropoietina ou suplemento de ferro.

[00489]79. Um inibidor seletivo de RGMc para uso no tratamento de deficiência funcional de ferro em um indivíduo que é intolerante a uma terapia com eritropoietina ou suplemento de ferro.

[00490]A presente invenção é ilustrada adicionalmente pelos seguintes exemplos, que não se destinam a ser limitantes de qualquer forma. Todo o conteúdo de todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados, citados ao longo de todo o pedido, bem como as Figuras, é aqui incorporado por referência.

#### EXEMPLOS

[00491]RGMc é um correceptor obrigatório expresso no fígado para algumas BMPs, como BMP6, que intensificam a expressão de hepcidina e, conseqüentemente, inibem o transporte de ferro. Por outro lado, outros membros da família de RGM, como RGMa e RGMb, são mais amplamente expressos, por exemplo, no sistema nervoso, cérebro, pele, coração, fígado, pulmão, rim, testículo e intestino. Adicionalmente, BMP6 tem uma ampla expressão através do corpo, por exemplo, cérebro, osso, fígado, pulmão, rim, pâncreas, testículos e intestino. Conseqüentemente, por direcionamento a RGMc, cuja expressão é mais restritiva do que de RGMa, RGMb, e BMP6, maiores efeitos específicos de tecido podem ser obtidos enquanto reduzindo os efeitos fora do alvo. Esta abordagem apresenta o potencial de se dirigir tanto a anemias com restrição de ferro como a condições com sobrecarga de ferro sem inibir amplamente as funções de RGM e BMP6 em todo o corpo, que poderia levar a toxicidades não desejáveis.

[00492]Conseqüentemente, a presente invenção inclui o

reconhecimento que o direcionamento seletivo de RGMc fornece uma abordagem vantajosa para alcançar tanto eficácia como segurança (toxicidades reduzidas), como comparado com abordagens convencionais, como antagonistas diretos de BMP6 e inibidores não seletivos de RGMa/RGMb/RGMc.

**Exemplo 1: Identificação de anticorpos específicos de RGMc**

[00493]Anticorpos que são seletivos de RGMc foram gerados usando técnicas conhecidas como descrito aqui. Especificidade de RGMc em vez de RGMa e RGMb foi verificada usando um ensaio de ligação *in vitro* (isto é, Octet®). A afinidade de ligação de anticorpos de teste para seu alvo foi realizada tomando cada anticorpo a 7,5ug/ml (ou 50nM) em tampão cinético 1x, e carregando em um biossensor de captura anti-hIgG Fc (AHC) de Pall ForteBio®. Após carga, uma leitura da linha de base foi obtida colocando as pontas no tampão cinético 1x antes de calcular a taxa 'ligada', ou associação, dos anticorpos por apresentação dos mesmos a hRGMc, hRGMa, ou hRGMb marcadas com histidina, em concentrações variadas (900nM, 300nM, 100nM, e 33nM). Após alcançar a saturação de ligação, uma etapa de dissociação foi realizada para calcular a taxa 'reversa' movendo as pontas de volta no tampão cinético 1x. A taxa de ligação e dissociação pode ser então usada para calcular o  $K_D$ , ou afinidade de ligação de cada anticorpo para o alvo principal (RGMc) enquanto assegurando nenhuma ligação cruzada para os membros da família de RGM (RGMa e RGMb).

[00494]**Figura 2** apresenta os perfis de ligação e dados de afinidade ( $K_D$ ) para anticorpos específicos de RGMc SR-RC-AB3, SR-RC-AB4, e SR-RC-AB5. Notavelmente, todos os três

anticorpos se ligam a RGMc com afinidade nanomolar, enquanto nenhum dos anticorpos demonstrou qualquer ligação detectável a RGMa ou RGMb.

***Exemplo 2: Anticorpos seletivos de RGMc inibem a atividade de BMP6 in vitro***

[00495]Um ensaio repórter de BMP modificado foi utilizado para avaliar a inibição de anticorpo de atividade de BMP. Brevemente, células repórter de HEPG2BRA foram semeadas a 10.000 células/cavidade em placas de 96 cavidades. 24 horas depois, anticorpos foram pré-incubados separadamente com RGMc humana recombinante, solúvel, fusionada a um Fc (CF~40 nM) durante uma hora a DMEM/0,1%BSA, seguido pela adição de BMP6 (CF=0.2 nM) à solução por uma hora. 100 uL/cavidade do completo resultante anticorpo-RGMc-BMP6 foram adicionados a placas de HEPG2BRA em triplicata, e retornados ao incubador durante 18 horas. 100 de substrato luciferase BrightGlo™ (Promega®) foram adicionados a cada cavidade e RLU foi determinado usando um leitor de placa (Biotek®). Porque RGMc solúvel sequestra lBMP6 e inibe sua atividade transcripcional a jusante, anticorpos que bloqueiam a ligação de BMP6 para RGMc solúvel ativam a atividade de repórter de BMP6 nesse ensaio, e são referidos como anticorpos competitivos de BMP6. Titulações de resposta a dose de SR-RC-AB3 e SR-RC-AB4 revelaram que eles apresentam uma potência demonstrada no ensaio repórter de BRE com EC50s de 6,83 nM e 1,68 nM, respectivamente.

***Exemplo 3: Desenvolvimento de anticorpos seletivos de RGMc amadurecidos por afinidade***

[00496]SR-RC-AB3 e SR-RC-AB4 foram selecionados para amadurecimento de afinidade. Amadurecimento de afinidade foi

conduzido usando técnicas conhecidas, por exemplo, exibição de levedura, como descrito aqui.

[00497] Para determinar as afinidades de ligação a RGMa-his (monovalente) ou RGMa-Fc (ávído), anticorpos de teste foram imobilizados na superfície de biossensores de captura Fc anti-humano (AHC) (ForteBio®) e os sensores foram então bloqueados com um excesso do anticorpo de controle negativo. Ligação foi então testada para Fc ou RGMa marcada com histidina, a 100nM. Os antígenos foram deixados se associar por 3 minutos seguido por uma dissociação de 3 minutos. Tampão cinético (ForteBio®) foi usado em todo o experimento, e  $K_D$  foi determinado usando um modelo de ajuste 1:1 para cada par de anticorpo antígeno. Nenhum dos anticorpos mostrou ligação para a proteína RGMa marcada com histidina, enquanto alguns clones de fato mostraram uma resposta ao ávído (forma marcada Fc) (**Figura 4A**). Os clones que mostraram ligação ao RGMa-Fc foram todos da mesma linhagem indicando um epítipo potencialmente reativo cruzado dentro dessa família. Clones tendo ligação a RGMa-Fc não foram selecionados para testes adicionais.

[00498] Para medir afinidades por MSD-SET (determinação de mesoescala - titulação de equilíbrio da solução) uma titulação de anticorpos específicos de RGMc (neste caso na forma Fab dos anticorpos) foi pré-incubada com uma concentração constante de antígeno durante 20-24 horas para alcançar o equilíbrio. A titulação foi então adicionada a uma placa pré-aquecida com um anticorpo de captura (pré-marcado com uma *sulfotag* NHS) que depleta qualquer antígeno livre da solução. Após uma incubação de 150 segundos, a placa foi lavada três vezes e um reagente SA-*sulfotag* foi

adicionado e incubado durante 3 min. Após lavagens adicionais, a placa foi lida em um MesoQuickPlex SQ120. Afinidades Fab para tanto os antígenos RGMc humanos como camundongos foram determinadas e mostram que a reatividade cruzada para ambas as espécies foi mantida durante todo o processo de amadurecimento por afinidade (**Figura 4B**).

[00499]Um ensaio similar MSD-SET foi realizado com os anticorpos de comprimento completo contra o antígeno RGMc-his humano para determinar afinidade de ligação ( $K_D$ ). Como mostrado em Tabela 3, seleção de anticorpos de progênie alcançou afinidades sub-nanomolares como comparado com os anticorpos parentais.

[00500]A atividade de BRE-luciferase (que mede a competição de BMP-6 *in vitro*) foi realizada como descrito acima em Exemplo 2. Como mostrado em Tabela 4, os anticorpos amadurecidos por afinidade também mostram uma melhora na competição para BMP, como comparado com os anticorpos parentais.

**Tabela 3:**  $K_D$  de anticorpos de RGMc amadurecidos por afinidade

|                                       |           | $K_D$ (M) |
|---------------------------------------|-----------|-----------|
| Anticorpos parentais                  | SR-RC-AB3 | 4.30E-9   |
|                                       | SR-RC-AB4 | 4.00E-9   |
| Anticorpos amadurecidos por afinidade | SR-RC-AB7 | 2.10E-11  |
|                                       | SR-RC-AB8 | 3.90E-11  |
|                                       | SR-RC-AB9 | 2.40E-11  |

**Exemplo 4: Anticorpos seletivos de RGMc amadurecidos por afinidade inibem a atividade de BMP6 *in vitro***

[00501]Para determinar se os anticorpos seletivos de RGMc amadurecidos por afinidade inibiram a ligação de BMP6

a RGMc, um ensaio de BMP6 foi conduzido como descrito acima in Exemplo 2. Como mostrado em **Figura 5A**, a família SR-RC-AB3 de anticorpos amadurecidos por afinidade exibe melhorada capacidade para inibir a ligação de BMP a RGMc (como mostrado por atividade aumentada de BMP) como comparado com o anticorpo parental (isto é, SR-RC-AB3). Como mostrado em **Figura 5B**, a família SR-RC-AB4 de anticorpos amadurecidos por afinidade exibe uma melhorada capacidade para inibir a ligação de BMP a RGMc (como mostrado por atividade de BMP relativa aumentada) como comparado com o anticorpo parental (isto é, SR-RC-AB3). Um ligante de RGM de alta afinidade foi usado como um controle, junto com um controle de isotipo. **Tabela 4** mostra os valores calculados de EC50 no ensaio de atividade de BMP. Juntos, estes resultados indicam que os anticorpos amadurecidos por afinidade têm uma capacidade melhorada para inibir a atividade de RGMc através de BMP.

**Tabela 4:** Anticorpos amadurecidos por afinidade mostram competição para BMP aumentada.

|                                       |           | EC50<br>(ug/mL) |
|---------------------------------------|-----------|-----------------|
| Anticorpos parentais                  | SR-RC-AB3 | 4,83            |
|                                       | SR-RC-AB4 | 5,25            |
| Anticorpos amadurecidos por afinidade | SR-RC-AB7 | 3,87            |
|                                       | SR-RC-AB8 | 3,63            |
|                                       | SR-RC-AB9 | 3,45            |

**Exemplo 5: Anticorpos seletivos de RGMc amadurecidos por afinidade modulam a homeostase de ferro *in vivo***

[00502] Para avaliar os efeitos *in vivo* dos anticorpos, parâmetros de ferro (ferro sérico, capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC), e saturação de transferrina) foram medidos 24 horas após uma única administração de anticorpo

(0,2 mg/kg, n=5 animais/grupo) em roedores. Ratos fêmeas Sprague Dawley (7 a 9 semanas de idade, Charles River Laboratories) foram administrados com uma única dose i.v. de anticorpo. 24 horas depois, animais foram sacrificados, soro foi coletado para análise de ferro em um analisador de química clínica ModP ou Cobas ou para ELISA hepcidina, e os fígados foram colhidos para análise da expressão de RNA de hepcidina. Seleção dos anticorpos competitivos para BMP fortemente reprimiu hepcidina e aumentou a mobilização de ferro em roedores. Mais especificamente, como mostrado em **Figura 6A e 6B**, SR-RC-AB1, SR-RC-AB7, SR-RC-11, SR-RC-AB8, SR-RC-AB9, SR-RC-AB2, e SR-RC-AB10, aumentou o ferro sérico em ratos como comparado com controle e reduziu a capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) em ratos saudáveis. Dados demonstram que inibidores seletivos de RGMc de acordo com a presente invenção são eficazes na mobilização de ferro *in vivo* (**Figura 6A**), ao reduzir significativamente a capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) (**Figura 6B**) e obter um aumento significativo em saturação de transferrina a 0,2 mg/kg após 24 horas em ratos.

[00503]Para examinar a relação farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) de anticorpos seletivos de RGMc, estudos de PK/PD de dose única foram conduzidos em ratos fêmeas Sprague Dawley. Animais foram administrados com uma dose única intravenosa (IV) dose de anticorpo a 0,6, 2, 6 e 20 mg/kg e parâmetros de ferro sérico (por exemplo, níveis de ferro sérico e UIBC) foram determinados medidas farmacodinâmicas enquanto concentrações séricas de anticorpo foram medidas para determinar o perfil de PK do anticorpo. Ferro sérico e UIBC foram determinados por analisador de

química clínica RX Daytona e concentrações de anticorpo foram medidas por ELISA.

[00504]**Figura 7A** mostra níveis de ferro sérico (média±SEM) em animais ao longo do tempo quando tratados com uma dose única de SR-RC-AB8 (n=2) ou SR-RC-AB9 (n=5) a 20 mg/kg. SR-RC-AB8 e SR-RC-AB9 aumentaram os níveis de ferro sérico e reduziram os níveis de UIBC, comparado ao controle. **Figura 7B** mostra medições de ferro sérico (topo) e UIBC (fundo) nos estudos PK/PD de acompanhamento em que fêmeas Sprague-Dawley foram administradas como uma dose única IV de SR-RC-AB8 a 0,6 mg/kg a 20 mg/kg (n=5-11 animais/grupo). SR-RC-AB8 aumentaram os níveis de ferro sérico e reduziram os níveis de UIBC em todas as doses avaliadas, comparado ao controle. A duração das mudanças em parâmetros de ferro sérico foi dependente da dose em que os efeitos foram sustentados ao longo de 21 dias após a dose única de 20 mg/kg. **Figura 7C** mostra as concentrações séricas de anticorpo dentro dos mesmos animais. Os parâmetros de PK foram calculados usando *software* Phoenix WinNonlin e resumidos na Tabela 5. Disposição do fármaco mediada pelo alvo (TMDD) é observada em todos os níveis de dose, no entanto, em doses maiores de 6 e 20 mg/kg, o alvo parece estar saturado nos primeiros momentos e a observação de TMDD e o momento da mudança na depuração são anotados em pontos de tempo posteriores no perfil de PK. A concentração máxima é obtida em 1h após a dose, e a  $C_{max}$  demonstrou um aumento proporcional à dose. A meia-vida do anticorpo está na faixa de 1,2-6,7 dias, indicando depuração mais rápida e tempos de residência mais curtos comparados com doses mais baixas. Isto é consistente com moléculas IgG4 humanas com disposição do

fármaco mediada pelo alvo (TMDD). Por último, como esperado com uma molécula que exibe TMDD, um aumento mais do que proporcional à dose na exposição, conforme medido por  $AUC_{0-8}$ , foi observado. **Figura 7D** ilustra a relação entre exposição do anticorpo (PK) e parâmetros de ferro sérico (PD) a 20mg/kg. Dados sugerem que as concentrações acima de 3µg/mL são necessárias para um efeito contínuo de PD.

| Dose (mg/kg) | n | $T_{1/2}$ média (SD) (dias) | $C_{max}$ (SD) (µg/mL) | $T_{max}$ (dia) | $AUC_{0-8}$ (SD) (dia*µg/mL) |
|--------------|---|-----------------------------|------------------------|-----------------|------------------------------|
| 0,6          | 5 | 1,18 (0,0926)               | 8,54 (0,696)           | 0,004           | 10,3 (0,353)                 |
| 2            | 5 | 2,22 (0,223)                | 33,9 (4,42)            | 0,004           | 63,4 (6,5)                   |
| 6            | 5 | 4,7 (0,207)                 | 111 (3,78)             | 0,004           | 284 (11,7)                   |
| 20           | 7 | 6,62 (1,13)                 | 420 (46,6)             | 0,004           | 1140 (80,2)                  |

[00505]Juntos, esses dados demonstram que a disruptura direcionada da via de sinalização de BMP6-hepcidina por anticorpos específicos de RGMc aumenta a disponibilidade de ferro *in vivo*. Esses resultados suportam a noção de que a inibição seletiva de fígado de sinalização de BMP6 pode fornecer uma maneira segura e eficaz de direcionar uma variedade de anemias com restrição a ferro, incluindo anemia de CKD e anemia induzida por quimioterapia ou câncer.

**Exemplo 6: Mapeamento de epítipo de HDX para determinar regiões de ligação anticorpo seletivo de RGMc**

[00506]Espectrometria de massa de troca de hidrogênio/deutério (HDX-MS) é uma técnica amplamente usada para explorar conformação de proteína em solução. A metodologia HDX-MS é descrita em Wei *et al.*, Drug Discov Today, 2014 January; 19(1): 95-102, incorporado por referência em sua totalidade aqui. Brevemente, HDX-MS depende da troca dos hidrogênios amida da cadeia principal da proteína com deutério em solução. Os hidrogênios amida de cadeia principal envolvidos em ligações de hidrogênio fracas

ou localizados na superfície da proteína podem trocar rapidamente, enquanto aqueles enterrados no interior ou aqueles envolvidos na estabilização de ligações de hidrogênio trocam mais lentamente. Medindo as taxas de troca de hidrogênio/deutério (H/D) de hidrogênios amida de cadeia principal, pode-se obter informações sobre a dinâmica e conformação de proteínas.

[00507]HDX-MS foi realizado para determinar onde RGMc SR-RC-AB9 está se ligando. Em HDX-MS, as regiões de um antígeno que são firmemente ligadas por um anticorpo são protegidas da troca H/D, devido à interação proteína-proteína, enquanto regiões que são expostas a solvente podem sofrer prontamente troca H/D. Com base nisso, regiões de ligação do antígeno foram identificadas. **Figura 8A** mostra duas regiões protegidas de troca H/D sugerindo que SR-RC-AB9 potencialmente se liga a um único epítipo compreendendo duas regiões de ligação (região A e região B) nas hélices  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  de RGMc, respectivamente. A hélice  $\alpha 3$  inclui parte do domínio de ligação de BMP. **Figura 8B** é um alinhamento de peptídeos RGMa/b/c correspondendo à região A e região B. **Figura 8C** mostra a estrutura da RGMc modelada após a estrutura de RGMa conhecida ligada a BMP2.

[00508]De fato, os anticorpos específicos de RGMc podem se ligar à hélice  $\alpha 3$  (por exemplo, região B) com base na presença de resíduos de contato potenciais (ver, por exemplo, **Figura 8D**). Além disso, existem várias variações de aminoácido dentre as isoformas, particularmente na hélice  $\alpha 1$ , que provavelmente contribuem para a especificidade da isoforma de anticorpos de progênie SR-RC-AB3 (por exemplo, SR-RC-AB8 e SR-RC-AB9). Do mesmo modo, existem vários

resíduos dentro da região A que podem servir como determinante estrutural da especificidade de RGMc em vez de RGMa e RGMb (**Figura 8E**).

***Exemplo 7: Anticorpos seletivos de RGMc modulam homeostase de ferro em primatas não humanos***

[00509]Para avaliar a capacidade de anticorpos seletivos de RGMc para modular homeostase de ferro em primatas não humanos, parâmetros de ferro sérico foram medidos após uma dose I.V. única de SR-RC-AB8 a 10 mg/kg *Cynomolgus macaques* fêmeas (2-7 anos de idade, Covance). Soro foi coletado de animais em regulares intervalos durante 10 semanas após a única dose de anticorpo. Ferro sérico e UIBC foram medidos em um analisador de sangue Cobas e a exposição de anticorpo sérico determinada por ELISA.

[00510]SR-RC-AB8 efetivamente aumentaram ferro sérico e diminuíram UIBC após a administração do anticorpo e níveis de ferro sérico permaneceram elevados através de 6 semanas após a dosagem, como mostrado em **Figura 9A**. Por 8 semanas, o ferro sérico em todos os animais dosados com SR-RC-AB8 tinham retornado à linha de base. **Figura 9B** mostra a concentração sérica média de SR-RC-AB8 até 10 semanas após dosagem. O perfil de PK foi como esperado para um anticorpo monoclonal com  $C_{max}$  de 242  $\mu\text{g/mL}$  ( $\pm 21,3$ ) obtido 1h após a dose. A relação PK/PD avaliada por comparação da exposição do anticorpo (PK) aos parâmetros de ferro sérico (PD) sugere que as concentrações acima de 3 $\mu\text{g/mL}$  podem produzir um efeito de PD contínuo ou prolongado (**Figura 9C**).

[00511]Estes resultados confirmam que os anticorpos seletivos de RGMc podem ter um efeito sustentado sobre o ferro sérico em primatas não humanos após uma única dose de

anticorpo, o que pode permitir oportunidades para infusão IV não frequente (por exemplo, a cada 3 meses ou 6 meses) e/ou regimes de dosagem subcutânea.

***Exemplo 8: Anticorpos seletivos de RGMC modulam ferro sérico e aumentam hemoglobina quando dosados em combinação com um ESA em um modelo de rato de anemia de doença crônica.***

[00512] Para examinar o efeito dos anticorpos seletivos de RGMC no ferro sérico e nos parâmetros sanguíneos em um modelo de anemia de doença crônica (ACD), foi usado o modelo Lewis PG-APS ACD. Este é um modelo de anemia de doença crônica de longa duração em ratos, possibilitando, assim, a investigação do efeito de fármacos moduladoras de hepcidina sobre eritropoiese. Devido ao potencial de anticorpos seletivos de RGMC para intensificar a função de ESAs, os anticorpos foram dosados sozinhos e em combinação com a epoetina alfa (EPO). A artrite foi induzida em ratos com PG-APS [15 mg/kg] i.p. e após 14 dias os parâmetros de sangue e ferro sérico foram determinados. Com base nesses resultados, os ratos foram randomizados em grupos para dosagem, com o primeiro dia de dosagem marcado como dia 0. Animais (n = 6-8 por grupo) foram tratados com controle de isotipo ou anticorpos SR-RC-AB8 (20mg/kg ) e/ou EPO (10ug/kg) semanalmente. Os animais foram dosados durante um total de 4 semanas (dia 0, 7, 14, 21) e ferro sérico e parâmetros sanguíneos foram medidos semanalmente nos dias 3, 10, 17, 24 e 28.

[00513] **FIG 10A** mostra a mudança em ferro sérico a partir de medições de linha de base em dia -3 para cada grupo de dose. Dosagem semanal com SR-RC-AB8 sozinho e em combinação com EPO aumentou ferro sérico comparado com IgG sozinho em

animais ACD. **Figura 10B** mostra os dados de ferro sérico absoluto ( $\mu\text{g/dL}$ ) a partir do dia 24 do estudo. Note-se a significativa diferença em ferro sérico entre controles saudáveis e animais ACD e aumento de ferro sérico em grupos de animais dosados com SR-RC-AB8. **Figura 10C** ilustra a mudança em hemoglobina a partir das medições de linha de base em dia 3 para cada grupo de dose. Os dados mostram que quando dosados em combinação com EPO, SR-RC-AB8 tinham um efeito robusto sobre hemoglobina, aumentando os níveis mais rápidos e maiores em média de EPO ou anticorpo sozinho. Os dados de hemoglobina absoluta sozinho (g/dL) a partir do dia 24 são ilustrados em **Figura 10D**. Notou-se um aumento de 58% em hemoglobina em um grupo de dose de ACD: SR-RC-AB8 + EPO quando comparado com um grupo de controle ACD: Isotipo. Juntos, estes dados mostram que, em um modelo de ACD, SR-RC-AB8 podem modular ferro sérico e quando dosados em combinação com EPO, SR-RC-AB8 podem apresentar um efeito ainda maior do que EPO sozinho na modulação de Hgb.

[00514]A Listagem de algumas sequências incluídas na presente divulgação é apresentada abaixo.

#### LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

| NOME                               | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | SEQ NO: | ID |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----|
| Isoforma RGMc humana a (NP_998818) | mgepgqspsp rsshgspttl stltlllllc ghahsqckil rcnaeyvsst lsrlgggssg alrggggggr gggvgsgglc ralrsyalct rrtartcrgd lafhsavhgi edlmiqhncs rggptapppp rgalpgags glpdpdpcdy egrfsrlhgr ppgflhcasf gdphvrsfhh hfhtcrvqga wplldndflf vqatsspmal ganatatrkl tiifknmqec idqkvyqaev dnlpvafedg singgdrpgg sslsiqtanp gnhveiqaay igttiiirqt agqlsfsikv aedvamaafa eqdlqlcvgg cppsqrslrs ernrrgaiti dtarrlckeg lpvedayfhs cvfdvllisd pnftvaaqaa ledaraflpd leklhlfpd agvplssatl lapllsglfv lwlcic | 1       |    |
| Isoforma RGMc humana b (NP_660320) | miqhncsrqg ptapppprgp alpgagsglp apdpdyeagr fsrlhgrppg flhcasfgdp hvrsfhhfhf tcrvqgawpl ldndflfvqa tsspmalgan atrkltii fknmqecidq kvyqaevdnlp pvafedgsin ggdrpggssl siqtanpgnh veiqaayigt tiiirqttagq lsfsikvaed vamaafaedq                                                                                                                                                                                                                                                        | 2       |    |

|                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                                          | lqlcvggcpp surlsrsern rrgaitidta rrlckeglpv<br>edayfhscvf dvlisgdpnf tvaqaaled araflpdlek<br>lhlfpsdagv plssatllap llsglflvwl ciq                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
| Isoforma RGMc<br>humana c<br>(NP_998817) | mqecidqkvy qaevdnlpva fedgsinggd rpggsslsiq<br>tanpgnhvei qaayigtii irqtagqlsf sikvaedvam<br>afsaedlql cvggcppsqr lsrsernrrg aitidtarrl<br>ckeglpveda yfhscvfdvl isgdpnftva aqaaledara<br>flpdleklhl fpsdagvpls satllaplls glfvlwlcic                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 3  |
| RGMA humana<br>(NP_001159755)            | mgglgprrag tsrerlvvtg ragwmgmrg agrsalgfw<br>tlaflscsf aatpckilk cnsefwsats gshapasddt<br>pefcaalrsy alctrtrart crgdlayhsa vhgiedlmsq<br>hncskdgpts qprlrtlppa gdsqersdsp eichyeksfh<br>khsatpnyth cglfgdphlr tftdrfqtck vqgawplidn<br>nylnvqvtnt pvlpgsaata tskltiifkn fgecvdqkvy<br>qaemdelppa fvdgsknggd khganslkit ekvsgqhvei<br>qakyigtiv vrqvgryltf avrmpeevvn avedwdsqgl<br>ylclrgcpln qqidfqafht naegtgarrrl aaaspaptap<br>etfpyetava kckeklpved lyyqacvfdl lttgdvnftl<br>aayyaedvk mlhsnkdklh lyertrdlpg raaaglplap<br>rpllgalvpl lallpvfc                  | 4  |
| RGMB humana<br>(NP_001012779)            | mirkkrksa ppgpcrshgp rpatapapp speptrpawt<br>gmglraapss aaaaaaeveq rrspglcphp lellllllfs<br>lgllhagdcq qpaqcriqkc ttdfvsiltsh lnsavdgfds<br>efckalraya gctqrtskac rgnlvysav lgisdlsqr<br>ncskdgptss tnpevthdpc nyhshagare hrrgdqnpss<br>ylfcglfgdp hlrtfkdnfq tckvegawpl idnnylsqv<br>tnvpvpgss atatkittii fkahhctdq kvyqavtddl<br>paafvdgtts gdsdaksr iveresghyv emharyigt<br>vfvrqvgryl tlaimpedl amsyeesqdl qlcvngcpls<br>eriddgqqqv sailghslpr tslvqawpgy tletantqch<br>ekmpvkdiyf qscvfdlltt gdanftaaah saledvealh<br>prkerwhifp ssgngtprgg sdlsvslglt clilivfl | 5  |
| SR-RC-AB1<br>CDR-H1                      | GTFSSYSIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 6  |
| SR-RC-AB1<br>CDR-H2                      | GIIPIFGVASYAQKFQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7  |
| SR-RC-AB1<br>CDR-H3                      | ARGAIAATYGLGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 8  |
| SR-RC-AB1<br>CDR-L1                      | QASQDISNYLN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 9  |
| SR-RC-AB1<br>CDR-L2                      | DASNLET                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10 |
| SR-RC-AB1<br>CDR-L3                      | QQLVDLPPT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 11 |
| SR-RC-AB1<br>Cadeia pesada<br>variável   | QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYSISWVRQA<br>PGQGLEWMGG IIPIFGVASY AQKFQGRVTI TADESTSTAY<br>MELSSLRSED TAVYYCARGA IAATYGLGMD VWGQGTTVT<br>SS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 12 |
| SR-RC-AB1<br>Cadeia leve<br>variável     | DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQK<br>PKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFGSGSGTD FTFTISLQP<br>EDIATYYCQQ LVDLPPTFGG GTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 13 |
| SR-RC-AB3<br>CDR-H1                      | GTFSSY AIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 14 |
| SR-RC-AB3<br>CDR-H2                      | GIIPIFGTANYAQKFQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 15 |

|                                        |                                                                                                                                                 |    |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SR-RC-AB3<br>CDR-H3                    | ARGAIAATYGLGMDV                                                                                                                                 | 16 |
| SR-RC-AB3<br>CDR-L1                    | QASQDISNYLN                                                                                                                                     | 17 |
| SR-RC-AB3<br>CDR-L2                    | DASNLET                                                                                                                                         | 18 |
| SR-RC-AB3<br>CDR-L3                    | QQLVDLPPT                                                                                                                                       | 19 |
| SR-RC-AB3<br>Cadeia pesada<br>variável | QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA<br>PGQGLEWMGG IIPIFGTANY AQKFQGRVTI TADESTSTAY<br>MELSSLRSED TAVYYCARGA IAATYGLGMD VWGQGTTTVT<br>SS | 20 |
| SR-RC-AB3<br>Cadeia leve<br>variável   | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIY DASNLETGVP SRFSGSGSGT DFTFTISLQ<br>PEDIATYYCQ QLVDLPPTFG GGTKVEIK                      | 21 |
| SR-RC-AB7<br>CDR-H1                    | GTFSSYAIQ                                                                                                                                       | 22 |
| SR-RC-AB7<br>CDR-H2                    | GIIPIFGVASYAQKFQG                                                                                                                               | 23 |
| SR-RC-AB7<br>CDR-H3                    | ARGAIVATYGLGMDV                                                                                                                                 | 24 |
| SR-RC-AB7<br>CDR-L1                    | QASQDISNYLN                                                                                                                                     | 25 |
| SR-RC-AB7<br>CDR-L2                    | DASNLET                                                                                                                                         | 26 |
| SR-RC-AB7<br>CDR-L3                    | QQLVDLPPT                                                                                                                                       | 27 |
| SR-RC-AB7<br>Cadeia pesada<br>variável | QVQLVQSGAE VKKPGSSVRV SCKASGGTFS SYAIQWVRQA<br>PGQGLEWMGG IIPIFGVASY AQKFQGRVTI TADESTSTAY<br>MELSSLRSED TAVYYCARGA IVATYGLGMD VWGQGTTTVT<br>SS | 28 |
| SR-RC-AB7<br>Cadeia leve<br>variável   | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQK<br>GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP<br>EDIATYYCQQ LVDLPPTFGG GTKVEIK                       | 29 |
| SR-RC-AB8<br>CDR-H1                    | GTFRSYSIS                                                                                                                                       | 30 |
| SR-RC-AB8<br>CDR-H2                    | GIIPIFGVANYAQKFQG                                                                                                                               | 31 |
| SR-RC-AB8<br>CDR-H3                    | ARGAYEATYGLGMDV                                                                                                                                 | 32 |
| SR-RC-AB8<br>CDR-L1                    | QASQDISNYLN                                                                                                                                     | 33 |
| SR-RC-AB8<br>CDR-L2                    | DASNLET                                                                                                                                         | 34 |
| SR-RC-AB8<br>CDR-L3                    | QQLVDLPPT                                                                                                                                       | 35 |
| SR-RC-AB8<br>Cadeia pesada<br>variável | QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFR SYSISWVRQA<br>PGQGLEWMGG IIPIFGVANY AQKFQGRVTI TADESTSTAY<br>MELSSLRSED TAVYYCARGA YEATYGLGMD VWGQGTTTVT<br>SS | 36 |
| SR-RC-AB8<br>Cadeia leve<br>variável   | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQK<br>GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP<br>EDIATYYCQQ LVDLPPTFGG GTKVEIK                       | 37 |
| SR-RC-AB9<br>CDR-H1                    | GTFSSYSIQ                                                                                                                                       | 38 |
| SR-RC-AB9<br>CDR-H2                    | GIIPIFGVASYAQKFQG                                                                                                                               | 39 |

|                                        |                                                                                                                                                 |    |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SR-RC-AB9<br>CDR-H3                    | ARGAIAATYGLGMDV                                                                                                                                 | 40 |
| SR-RC-AB9<br>CDR-L1                    | QASQDISNYLN                                                                                                                                     | 41 |
| SR-RC-AB9<br>CDR-L2                    | DASNLET                                                                                                                                         | 42 |
| SR-RC-AB9<br>CDR-L3                    | QQLVDLPPT                                                                                                                                       | 43 |
| SR-RC-AB9<br>Cadeia pesada<br>variável | QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYSIQWVRQA<br>PGQGLEWMGG IIPIFGVASY AQKFQGRVTI TADESTSTAY<br>MELSSLRSED TAVYYCARGA IAATYGLGMD VWGQGTTVTV<br>SS | 44 |
| SR-RC-AB9<br>Cadeia leve<br>variável   | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP<br>GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP<br>EDIATYYCQQ LVDLPPTFGG GTKVEIK                      | 45 |
| região de<br>ligação<br>RGMcA          | YVSSTLSL                                                                                                                                        | 46 |
| região de<br>ligação<br>RGMcB          | FHSAVHGIEDL                                                                                                                                     | 47 |
| Sequência<br>dobradiça tipo<br>IgG1    | CPPCP                                                                                                                                           | 48 |

**REIVINDICAÇÕES EMENDADAS**

1. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender um anticorpo isolado que seletivamente se liga à molécula de orientação repulsiva humana C (RGMc), em que o anticorpo é um anticorpo completamente humano ou humanizado, e um carreador farmacêuticamente aceitável, em que:

a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo;

b) o anticorpo não se liga à molécula de orientação repulsiva humana A (RGMa) e à molécula de orientação repulsiva humana B (RGMb); e

c) o anticorpo inibe ou reduz interação de RGMc com BMP6.

2. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender um anticorpo isolado que se liga a um epítopo dentro da RGMc humana, em que o anticorpo é um anticorpo completamente humano ou humanizado, e um carreador farmacêuticamente aceitável, em que:

a) o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; e

b) o anticorpo se liga a um epítopo compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e/ou pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47), em que, opcionalmente, o epítopo compreende pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47).

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo compreende sequências de H-CDR1, H-CDR2, e H-CDR3

como especificadas em SEQ ID NOs: 30, 31, e 32, respectivamente, e sequências de L- CDR1, L-CDR2, e L-CDR3 como especificadas em SEQ ID Nos: 33, 34, e 35, respectivamente; em que opcionalmente:

o resíduo R em posição 4 da H-CDR1 é substituído com um K ou S; o resíduo S em posição 5 da H-CDR1 é substituído com um T; o resíduo S em posição 7 da H-CDR1 é substituído com um A; e/ou o resíduo S em posição 9 da H-CDR1 é substituído com um Q;

em que ainda opcionalmente:

o resíduo V em posição 8 da H-CDR2 é substituído com um H ou T; e/ou o resíduo N em posição 10 da H-CDR2 é substituído com um S, T ou E.

4. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 36; e/ou

b) uma região variável de cadeia leve variável tendo uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 37.

em que, opcionalmente, o anticorpo compreende:

a) uma sequência de região variável de cadeia pesada como especificada em SEQ ID NO: 36; e

b) uma sequência de região variável de cadeia leve como especificada em SEQ ID NO: 37.

5. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo de IgG1, IgG2 ou IgG4 humano,

em que, opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo de IgG4 humano, em que, ainda opcionalmente, o anticorpo de IgG4 humano compreende uma substituição da cadeia principal de Ser para Pro que produz uma dobradiça tipo IgG1.

6. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo se liga a RGMc com um valor de  $K_D$  de menos do que  $0,1 \times 10^{-9}$  (0,1 nM), em que, opcionalmente, o anticorpo induz internalização de um complexo anticorpo-antígeno.

7. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende um anticorpo isolado que seletivamente se liga a RGMc humana, em que o anticorpo é um anticorpo completamente humano ou humanizado, em que o anticorpo compete (por exemplo, compete cruzado) para ligação a RGMc humana com, e/ou se liga ao mesmo epítipo como, um anticorpo que se liga a um epítipo compreendendo pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e/ou pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47), em que, opcionalmente, o epítipo compreende pelo menos um resíduo de aminoácido de YVSSTLSL (SEQ ID NO: 46) e pelo menos um resíduo de aminoácido de FHSVHGIEDL (SEQ ID NO: 47), em que o anticorpo é um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, **caracterizada** pelo fato de ser para uso em um método para o tratamento de anemia em um indivíduo humano, em que o tratamento compreende administração da composição ao indivíduo em uma quantidade eficaz para tratar a anemia,

em que, opcionalmente, a anemia é anemia por deficiência

de ferro refratária ao ferro (IRIDA) ou anemia de doença crônica (ACD).

9. Composição farmacêutica para uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a anemia é uma anemia relacionada com câncer ou uma anemia induzida por quimioterapia.

10. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a ACD é anemia de doença renal crônica (CKD), em que, opcionalmente, o indivíduo é dependente de diálise ou não dependente de diálise.

11. Composição farmacêutica para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-10, **caracterizada** pelo fato de que a composição é administrada em combinação com um agente terapêutico adicional, em que, opcionalmente, o agente terapêutico adicional é um agente estimulador de eritropoietina (ESA), estabilizador de HIF, suplemento de ferro ou transfusão.

12. Composição farmacêutica para uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o método reduz toxicidades associadas com ESAs, estabilizador de HIF, suplemento de ferro ou transfusão, em que, opcionalmente, as toxicidades incluem sobrecarga de ferro ou um risco de câncer.

13. Composição farmacêutica para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-12, **caracterizada** pelo fato de que o indivíduo está:

a) em terapia com ferro, mas se beneficia da dosagem reduzida da terapia com ferro;

b) recebeu a terapia com ferro, mas interrompeu devido a toxicidades;

c) recebeu a terapia com ferro e se beneficia com a dosagem reduzida da terapia com ferro;

d) está em risco de câncer; e/ou

e) foi diagnosticado com câncer.

14. Método para aumentar os níveis de ferro sérico em um indivíduo, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo da composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-7, em uma quantidade eficaz para i) aumentar níveis de ferro sérico no indivíduo; ii) para regular para baixo hepcidina no indivíduo; iii) reduzir os níveis de mRNA de hepcidina no fígado; iv) reduzir os níveis de proteína de hepcidina no fígado, níveis de proteína hepcidina sérica (circulantes), ou ambos; v) para aumentar saturação de transferrina no indivíduo; vi) aumentar eritropoiese no indivíduo; vii) diminuir capacidade de ligação de ferro insaturado no indivíduo; viii) diminuir capacidade de ligação de ferro total no indivíduo; e/ou ix) aumentar níveis de ferritina sérica no indivíduo, em que, opcionalmente, a quantidade é uma quantidade eficaz para alcançar os níveis de ferritina sérica de  $\geq 20$  nanogramas por mililitro de sangue.

15. Composição farmacêutica para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-13, ou o método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que o indivíduo recebeu uma terapia com eritropoietina (EPO/ESA), terapia com estabilizador HIF, suplementação de ferro IV, ou combinação das mesmas, em que, opcionalmente, o indivíduo manifestou ou está em risco de um evento adverso associado com a terapia EPO, terapia com estabilizador HIF ou a suplementação de ferro IV.

16. Método para produzir uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor seletivo de RGMc (por exemplo, anticorpo neutralizante), o método **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

i) identificar anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno quanto à capacidade para se ligar seletivamente a RGMc em vez de RGMa e RGMb, em que o anticorpo é um anticorpo completamente humano ou humanizado;

ii) identificar os anticorpos ou fragmento de ligação ao antígeno com base na etapa (i) quanto à capacidade de inibir/neutralizar a atividade RGMc *in vivo*;

iii) selecionar um anticorpo inibidor/ neutralizante com base nas etapas (i) e (ii) para formulação em uma composição farmacêutica, em que, opcionalmente, etapa (i) compreende uma seleção positiva e, opcionalmente, compreende adicionalmente uma seleção negativa.

17. Método de acordo com qualquer uma de reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de identificação (i) compreende triagem de uma biblioteca, em que, opcionalmente, a biblioteca é uma biblioteca de fagos ou uma biblioteca de leveduras; em que, opcionalmente, a etapa de identificação (ii) compreende medir um parâmetro de ferro selecionado do grupo consistindo em: ferro sérico, capacidade de ligação de ferro total (TIBC), capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC), e saturação de transferrina, em que, ainda opcionalmente, etapa (ii) compreende medir expressão de hepcidina, em que, opcionalmente, a expressão de hepcidina são níveis de hepcidina no fígado e/ou níveis de hepcidina sérica, em que, ainda opcionalmente, etapa (ii) compreende identificação de

anticorpos neutralizantes ou fragmentos de ligação ao antígeno capazes de elevar níveis de ferro sérico e/ou suprimir expressão de hepcidina *in vivo*, em que, ainda opcionalmente, a composição farmacêutica é formulada para administração intravenosa ou subcutânea, em que, ainda opcionalmente, etapa (i) compreende confirmação seletivamente para RGMc em vez de RGMa e RGMb.

18. Inibidor seletivo de RGMc para uso em um método para tratamento de distúrbio de ferro em um indivíduo, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor seletivo de RGMc não inibe RGMa e RGMb, em que o inibidor seletivo de RGMc é um anticorpo de comprimento completo, completamente humano ou humanizado, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, e em que o distúrbio de ferro causa anemia no indivíduo.

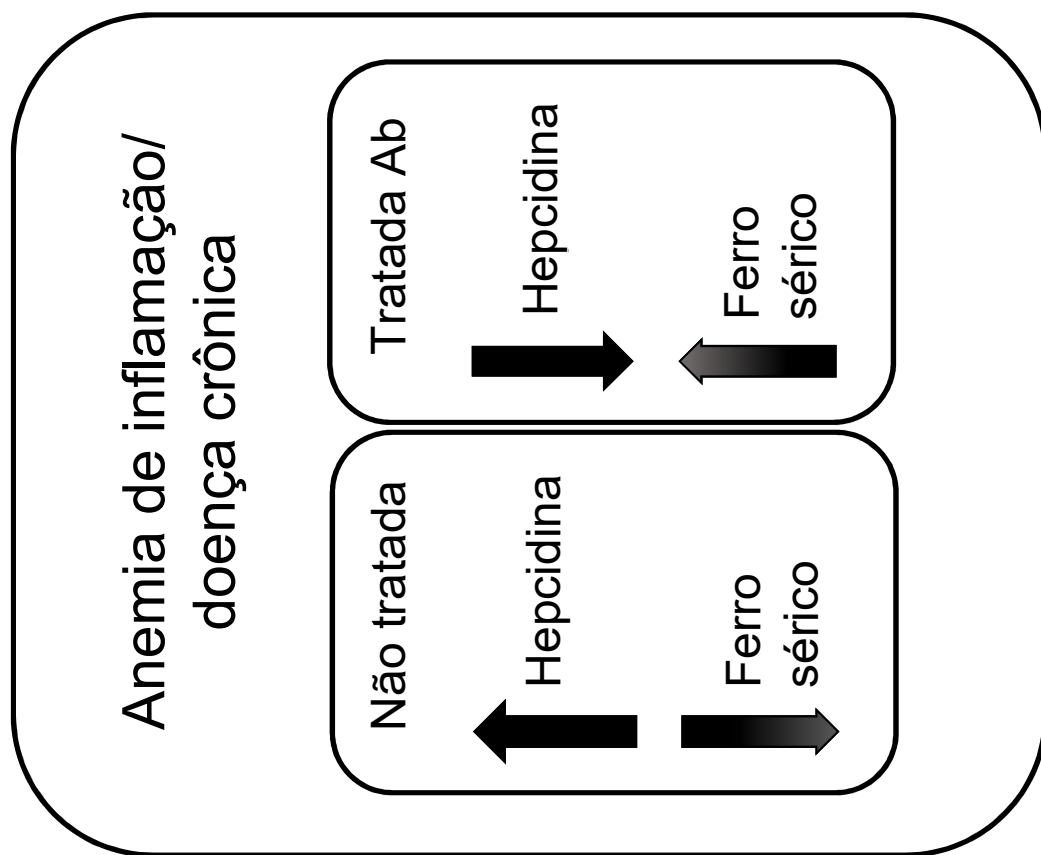
**FIG. 1**

FIG. 2

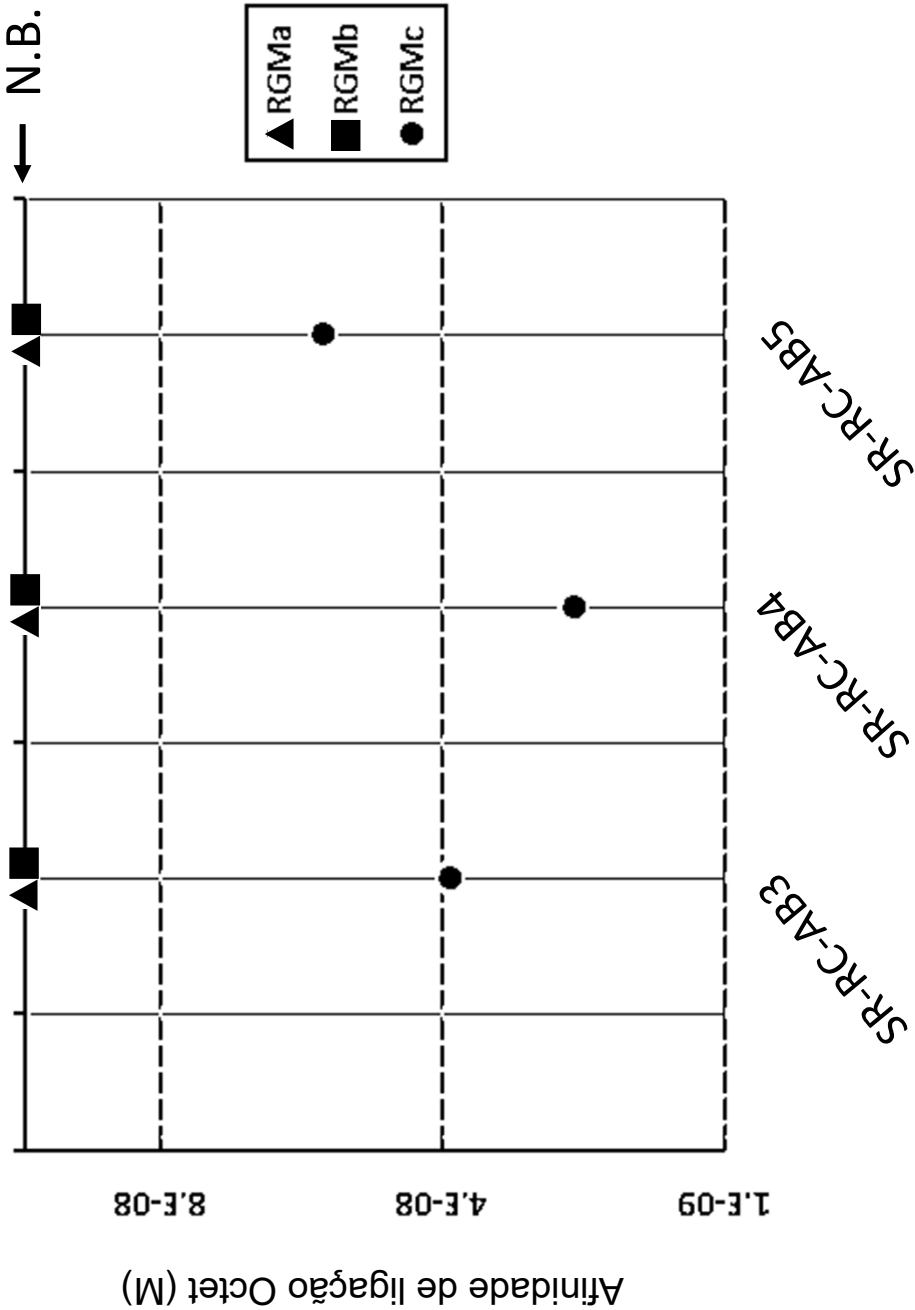


FIG. 3A

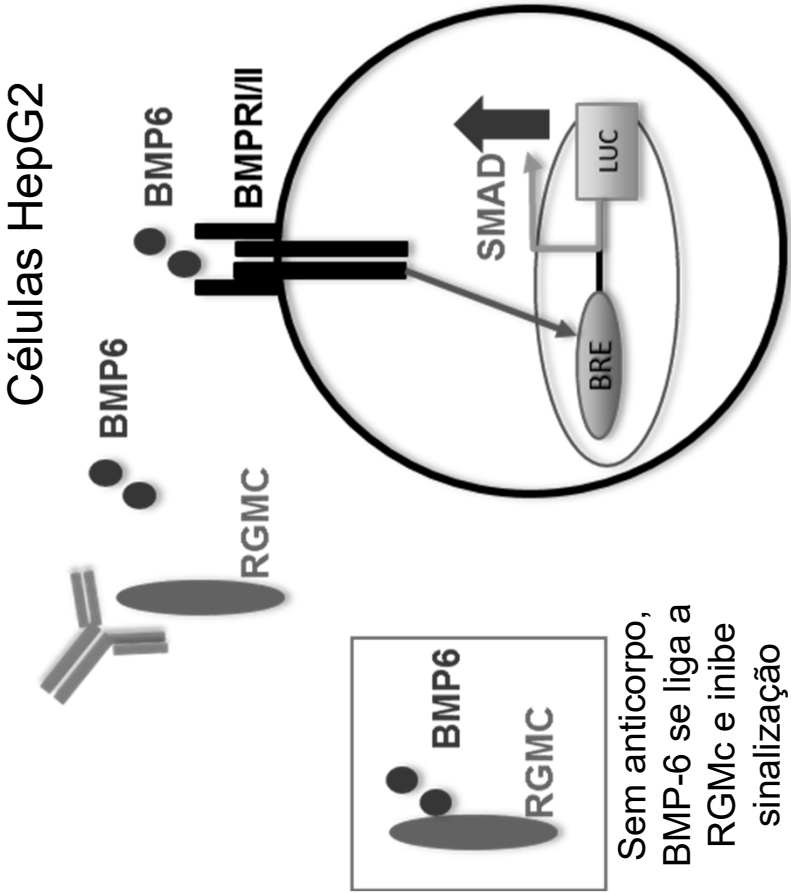


FIG. 3B

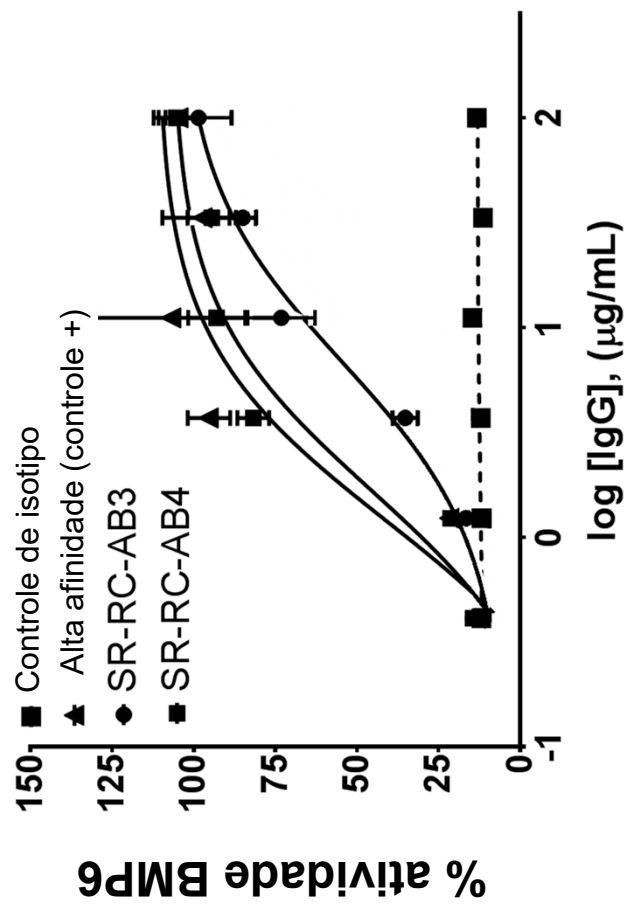


FIG. 4A

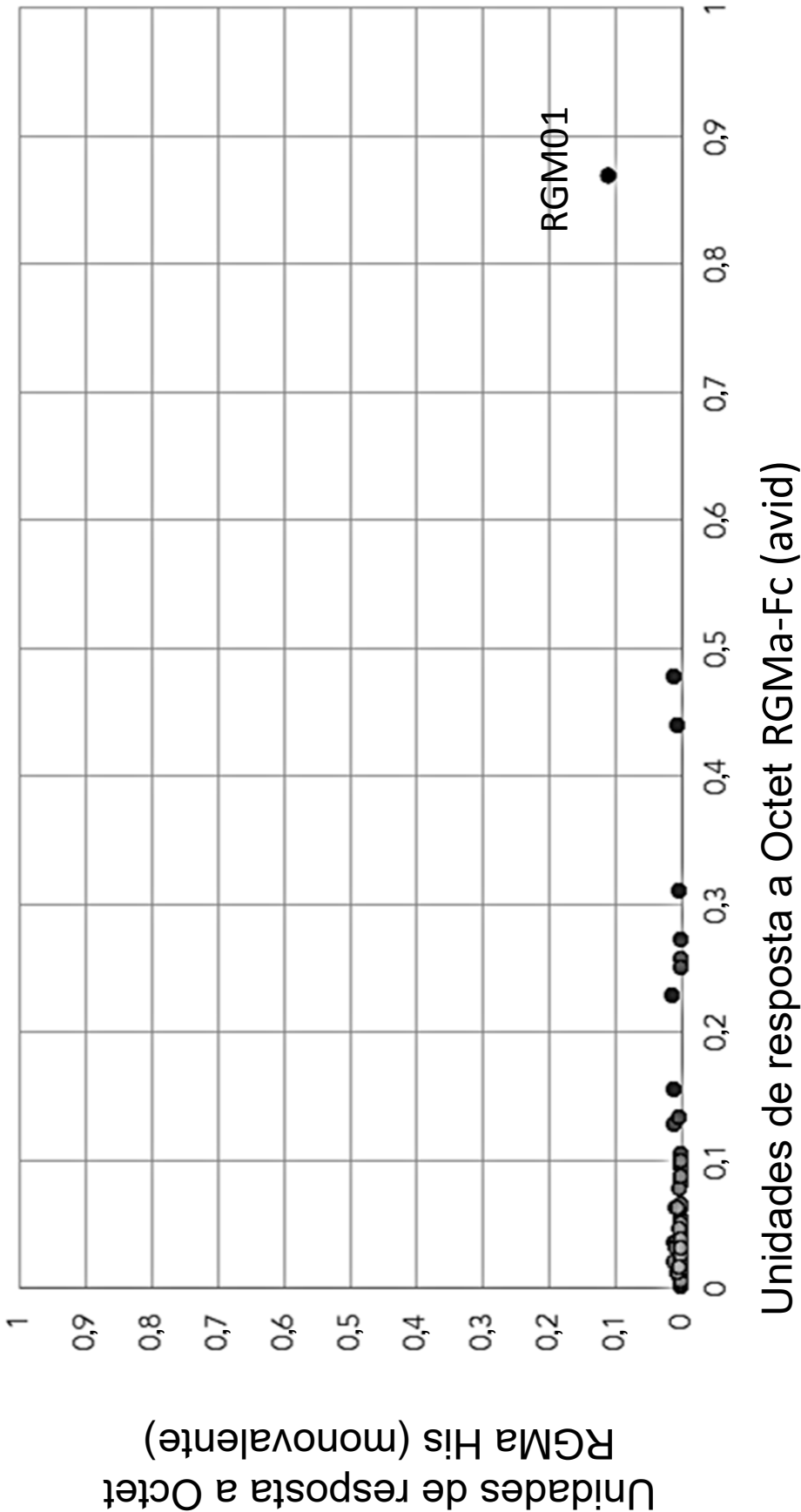


FIG. 4B

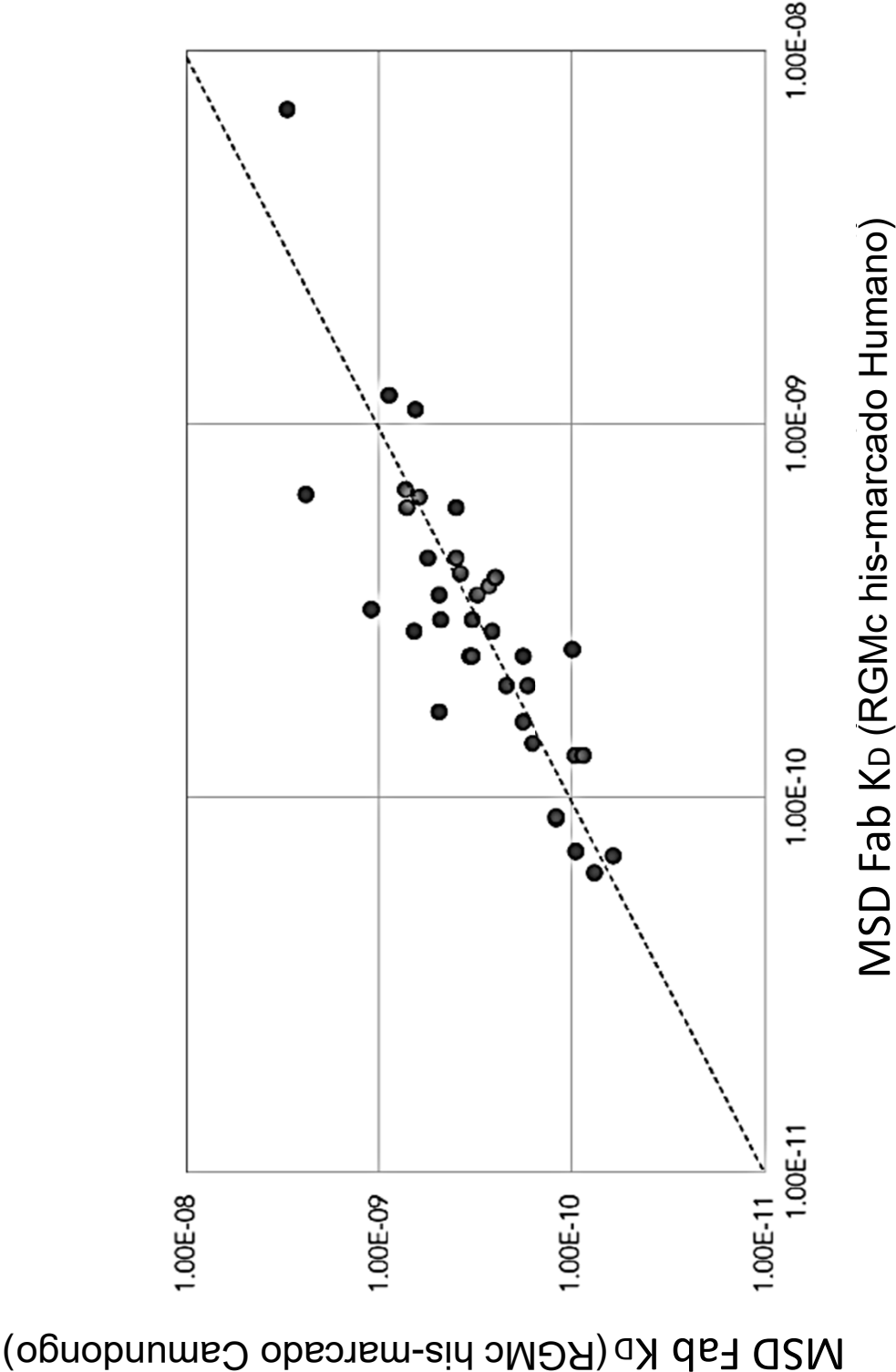


FIG. 5A

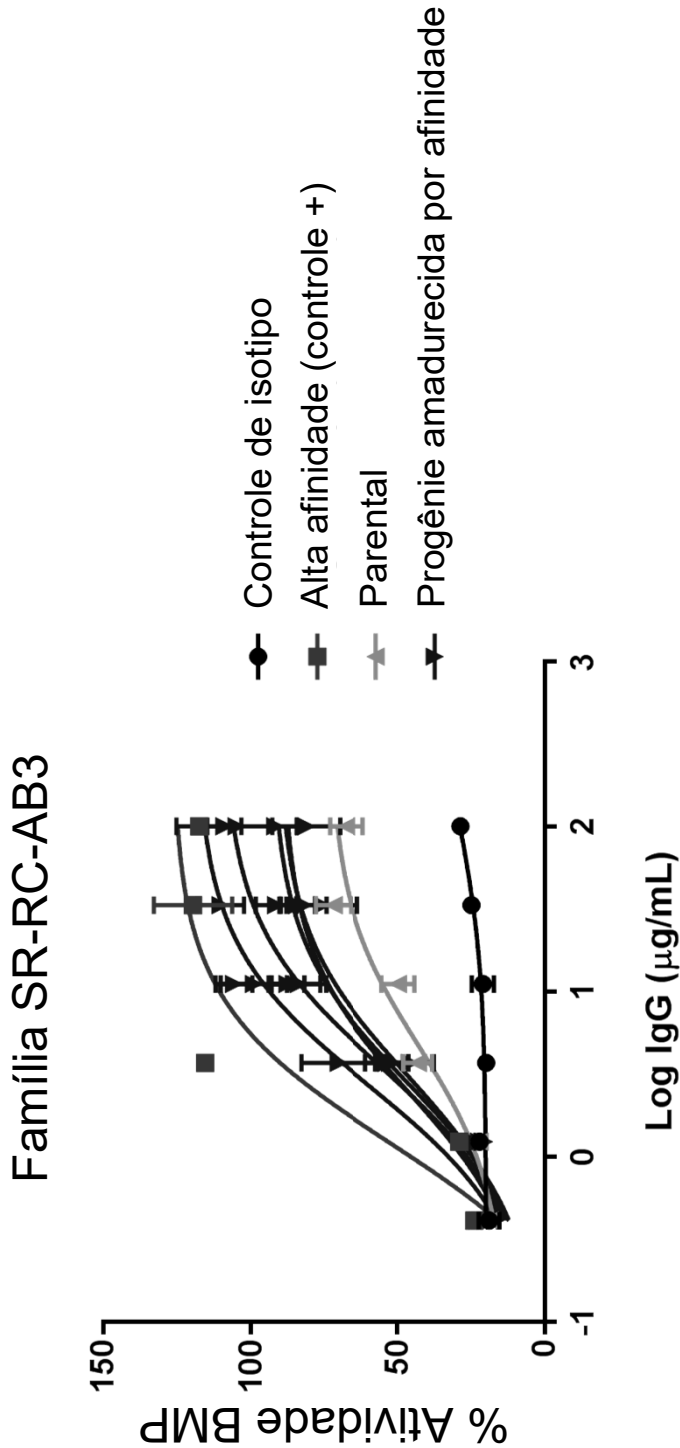


FIG. 5B

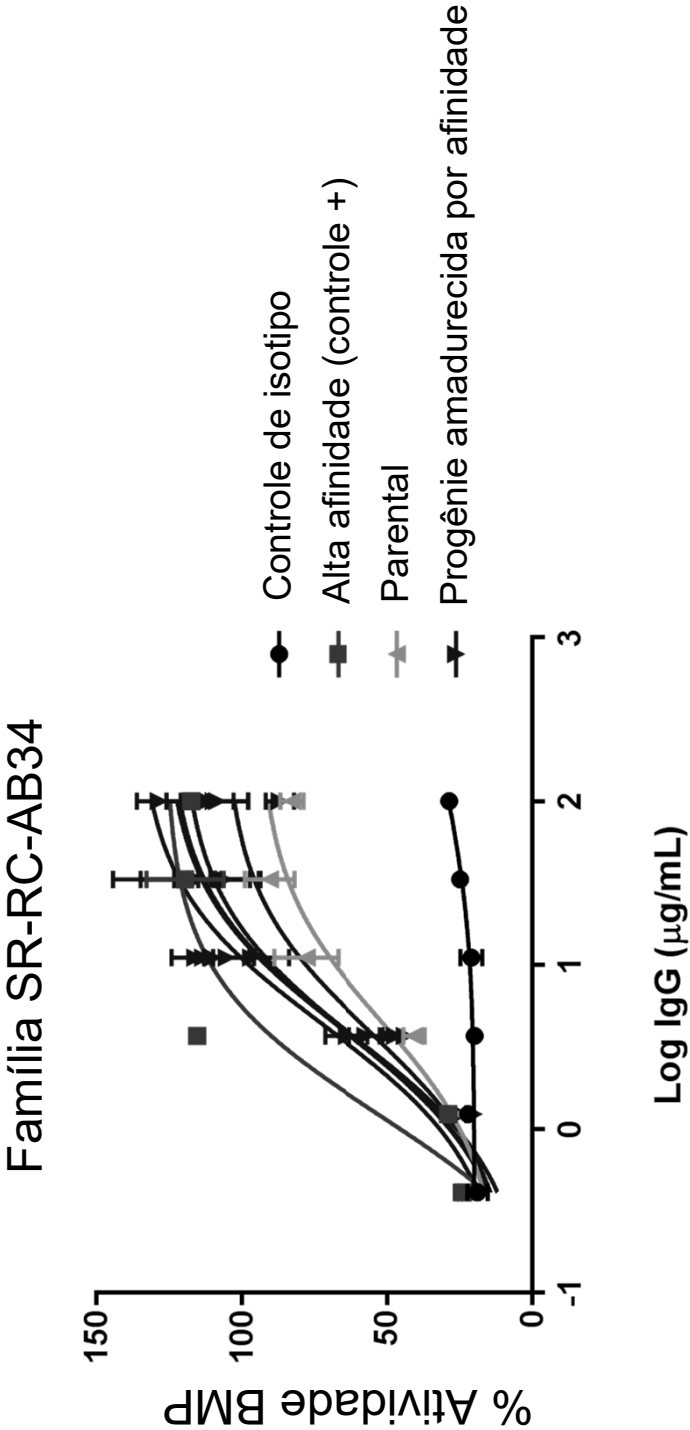


FIG. 6B

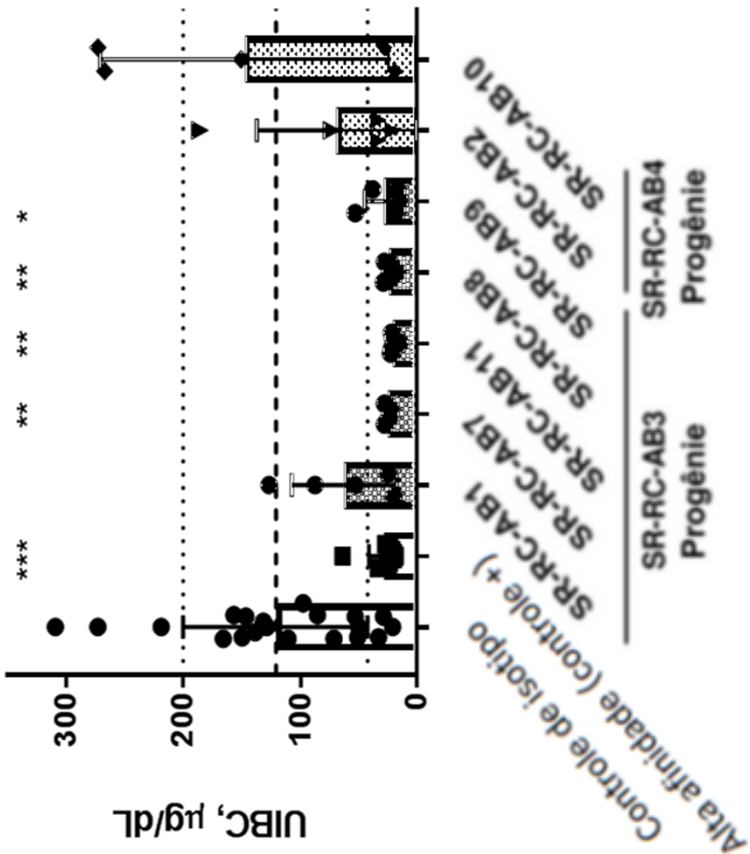


FIG. 6A

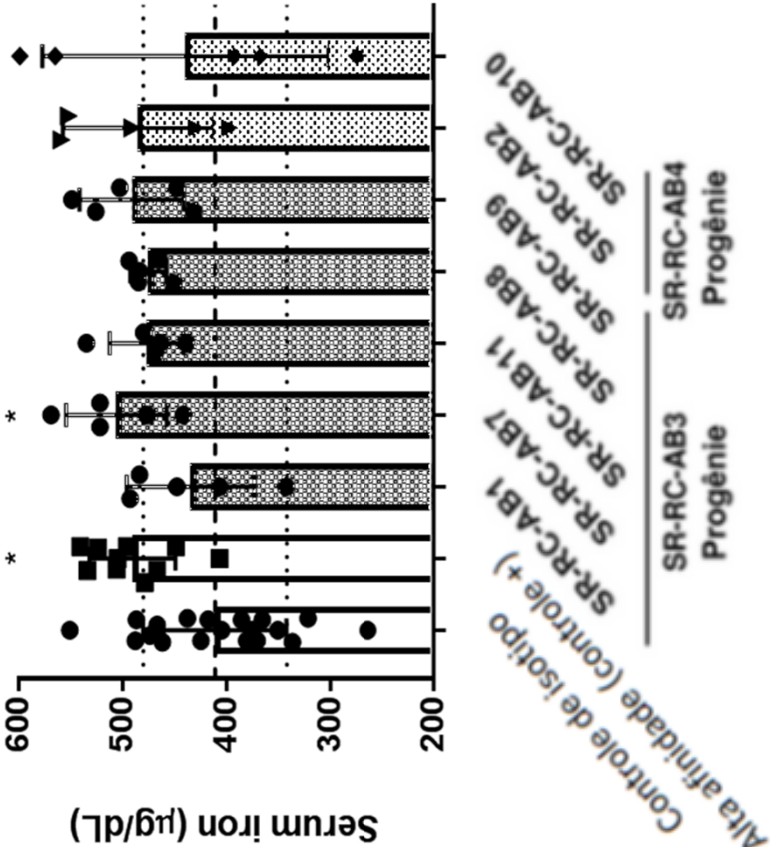


FIG. 7A

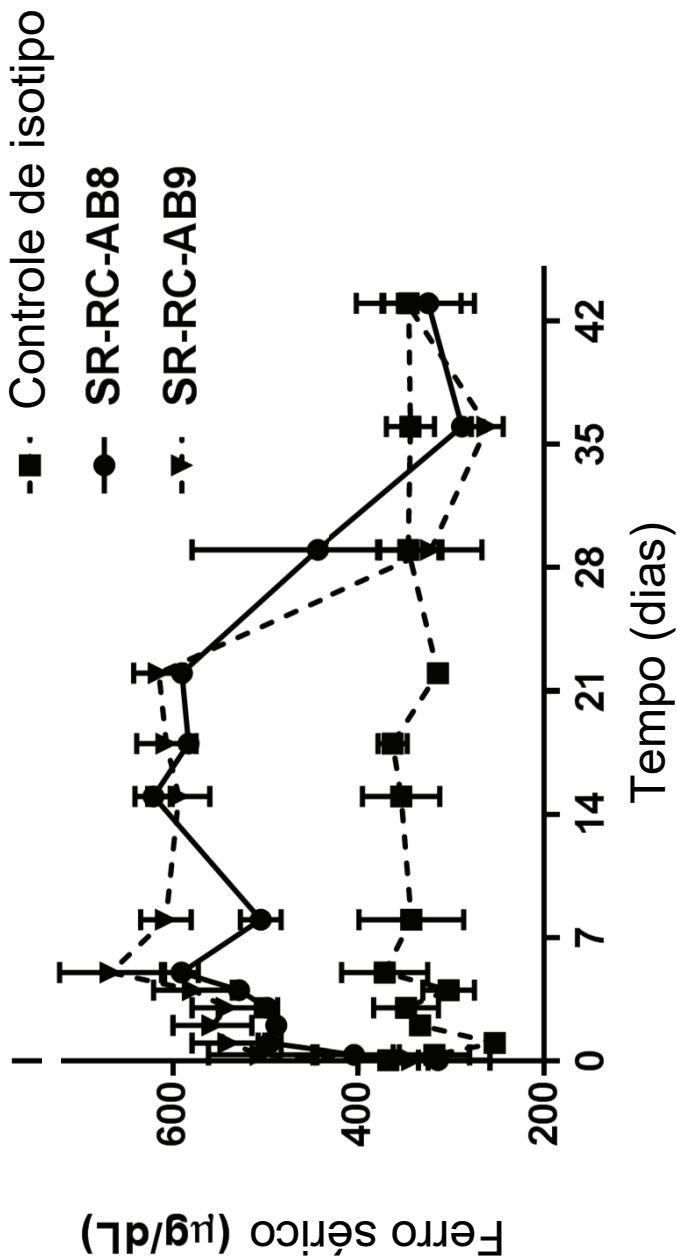


FIG. 7B

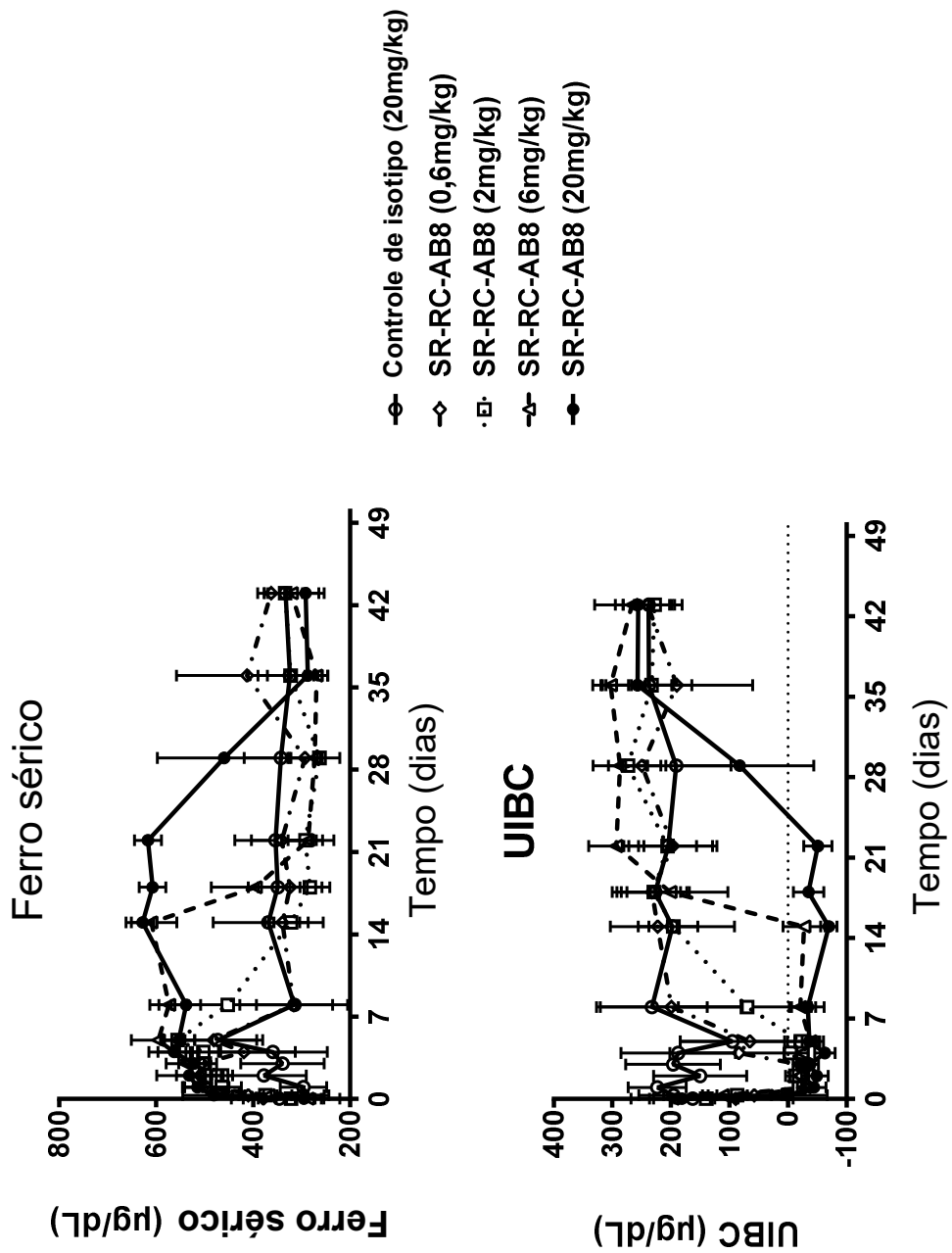


FIG. 7C

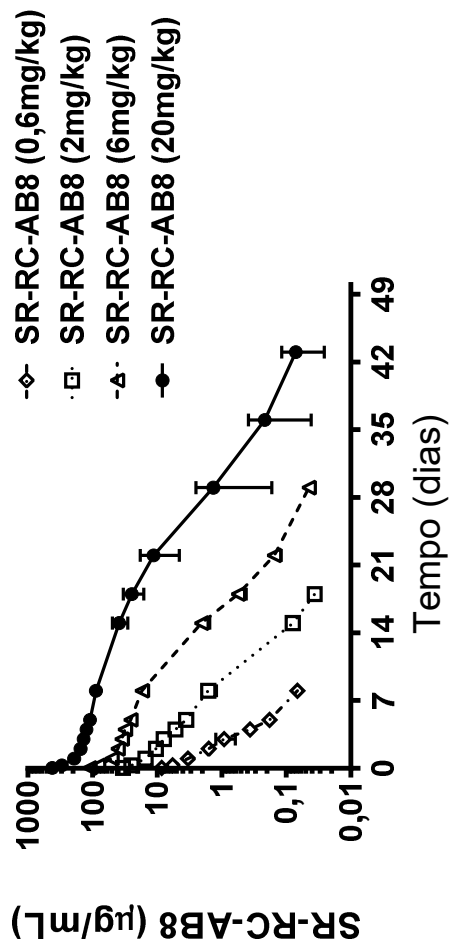


FIG. 7D

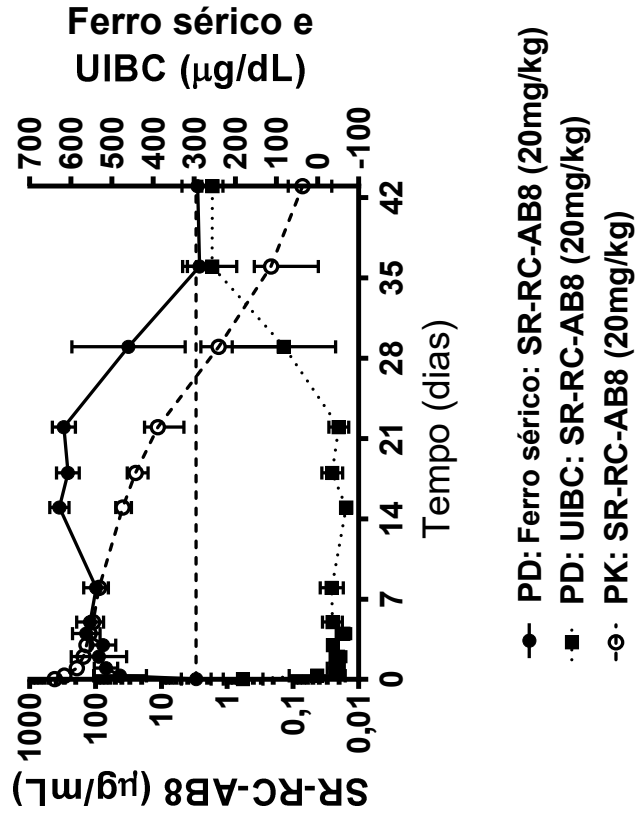


FIG. 8A

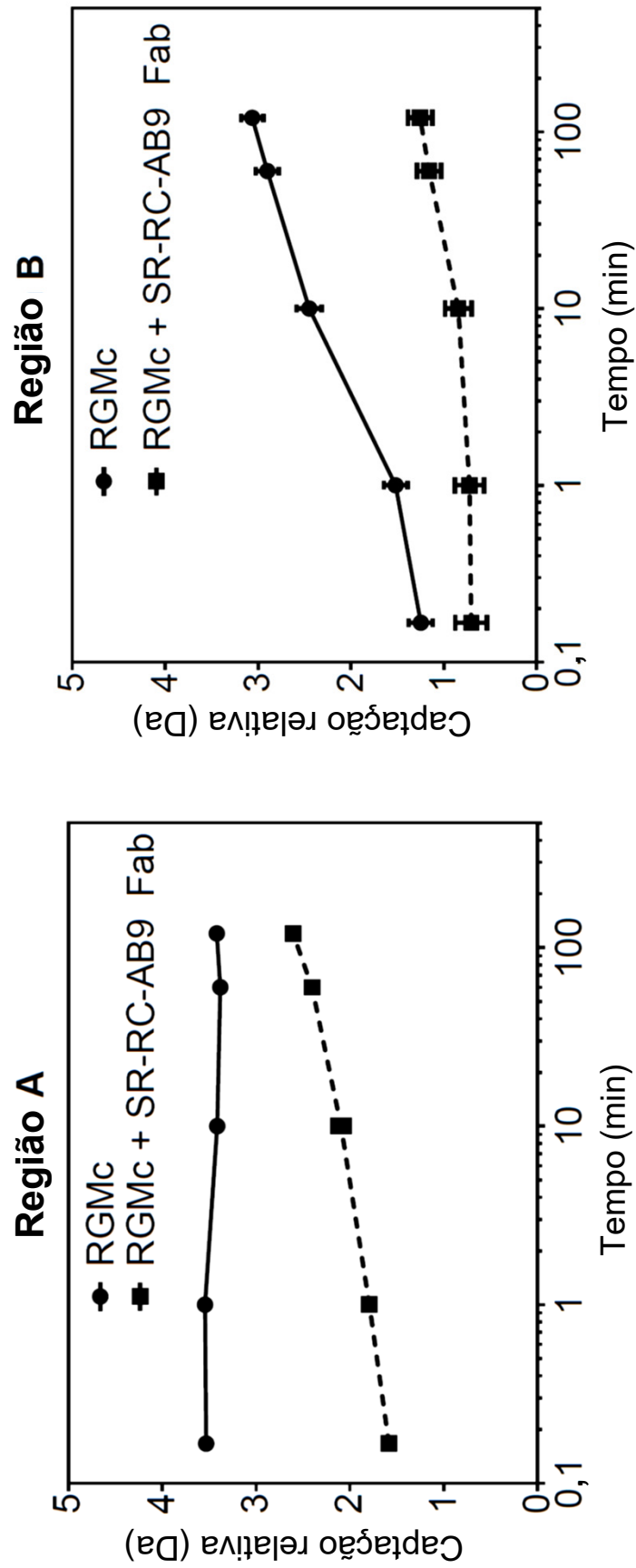


FIG. 8B

| <u>Região A</u> |                                                                                                                                                                                         | <u>Região B</u> |                                                                                                                                                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RGMC            | AEYVSS <sup>1</sup> TL <sup>2</sup> SL <sup>3</sup> RG <sup>4</sup> GS <sup>5</sup> GA <sup>6</sup> LR <sup>7</sup> GG <sup>8</sup> GG <sup>9</sup> GR <sup>10</sup> GG <sup>11</sup> V | RGMC            | LA <sup>1</sup> FA <sup>2</sup> SA <sup>3</sup> VH <sup>4</sup> GI <sup>5</sup> ED <sup>6</sup> LM <sup>7</sup> IQ <sup>8</sup> H               |
| RGMA            | SE <sup>1</sup> FW <sup>2</sup> SA <sup>3</sup> TS <sup>4</sup> GS <sup>5</sup> HA <sup>6</sup> PA <sup>7</sup> -----SD                                                                 | RGMA            | LA <sup>1</sup> YH <sup>2</sup> SA <sup>3</sup> VH <sup>4</sup> GI <sup>5</sup> ED <sup>6</sup> LM <sup>7</sup> SQ <sup>8</sup> H               |
| RGMB            | TD <sup>1</sup> FV <sup>2</sup> SL <sup>3</sup> TS <sup>4</sup> HL <sup>5</sup> NS <sup>6</sup> AV <sup>7</sup> -----DG                                                                 | RGMB            | LV <sup>1</sup> YH <sup>2</sup> SA <sup>3</sup> V <sup>4</sup> L <sup>5</sup> GI <sup>6</sup> SD <sup>7</sup> LM <sup>8</sup> SQ <sup>9</sup> R |
|                 | : : : * * *   . .                                                                                                                                                                       |                 | * . : * * * * * . * * * * :                                                                                                                     |

FIG. 8C

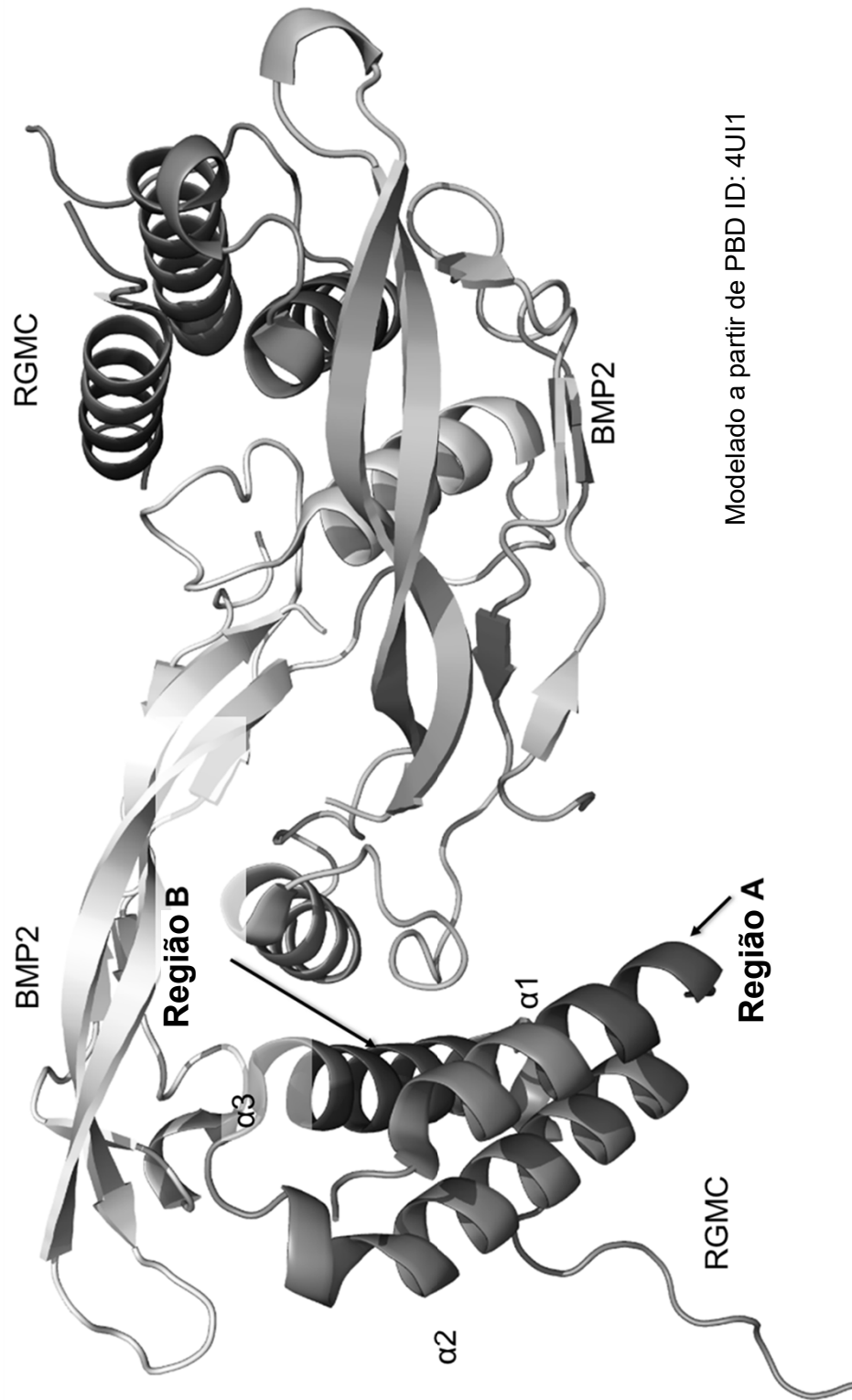




FIG. 8E

Mapeamento de epítipo SR-RC-AB9 Fab sobre o sítio de ligação de BMP2 indica determinantes estruturais potenciais de especificidade de RGMc

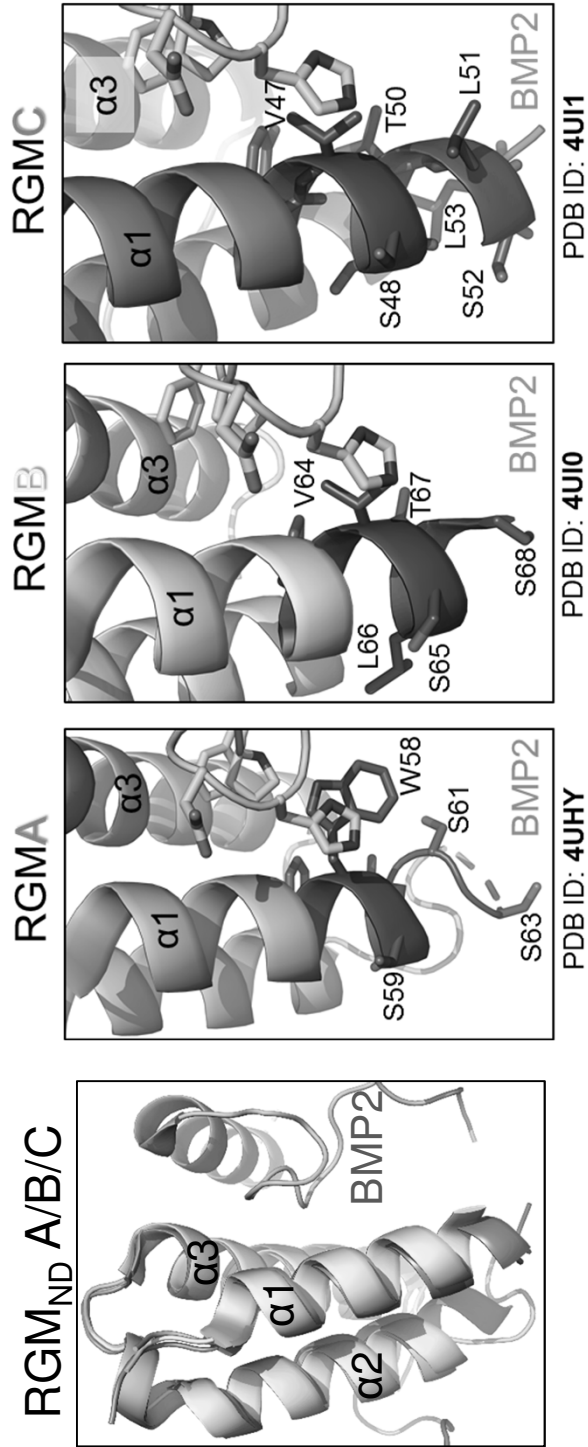
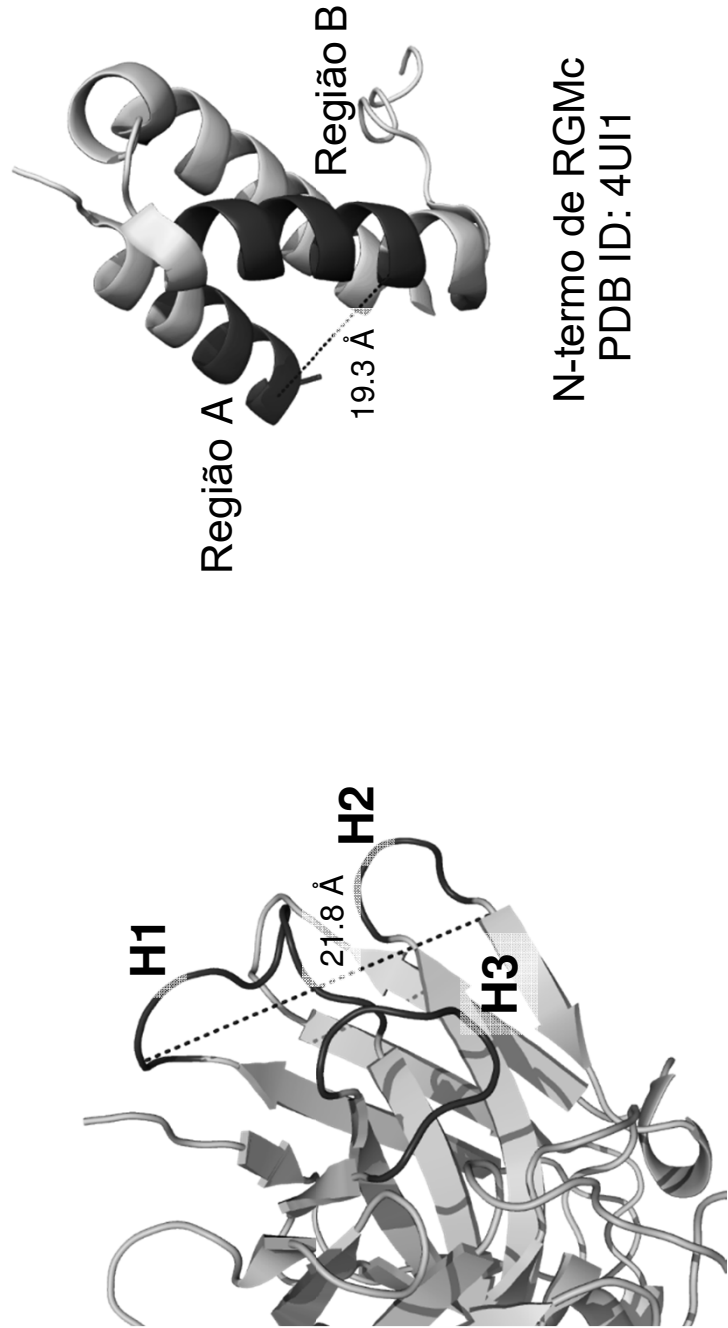


**FIG. 8F**

As CDRs (H1-H3) do anticorpo podem abranger a superfície de regiões A e B do domínio N-termo de RGMc



Estrutura Fab típica  
PDB ID: 4KV5

N-termo de RGMc  
PDB ID: 4UI1

FIG. 9A

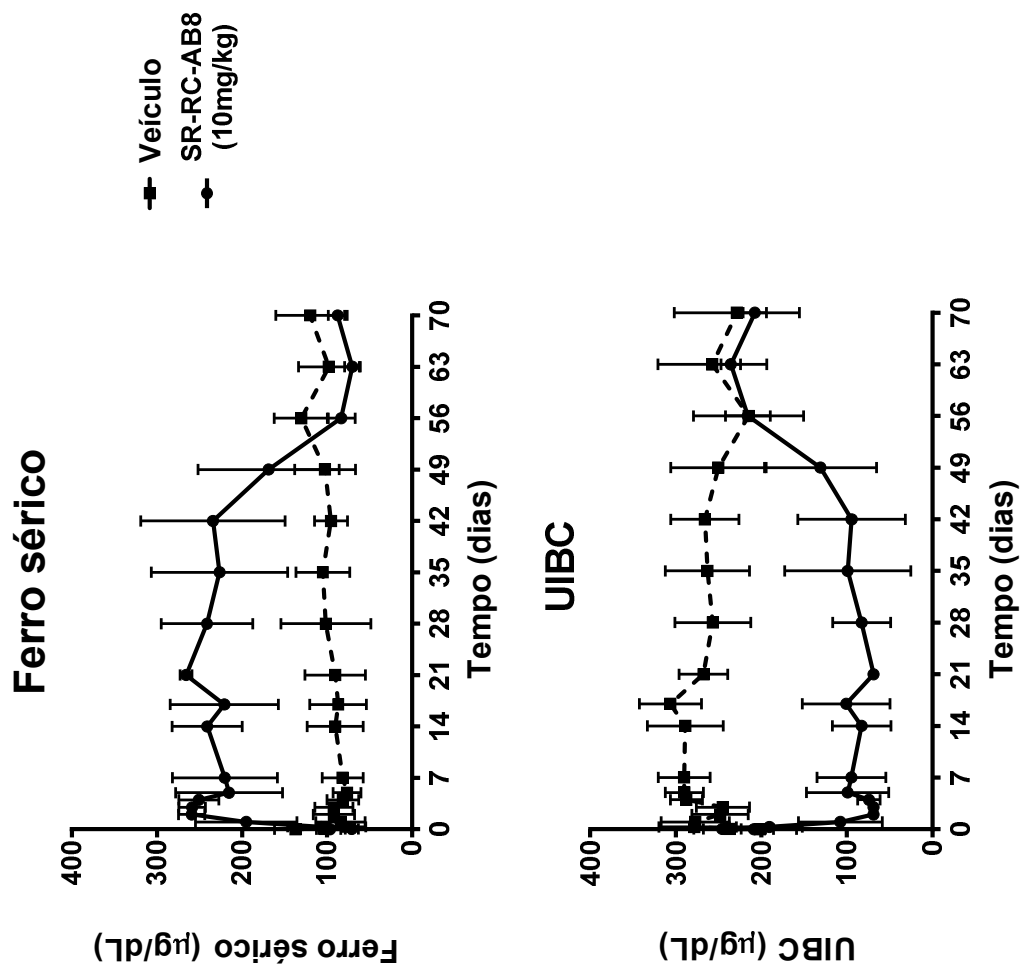


FIG. 9B

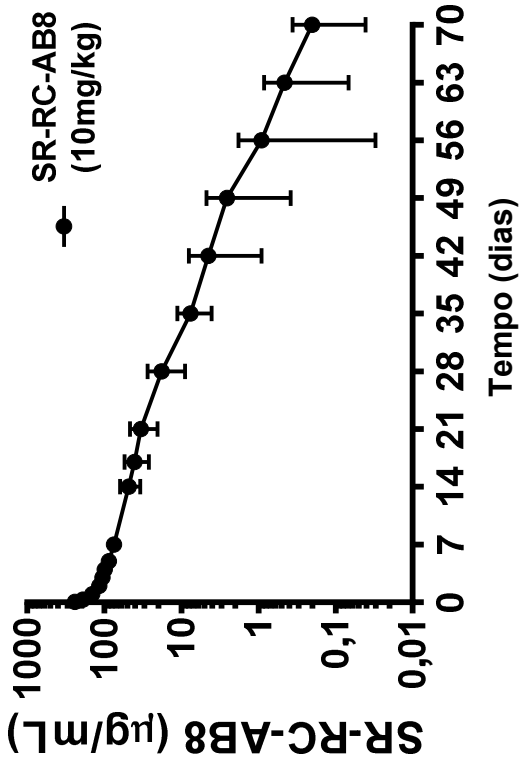


FIG. 9C

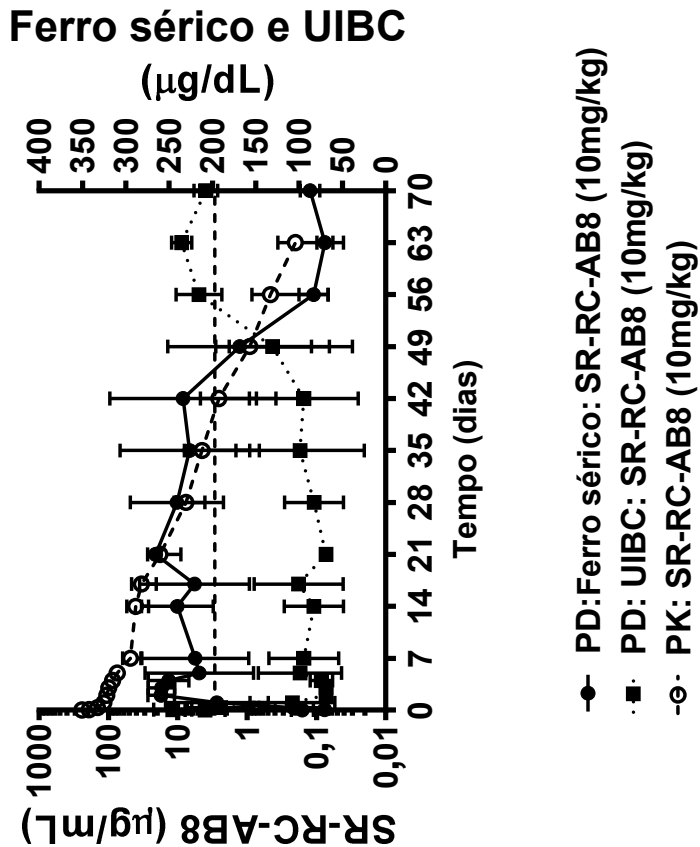


FIG. 10A

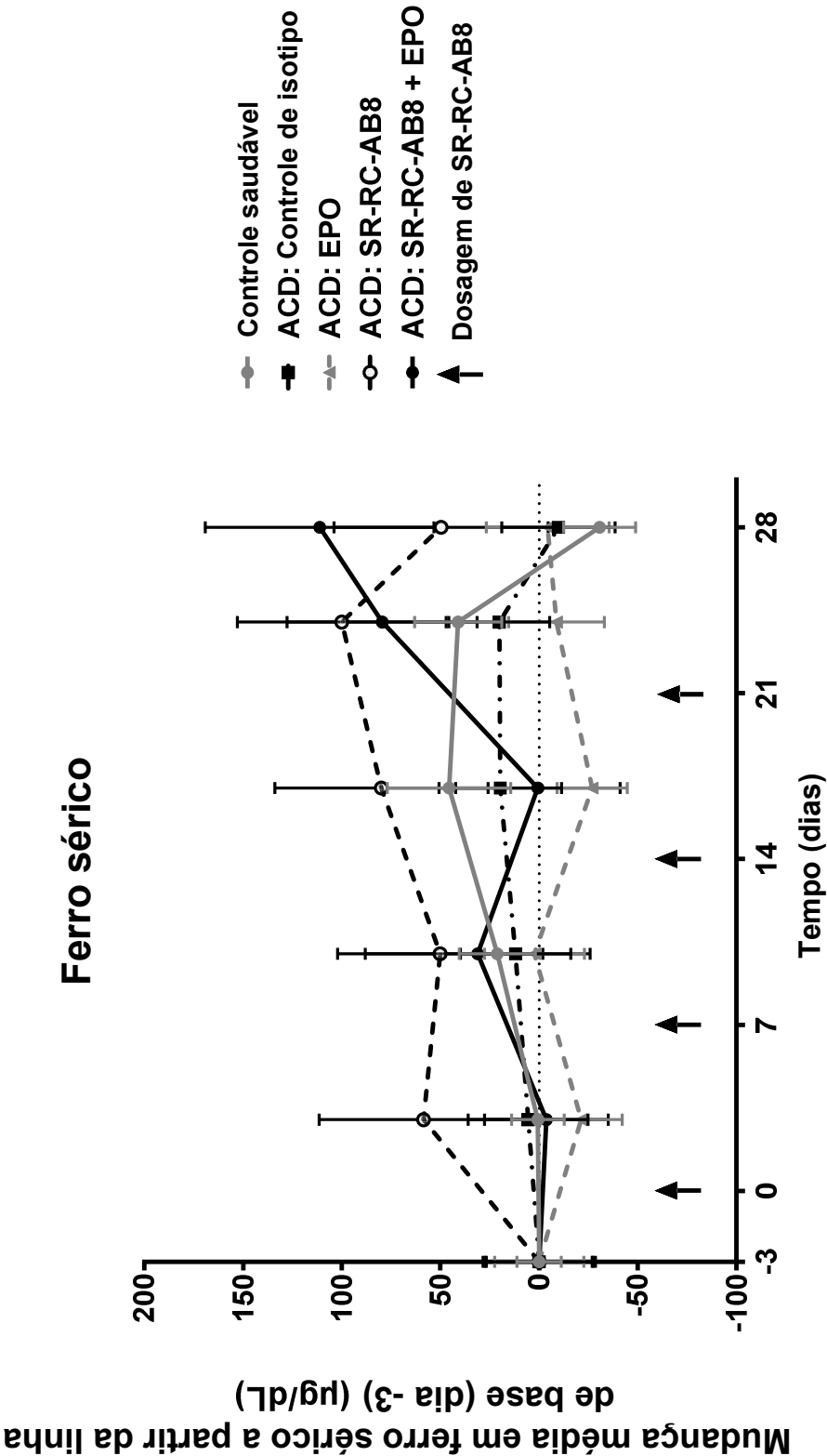


**FIG. 10B**  
**Ferro sérico Dia 24**

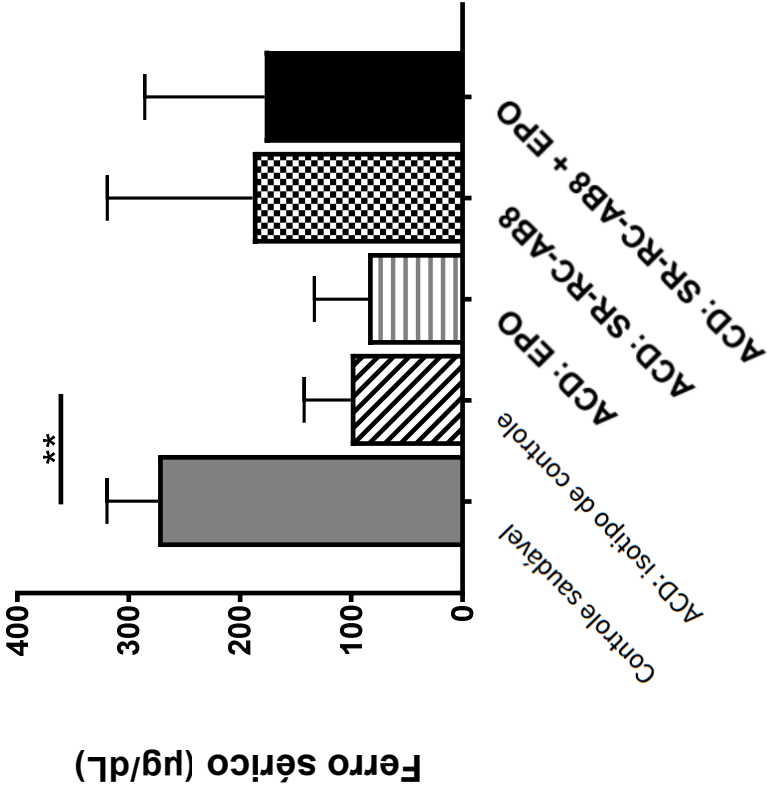


FIG. 10C

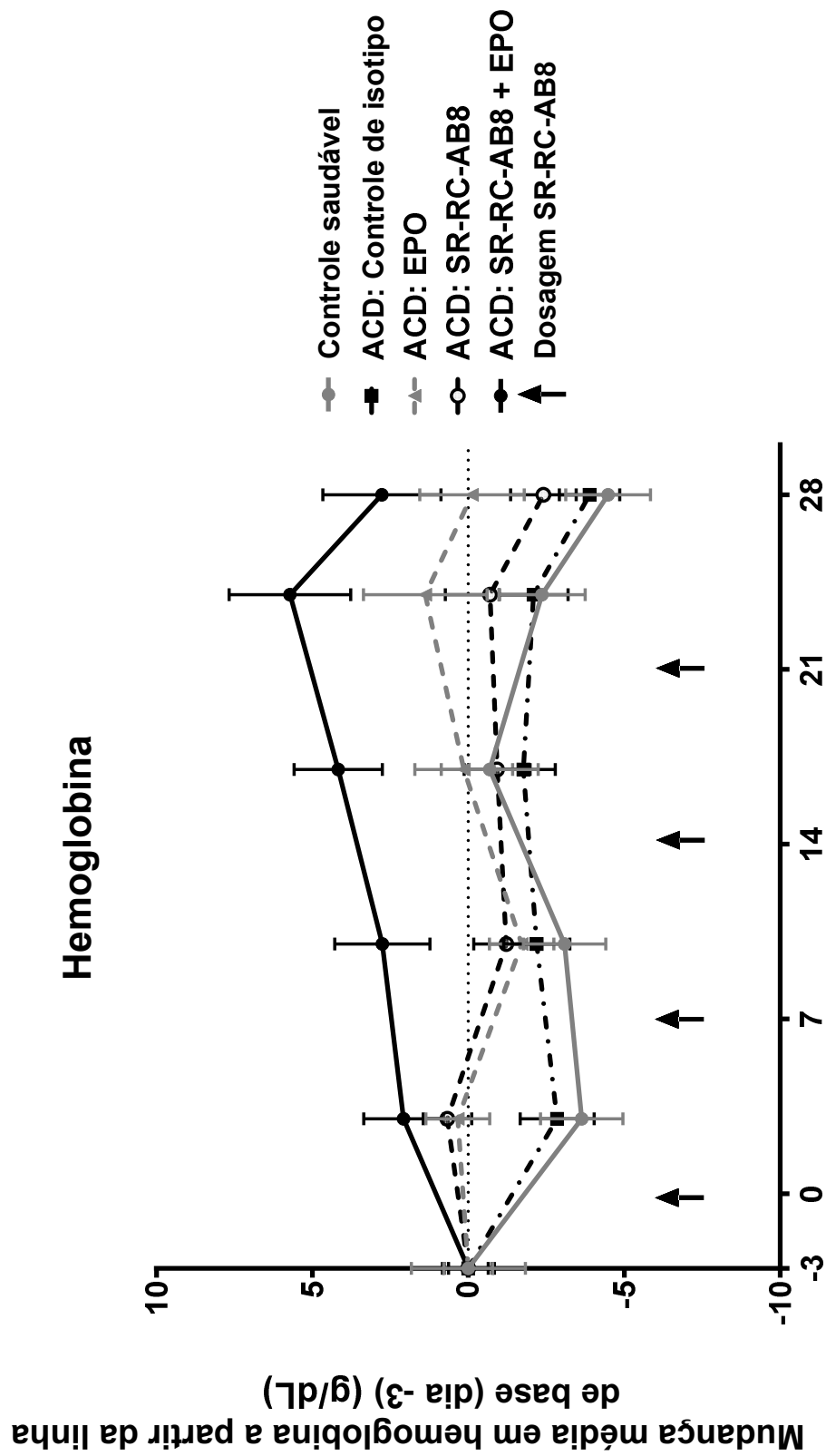
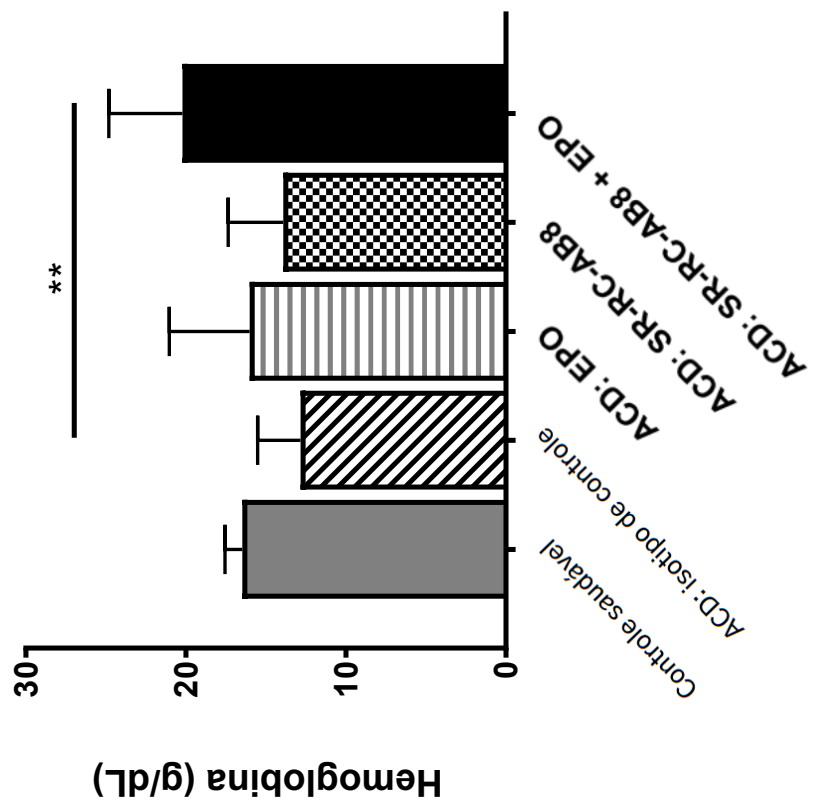


**FIG. 10D**  
Hemoglobina Dia 24



RESUMO

**INIBIDORES SELETIVOS DE RGMc E USO DOS MESMOS**

Inibidores seletivos de molécula de orientação repulsiva C (RGMc) são descritos. Os métodos relacionados, incluindo métodos para produção, assim como uso terapêutico desses inibidores no tratamento de distúrbios, como anemia, são também providos.

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

### **Código de Controle**

Campo 1



0 C A 2 B E F A 6 C 7 E 6 E 3 1

Campo 2



7 7 F 3 E 2 9 7 1 E D A 7 1 9 A

### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 2021\_9944 LISTAGEM.TXT
- Data de Geração do Código: 23/04/2021
- Hora de Geração do Código: 12:10:26
- Código de Controle:
  - Campo 1: 0CA2BEFA6C7E6E31
  - Campo 2: 77F3E2971EDA719A