

* R R 1 1 2 0 2 0 0 1 7 7 0 9 A 2 *

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

(57) Resumo: A invenção está no campo da imunoterapia. A presente invenção provê anticorpos úteis em aplicações terapêuticas e de diagnóstico alvejando SIRPA humana, os ditos anticorpos realçando a apresentação cruzada de antígenos para as células T. A invenção também provê anticorpos contra isoformas específicas de SIRPA e capazes de romper a interação entre estas isoformas de SIRPA e a CD47 humana para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou aplicações de diagnóstico e métodos para produzir e/ou selecionar anticorpos anti-SIRPA humana que se liguem com afinidades diferentes às várias isoformas de membros da SIRP humana.

[illegible]

ANTICORPO ANTI-SIRPA HUMANA, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO OU ANTICORPO MODIFICADO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM POLIPEPTÍDEO, MÉTODOS PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-SIRPA HUMANA V1, PARA AUMENTAR A APRESENTAÇÃO CRUZADA DE UM ANTÍGENO E PARA AVALIAR A PROBABILIDADE DE EFICÁCIA DE UM TRATAMENTO, MÉTODO IN VITRO OU EX VIVO PARA AVALIAR A PROBABILIDADE DE EFICÁCIA DE UM TRATAMENTO, E, COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS

[001] A invenção está no campo da imunoterapia. A presente invenção provê anticorpos úteis nas aplicações terapêuticas e de diagnóstico alvejando SIRPa humana, os ditos anticorpos realçando a apresentação cruzada de antígenos para as células T. A invenção também provê anticorpos contra isoformas específicas de SIRPa e capazes de romper a interação entre estas isoformas de SIRPa e CD47 humanas para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou em aplicações de diagnóstico. A invenção também se refere aos métodos para produzir e/ou selecionar anticorpos anti-SIRPA humana que se ligam com afinidades diferentes para várias isoformas de membros SIRP humana.

Breve descrição da técnica anterior

[002] O alvejamento dos pontos de checagem imune da imunidade adaptativa tem mostrado enorme eficácia terapêutica para combater numerosos cânceres. Os pontos de checagem imune nas células mieloides como macrófagos, células dendríticas (DC), células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs) e leucócitos ou neutrófilos polimorfonucleares (PMN), permanecem insuficientemente estudados embora estas células representem o tipo de célula imune mais abundante em muitos tumores sólidos e estejam frequentemente associadas com um resultado insuficiente.

[003] A proteína reguladora de sinal alfa (SIRPa, também designada

SIRP-alfa, SIRP α , CD172a ou SHPS-1), é expressa nos monócitos, na maioria das subpopulações de macrófagos teciduais, granulócitos, subconjunto de DC em tecidos linfoides, algumas células progenitoras da medula óssea e nos níveis variáveis nos neurônios, com uma expressão notável em áreas ricas em sinapse do cérebro, tais como a camada granular do cerebelo e no hipocampo.

[004] SIRP α é o membro prototípico da família de receptor emparelhado a SIRP de proteínas de SIRP intimamente relacionadas compreendendo SIRP α , SIRP γ (também designada SIRP-gama, SIRP γ , CD172g ou SIRP beta-2) e SIRP β (também designada SIRP-beta, SIRP β , CD172b). As proteínas reguladoras de sinal (SIRPs) constituem uma família de glicoproteínas de superfície celular que são expressas nas células mieloides (incluindo macrófagos, granulócitos, células dendríticas mieloides e mastoides) e neuronais (resumidas em Barclay, A.N. & Brown, M.H, Nat Rev Immunol 6, 457-64 (2006); ver também WO 97/48723). CD47, uma glicoproteína de transmembrana amplamente expressa, funciona como um ligante celular para SIRP α e se liga ao término extracelular do terminal NH₂ de SIRP α . O papel de SIRP α foi melhor documentado em respeito do seu papel inibidor na fagocitose de células hospedeiras pelos macrófagos, em particular, a ligação de SIRP α nos macrófagos pela CD47 expressa nas células alvo, gera um sinal inibidor que negativamente regula a fagocitose. Entretanto, verificações mais recentes também demonstraram efeitos de sinalização positiva adicionais mediados através da ligação de SIRP α (Shultz, L.D. *et al.* (1995) J Immunol 154, 180-91).

[005] O gene codificando para SIRP α é um gene polimórfico e diversas variantes são descritas em populações humanas. As variantes de SIRP α humana mais comuns são SIRP α v1 e SIRP α v2 (número de acesso NP_542970 (P78324) e CAA71403 respectivamente) e a família SIRP α é usualmente dividida dentro destes dois subconjuntos; a saber a família de

SIRPa isoforma v1 e a família de SIRPa isoforma v2.

[006] Expressa pelas células mieloides, SIRPa interage com o receptor ubíquo CD47 e esta interação é um ponto de checagem imune importante da resposta inata, envolvida na regulação do funcionamento mielóide. A interação entre SIRPa e CD47 provê um sinal inibitório que inibe fagocitose de célula hospedeira. Desde que a CD47 é amplamente superexpressa em algumas células cancerosas, CD47 funciona como um sinal de “não me coma” dentro de alguns tumores compreendendo estas células, evitando deste modo a fagocitose. A contribuição potencial de interação de CD47-SIRPa na depuração de célula cancerosa foi intensamente investigada em anos recentes. Foi mostrado que a abundância de receptores de CD47 em tumores está inversamente correlacionada com a sobrevivência global do paciente e constitui um fator de prognóstico adverso para diversos tipos de câncer.

[007] O caminho de SIRPa/CD47 foi, portanto, submetido a desenvolvimentos farmacêuticos diferentes para realçar a fagocitose de macrófagos. Uma variedade de métodos foi proposta para romper a interação de CD47/SIRPa em um esforço para efetuar um resultado biológico. Esta abrange o uso de proteínas SIRPa e/ou CD47 fragmentadas/truncadas e anticorpos para as mesmas. A superexpressão de CD47 pelas células cancerosas as torna resistentes aos macrófagos, mesmo quando estas células são revestidas com anticorpos terapêuticos. O bloqueio do caminho de SIRPa/CD47 por intermédio de agentes alvejando CD47 tem mostrado realçar a fagocitose dependente de anticorpo pelos macrófagos. Estas terapias também foram descritas sinergizar com anticorpos anticâncer terapêuticos de esgotamento tais como Trastuzumab (antiHer2), Cetuximab (antiEGFR), Rituximab (antiCd20) e Alemtuzumab (antiCD52).

[008] Não obstante, foi recentemente mostrado que agentes antiCD47 apresentam toxicidade hematológica relacionada com o papel

fisiológico de CD47. Como exemplos, estes agentes antiCD47 podem causar anemia ou trombocitopenia. Além disso, CD47 também está envolvida em outros caminhos com outros membros da família de SIRP. De fato, CD47 também interage com SIRPg presente na superfície de células T humanas, mas não nas células mieloides humanas. A interação de SIRPg/CD47 medeia a adesão de célula-célula, realça a proliferação mediada pela célula T dependente de superantígeno e coestimula a ativação de célula T (Piccio *et al*, 2005).

[009] Portanto, anticorpos anti-SIRP humana capazes de ligar apenas um tipo de SIRP e capaz de romper a ligação de CD47 à SIRPa foram desenvolvidos em anos recentes para evitar efeitos indesejados tais como uma inibição da proliferação de células T. Infelizmente, devido à natureza da família SIRPa de proteínas, os anticorpos da técnica anterior podem não ser eficientes para tratar uma doença em que SIRPa esteja envolvida quando as proteínas SIRPa expressas pelas células do paciente são SIRPa v1 ou SIRPa v2. Alguns anticorpos podem ser úteis para tratar pacientes com SIRPa v1, mas podem apresentar uma função terapêutica reduzida para tratar pacientes com SIRPa v2 ou o oposto. Visto que o tratamento de alguns cânceres está profundamente relacionado com o fenótipo de um paciente, existe uma necessidade quanto a anticorpos direcionados para as isoformas expressas pelas células de cada paciente. Portanto, existe ainda uma necessidade na técnica anterior quanto a agentes novos e melhorados, em particular, anticorpos, alvejando SIRPa com uma especificidade mais alta. Também há uma necessidade quanto a um método para produzir tais anticorpos específicos, método para selecionar estes anticorpos e método para determinar se um paciente é provável de responder a um tratamento com um anticorpo anti-SIRPA humana antes de receber tal tratamento.

[0010] Também há uma necessidade na técnica para realçar a apresentação cruzada de antígeno pelas Células Apresentadoras de Antígeno

(APCs). As APCs, em particular, células dendríticas, desempenham papéis únicos e diversos na ocorrência de tumor, desenvolvimento de uma doença, progressão de uma doença e resposta a uma terapia. Como um exemplo, as células dendríticas ativamente fixam antígenos associados a tumor, os processam e apresentam peptídeos antigênicos às células T, induzindo e mantendo deste modo respostas de células T específicas de tumor. As células dendríticas (DCs) também são chamadas de APCs profissionais. A interação das células dendríticas com células efectoras imunes diferentes também podem sustentar a imunidade antitumor inata, assim como a resposta humoral também conhecida inibir o desenvolvimento de tumor em certos casos. Por outro lado, DCs são recrutadas para o sítio de tumor pelos fatores derivados de tumor e derivados de estroma específicos, que podem prejudicar a sua maturação, a sua diferenciação e/ou a sua função, resultando assim em uma formação deficiente de resposta imune antitumor ou no desenvolvimento de uma tolerância e supressão imune mediadas pelas células dendríticas. A identificação de fatores estimulantes de DC e supressores/polarizantes de DC no ambiente tumoral e o mecanismo de modulação de DC são importantes para designar vacinas à base em DC eficazes e para a recuperação de DCs residentes responsáveis pela manutenção da imunidade antitumor clinicamente relevante em pacientes com câncer (Zong *et al*, 2016). As células dendríticas negativas em SIRPa são descritas como sendo as APCs mais potentes para a apresentação cruzada de antígenos em camundongo e ser humano. As DCs positivas em SIRPa são conhecidas por serem menos eficientes na apresentação cruzada (Meral *et al*, 2013; Nierkens *et al*, 2015; Segura *et al*, 2015)

[0011] As células cancerosas expressam antígenos de tumor, incluindo neoantígenos gerados pelas mutações não sinônimas, mas são ineficientes para a apresentação a antígeno. A recuperação de células dendríticas residentes imunodeficientes responsáveis pela manutenção da

imunidade antitumor clinicamente relevante em pacientes com câncer é um item terapêutico importante a considerar. Realçar a apresentação cruzada de antígenos de tumor ou antígenos mutáveis presentes em cânceres específicos com um anticorpo seria de maior interesse para tratar ou prevenir algumas doenças, incluindo cânceres. O caminho da sinalização de CD47/SIRPa pode ser de interesse para modular a apresentação cruzada de antígeno para as células T (Criscitiello, 2012; Ilyas e Yang, 2015; Vigneron, 2015).

[0012] O defeito na apresentação a antígeno que representa um mecanismo de escape imune principal no câncer e infrarregulagem/perda da apresentação a antígeno é um mecanismo de escape imune principal no câncer (Sánchez-Paulete *et al*, 2017). Portanto, existe uma necessidade quanto a um produto que realçasse a apresentação cruzada de antígeno quando usado.

[0013] O pedido de patente PCT/EP/2017/059071 descreve novos anticorpos anti-SIRPA capazes de especificamente diminuir a interação entre SIRPa e CD47 sem afetar a interação entre SIRPg e CD47. A publicação de patente WO201356352 descreve a seleção de um anticorpo anti-SIRPA (SIRP29) a partir de uma biblioteca de exibição de fago chamada de Biblioteca F que foi usada de modo a selecionar ligadores para SIRPa v1 e v2 e negativa para SIRPb e SIRPg. O anticorpo aí divulgado é capaz de reconhecer ambas as variantes na população. Também, os inventores da presente invenção mostraram que o anticorpo SIRP29 é de fato capaz de ligar SIRPg e romper a interação SIRPg-CD47.

[0014] A publicação de patente WO2015138600 provê composições e métodos relacionados com anticorpos anti-SIRPA. Os anticorpos desta descrição se ligam à SIRPa humana e pode bloquear a interação de CD47 expressa em uma célula alvo de interesse com SIRPa expressa em uma célula fagocíticas. Os anticorpos objetos encontram uso em vários métodos terapêuticos. Em alguns casos, os anticorpos anti-SIRPA podem se ligar à SIRPa, mas não estimulam a sinalização de SIRPa na célula expressando a

SIRPa. Além disso, os anticorpos aí descritos são capazes de ligar SIRPg e bloquear a interação entre CD47 e SIRPg.

[0015] Portanto, os anticorpos descritos na técnica anterior carecem da capacidade discriminativa entre os vários membros da família de SIRP e existe uma necessidade quanto a mais anticorpos específicos, em particular, quanto ao seu uso para prevenir ou tratar diversas doenças.

Descrição da invenção

[0016] Em um aspecto, é aqui provido um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, para o uso no tratamento de uma condição em que o paciente recebendo o tratamento é positivo para SIRPa v1 (isto é, é homozigoto para o alelo de SIRPa (v1/v1) ou heterozigoto para o alelo de SIRPa (v1/v2).

[0017] Em uma modalidade particular, é provido um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, que compreende:

um domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11, em particular, HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 11;

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15, em particular, HCDR3 compreende ou consiste em sequência de

aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15, em particular, HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 15;

e

um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID No: 16 e SEQ ID No: 17, em particular, um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 17;

em que o anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno inibe a ligação de ser humano CD47 para SIRPa v1 humana e não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2;

para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença em um paciente que é positivo para SIRPa v1.

[0018] Em uma outra modalidade, também é provido um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, que:

- liga especificamente à SIRPa v1 humana e/ou SIRPa humana v2, em particular, à SIRPa v1 humana e SIRPa humana v2 e que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e/ou SIRPa humana v2 respectivamente, em particular, que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e SIRPa humana v2;

- não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana; e, em particular, não liga especificamente à SIRPg humana;

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em que o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno

ou anticorpo modificado, aumenta a apresentação cruzada de um antígeno expressado na dita doença, em particular, um câncer e está envolvido na evocação de uma resposta da célula T adequada para o tratamento da dita doença.

[0019] Em uma modalidade particular, o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com a presente invenção liga especificamente à SIRPa v1 humana e inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1. Tal anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com a presente invenção são particularmente adequados para o tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em um paciente positivo para SIRPa v1.

[0020] A invenção também provê um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, que compreende:

um domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11, em particular, HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 11;

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15, em particular, HCDR3 compreende ou consiste em sequência de

aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15, em particular, HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 15;

e

um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID No: 16 e SEQ ID No: 17, em particular, um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 17;

que melhora a apresentação cruzada de um antígeno, em particular, um antígeno do câncer, pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, pelas células dendríticas, para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas;

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em que o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, melhoram a apresentação cruzada de um antígeno expressado na dita doença, em particular, um câncer e está envolvido na evocação de uma resposta da célula T adequada para o tratamento da dita doença.

[0021] Em uma modalidade particular da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença, em particular, para as doenças específicas como aqui descrito, compreendem um domínio variável de cadeia pesada compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20, SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 22 e SEQ ID No: 23, em particular, o domínio

variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 20.

[0022] Um “anticorpo anti-SIRPA v1 humana” é um anticorpo que apresenta uma afinidade de ligação apreciável para SIRPa v1 e que pode não apresentar afinidade de ligação apreciável para a humana v2 SIRPa e/ou SIRPg humana, a afinidade de ligação sendo, em cada caso, detectável através dos métodos conhecidos na técnica, mas não limitados à análise de Biacore, análise de Blitz, ensaio ELISA ou plotagem de Scatchard. Um anticorpo “anti-SIRPA v1” também pode ser definido como um anticorpo que apresenta afinidade de ligação apreciável para SIRPa v1 e que bloqueia a interação entre CD47 humana e SIRPa v1 humana e que não bloqueia a interação entre CD47 humana e SIRPa humana v2 e em uma modalidade preferida que não bloqueia a interação entre a CD47 humana e SIRPg humana. Por “bloqueia a interação” deve ser entendido que o anticorpo tem um efeito antagonista na interação de CD47/SIRPa v1. No uso na forma negativa, este termo significa que o anticorpo não tem um efeito antagonista na Interação de CD47/SIRPa v2 e em uma modalidade preferida que adicionalmente não tem um efeito antagonista na interação de CD47/SIRPg.

[0023] Como aqui usado, o termo “anticorpo” se refere a qualquer tipo de anticorpos, tais como anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos e ser anticorpos humanizados.

[0024] Os anticorpos da presente invenção incluem anticorpos monoclonais e policlonais. Como aqui usado, um “anticorpo monoclonal” é intencionado se referir a uma preparação de moléculas de anticorpo, anticorpos que compartilham sequências de aminoácidos de cadeia pesada comum e de cadeia leve comum, ao contrário de preparações de anticorpo “policlonais” que contêm uma mistura de anticorpos de diferentes sequências de aminoácidos. Os anticorpos monoclonais podem ser gerados através de

várias tecnologias conhecidas como fago, bactéria, levedura ou visualização de ribossomo, assim como através dos métodos clássicos exemplificados pelos anticorpos derivados de hibridoma. Deste modo, o termo “monoclonal” é usado para se referir a todos os anticorpos derivados de um clone do ácido nucleico.

[0025] Os anticorpos da presente invenção incluem os anticorpos recombinantes. Como aqui usado, o termo “anticorpo recombinante” se refere aos anticorpos que são produzidos, expressados, gerados ou isolados através de meios recombinantes, tais como anticorpos que são expressados usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira; anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos combinatórias recombinantes; anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico devido aos genes da imunoglobulina humana; ou anticorpos que são produzidos, expressados, gerados ou isolados de qualquer outra maneira em que as sequências genéticas imunoglobulina particulares (tais como sequências genéticas da imunoglobulina humana) são montadas com outras sequências de DNA. Os anticorpos recombinantes incluem, por exemplo, anticorpos humanizados e quiméricos.

[0026] Os anticorpos da presente invenção incluem os anticorpos quiméricos. Como aqui usado, um “anticorpo quimérico” se refere a um anticorpo em que a sequência do domínio variável da linha germinal de uma espécie mamífera, tal como um camundongo, foi enxertada na sequência do domínio constante derivado da linha germinal de uma outra espécie mamífera, tal como um ser humano.

[0027] Os anticorpos da presente invenção incluem anticorpos humanizados. Como aqui usado, um “anticorpo humanizado” se refere a um anticorpo em que as sequências de CDR derivadas da linha germinal de uma outra espécie mamífera, tal como um camundongo, foram enxertadas nas sequências de estrutura humana.

[0028] Como aqui usado, um “fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo” significa uma parte de um anticorpo, isto é, uma molécula correspondente a uma porção da estrutura do anticorpo da invenção, que apresente capacidade de ligação ao antígeno para SIRPa v1, possivelmente na sua forma nativa; tal fragmento especialmente apresenta a mesma ou substancialmente a mesma especificidade de ligação ao antígeno para os ditos antígenos se comparado à especificidade de ligação ao antígeno do anticorpo de quatro cadeias correspondente. Vantajosamente, o fragmento de ligação aos antígenos tem uma afinidade de ligação similar aos anticorpos de 4 cadeias correspondentes. Entretanto, o fragmento de ligação ao antígeno que tem uma afinidade de ligação ao antígeno reduzida com relação aos anticorpos de 4 cadeias correspondentes também está abrangido dentro da invenção. A capacidade de ligação ao antígeno pode ser determinada medindo-se a afinidade entre o anticorpo e o fragmento alvo. Este fragmento de ligação aos antígenos também pode ser indicado como “fragmentos funcionais” de anticorpos.

[0029] Os fragmento de ligação aos antígenos dos anticorpos são fragmentos que compreendem seus domínios hipervariáveis chamados de CDRs (Regiões de Determinação Complementares) ou parte(s) do mesmo abrangendo o sítio de reconhecimento para o antígeno, isto é, o domínio extracelular de SIRPa v1, deste modo definida a especificidade de reconhecimento do antígeno.

[0030] Cada domínio variável de cadeias pesadas e leves (respectivamente VL e VH) de uma imunoglobulina de quatro cadeias tem três CDRs, indicadas como VL-CDR1 (ou LCDR1), VL-CDR2 (ou LCDR2), VL-CDR3 (ou LCDR3) e VH-CDR1 (ou HCDR1), VH-CDR2 (ou HCDR2), VH-CDR3 (ou HCDR3), respectivamente.

[0031] O técnico habilitado é capaz de determinar o local das várias regiões/domínios de anticorpos por referência às definições padrão neste

aspecto apresentado, incluindo um sistema de numeração de referência, uma referência ao sistema de numeração de KABAT ou pela aplicação do algoritmo de IMGT “collier de perle”. A este respeito, para a definição das sequências da invenção, é notado que a delimitação das regiões/domínios pode variar de um sistema de referência para outro. Portanto, as regiões/domínios como definidas na presente invenção abrangem as sequências que mostram variações no comprimento ou localização das sequências de interesse dentro da sequência de comprimento total dos domínios variáveis dos anticorpos, de aproximadamente +/- 10%.

[0032] Com base na estrutura das imunoglobulinas de quatro cadeias, os fragmentos de ligação ao antígeno podem deste modo ser definidos por comparação com as sequências de anticorpos nos bancos de dados disponíveis e técnica anterior e especialmente por comparação do local dos domínios funcionais nestas sequências, notando que as posições da estrutura e domínios constantes são bem definidas para várias classes de anticorpos, especialmente para as IgGs, em particular, para as IgGs mamíferas. Tal comparação também envolve os dados relacionados às estruturas 3 dimensionais dos anticorpos.

[0033] Para o propósito de ilustração das modalidades específicas da invenção, os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo que contém os domínios variáveis compreendendo as CDRs dos ditos anticorpos abrangem Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂. Os fragmentos Fv consistem dos domínios VL e VH de um anticorpo associados pelas interações hidrofóbicas; nos fragmentos dsFv, o heterodímero VH:VL é estabilizado por uma ligação de dissulfeto; nos fragmentos de scFv, os domínios de VL e VH são conectados uns aos outros por intermédio de um ligante peptídico flexível formando deste modo uma proteína de cadeia única. Os fragmentos de Fab são fragmentos monoméricos obteníveis através da digestão de papaína de um anticorpo; estes compreendem a cadeia L inteira e um fragmento de VH-CH1 da cadeia H, ligados juntos através de uma ligação de dissulfeto. O fragmento

de F(ab')₂ pode ser produzido através da digestão de pepsina de um anticorpo abaixo do dissulfeto da dobradiça; este compreende dois fragmentos de Fab' e adicionalmente uma porção da região de dobradiça da molécula de imunoglobulina. Os fragmentos de Fab' são obteníveis a partir dos fragmentos de F(ab')₂ cortando-se uma ligação de dissulfeto na região de dobradiça. Os fragmentos de F(ab')₂ são bivalentes, isto é, estes compreendem dois sítios de ligação ao antígeno, como a molécula de imunoglobulina nativa; por outro lado, Fv (um dímero de VHVL constituindo a parte variável de Fab), os fragmentos dsFv, scFv, Fab e Fab' são monovalentes, isto é, estes compreendem um sítio de ligação ao antígeno único. Estes fragmentos de ligação ao antígeno básicos da invenção podem ser combinados para obter fragmentos de ligação ao antígeno multivalentes, tais como diacorpos, tricorpos ou tetracorpos. Estes fragmentos de ligação ao antígeno multivalentes também são parte da presente invenção.

[0034] Como aqui usado, o termo anticorpo modificado inclui os anticorpos "biespecíficos" e se refere aos anticorpos que reconhecem dois diferentes antígenos em virtude de possuir pelo menos uma região (por exemplo, derivada de uma região variável de um primeiro anticorpo) que é específico para um primeiro antígeno e pelo menos uma segunda região (por exemplo, derivada de uma região variável de um segundo anticorpo) que é específico para um segundo antígeno. Um anticorpo biespecífico especificamente liga a dois antígenos alvos e é deste modo um tipo de anticorpo monoespecífico. Os anticorpos multiespecíficos, que reconhecem dois ou mais antígenos diferentes, podem ser produzidos através de métodos de DNA recombinante ou incluem, mas não são limitados a anticorpos quimicamente produzidos através de qualquer método conveniente. Os anticorpos biespecíficos incluem todos os anticorpos ou conjugados de anticorpos ou formas poliméricas dos anticorpos que são capazes de reconhecer dois antígenos diferentes. Os anticorpos biespecíficos incluem

anticorpos que foram reduzidos e reformados de modo a reter suas características bivalentes e os anticorpos que foram quimicamente ligados de modo que possam ter vários locais de reconhecimento de antígeno para cada antígeno tal como BiME (Anticorpos que Realçam o Macrófago Biespecífico), BiTE (introdutor de célula T biespecífica), DART (Realvejamento de Afinidade Dupla); DNL (*dock-and-lock*), DVD-Ig (imunoglobulinas de domínio variável duplo), TEM (albumina sérica humana), kih (*knobs into holes*).

[0035] Os miméticos de anticorpo de ligação aos antígenos são compostos orgânicos que especificamente ligam aos antígenos, mas que não são estruturalmente relacionados com os anticorpos. Estes são geralmente peptídeos artificiais ou proteínas pequenas com uma massa molar de cerca de 3 a 20 kDa. Os ácidos nucleicos e moléculas pequenas são, às vezes, também considerados miméticos de anticorpo, mas não anticorpos artificiais, os fragmentos de anticorpo e proteínas de fusão compostas destes. As vantagens comuns sobre os anticorpos são melhor solubilidade, penetração de tecido, estabilidade para calor e enzimas e custos de produção comparativamente baixos. Os miméticos de anticorpo estão sendo desenvolvidos como agentes terapêuticos e de diagnóstico. O mimético de anticorpo de ligação aos antígenos também pode ser selecionado entre o grupo compreendendo aficorpos, afillinas, afímeros, afitinas, DARPinas e monocorpos.

[0036] Um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno é mais preferivelmente selecionado dos grupos compreendendo afitinas e anticalinas. As afitinas são proteínas artificiais com a capacidade de ligar seletivamente aos antígenos. Estas são estruturalmente derivadas da proteína de ligação ao DNA Sac7d, encontradas em *Sulfolobus acidocaldarius*, um microrganismo que pertence ao domínio arqueal. Aleatorizando-se os aminoácidos na superfície de ligação de Sac7d, por exemplo, gerando-se as variantes correspondentes às substituições aleatórias de 11 resíduos da interface de

ligação de Sac7d, uma biblioteca de afitina pode ser gerada e submetendo a biblioteca de proteína resultante às rodadas de visualização de ribossomo, a afinidade pode ser direcionada para vários alvos, tais como peptídeos, proteínas, vírus e bactérias. As afitinas são miméticos de anticorpo e estão sendo desenvolvidas como ferramentas na biotecnologia. Estas também foram usadas como inibidores específicos para várias enzimas (Kreienbrink *et al*, J. Mol. Biol, 383:5, 2008). O técnico habilitado pode prontamente desenvolver as afitinas com as propriedades de ligação necessárias usando os métodos conhecidos na técnica, em particular, como divulgado no pedido de patente WO2008068637 e a publicação acima mencionada, em particular, a geração de bibliotecas de visualização de fago e/ou visualização de ribossomo e suas triagens usando um antígeno como aqui divulgado. As anticalinas são proteínas artificiais que são capazes de ligar aos antígenos, às proteínas ou às moléculas pequenas. Estas são miméticos de anticorpo derivados das lipocalinas humanas que são uma família das proteínas de ligação natural. As anticalinas são cerca de oito vezes menores com um tamanho de cerca de 180 aminoácidos e uma massa de cerca de 20 kDa (Skerra, Febs J, 275:11, 2008). As bibliotecas de visualização de fago de anticalina foram geradas as quais permitem a triagem e seleção, em particular, das anticalinas com propriedades de ligação específicas. O técnico habilitado pode prontamente desenvolver as anticalinas com as propriedades de ligação necessárias usando os métodos conhecidos na técnica, em particular, como divulgado na Patente EP1270725 B1, Patente US 8536307 B2, Schlehuber and Skerra, Biophys. Chem, 96:2-3, 2002 e na publicação acima mencionada, em particular, a geração de bibliotecas de visualização de fago e/ou visualização de ribossomo e sua triagem usando um antígeno como aqui descrito. As anticalinas e afitinas podem ambas ser produzidas em vários sistemas de expressão compreendendo os sistemas de expressão bacterianos. Deste modo, a invenção inclui o uso das afitinas, anticalinas e outros miméticos de anticorpo

similares com as características dos anticorpos aqui descritos, em particular, com relação a sua capacidade de ligação ao SIRPa v1, à inibição da ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e a sua propriedade de não ligação na SIRPa humana v2, e/ou a sua falta de capacidade de prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2, todos os quais são considerados como miméticos de acordo com a invenção.

[0037] Portanto, os anticorpos biespecíficos da invenção são direcionados contra SIRPa v1 e um segundo antígeno que não está presente na SIRPa humana v2 nem na SIRPg humana. Em modalidade de acordo com a presente invenção, o anticorpo anti-SIRPA v1 humana modificado pode ser biespecífico e pode ser definido como um anticorpo modificado ou fragmento de ligação ao antígeno modificado do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno modificado ou molécula quimérica biespecífica.

[0038] Como aqui usado, um “anticorpo modificado” também pode corresponder a uma molécula compreendendo um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que o dito anticorpo monoclonal ou fragmento funcional do mesmo é associado com uma molécula funcionalmente diferente. Um anticorpo modificado da invenção pode ser em uma proteína de fusão quimérica ou um conjugado resultando de qualquer forma adequada de ligação incluindo ligação covalente, enxerto, ligação química com um grupo químico ou biológico ou com uma molécula, tal como um polímero de PEG ou um outro grupo de proteção ou molécula adequada para a proteção contra a clivagem das proteases *in vivo*, para a melhora da estabilidade e/ou meia vida do anticorpo ou fragmento funcional. Com técnicas similares, especialmente através da ligação ou enxerto químico, um anticorpo modificado pode ser preparado com uma molécula biologicamente ativa, a dita molécula ativa sendo, por exemplo, escolhida entre as toxinas, em particular, exotoxina A de *Pseudomonas*, a cadeia A da toxina vegetal ricina ou toxina saporina, especialmente um ingrediente terapeuticamente ativo, um

vetor (incluindo especialmente um vetor de proteína) adequado para alvejar o anticorpo ou fragmento funcional às células ou tecidos específicos do corpo humano ou pode ser associado com um rótulo ou com um ligante, especialmente quando os fragmento do anticorpo são usados. A PEGuilação do anticorpo ou fragmentos funcionais do mesmo é uma modalidade particular interessante conforme esta melhora as condições de liberação da substância ativa ao hospedeiro, especialmente para uma aplicação terapêutica. A PEGuilação pode ser de sítio específico para prevenir a interferência com os sítios de reconhecimento dos anticorpos ou fragmentos funcionais e pode ser realizada com PEG de alto peso molecular. A PEGuilação pode ser obtida através de resíduos de cisteína livres presentes na sequência do anticorpo ou fragmento funcional ou através dos resíduos de cisteína livre adicionados na sequência de amino do anticorpo ou fragmento funcional. De acordo com a presente invenção, quando o termo “anticorpo” é usado, este significa um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado.

[0039] Em uma modalidade, o anticorpo anti-SIRPA v1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno é modificado.

[0040] Em uma modalidade particular da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença em um paciente que é positivo para SIRPa v1 compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20, SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 22 e SEQ ID No: 23, em particular, o domínio variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 20.

[0041] Em uma modalidade particular da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença como aqui descrito em um paciente humano que é positivo para SIRPa v1 compreende ou consiste em:

um domínio variável de cadeia pesada compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 20;

um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 17.

[0042] Deste modo a invenção também diz respeito a um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga especificamente à SIRPa v1 humana e que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e que não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2, para o uso em um tratamento ou prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1. O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado liga especificamente à SIRPa v1 e antagoniza a interação entre SIRPa v1 e CD47.

[0043] A expressão “*liga especificamente*” ou qualquer termo equivalente se refere à capacidade do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de interagir com a SIRPa v1 humana e ligar à SIRPa v1 humana, enquanto estes não ligam ou ligam com uma afinidade de ligação significativamente mais fraca a outras moléculas, em particular, à SIRPa v2, em particular, à SIRPg humana, em particular, à SIRPa e SIRPg humana v2. A ligação e a especificidade pode ser avaliada por SPR (Ressonância de Superfície Plasmônica, por exemplo, Biacore), ELISA ou análise de Western Blot. Em uma modalidade particular, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou uma molécula quimérica compreendendo o dito anticorpo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno alveja e liga à

SIRPa v1 como uma proteína isolada com uma afinidade (KD) de pelo menos $10E-9$ M, em particular, pelo menos do que $10E-10$ M. O anticorpo para o uso de acordo com a invenção pode apresentar um valor KD compreendido entre $10E-8$ M e $10E-11$ M, preferivelmente compreendido entre $10E-9$ M e $10E-10$ M, para SIRPa v1, particularmente através da análise de Blitz.

[0044] O anticorpo para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença não previne ou inibe a ligação de CD47 humana para SIRPa humana v2. Em outras palavras, este anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado não tem um efeito significativo na ligação da CD47 humana à SIRPa humana v2 ao contrário da ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana, em particular, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno não previnem ou inibem a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 mais do que 70%, preferivelmente 60%, preferivelmente 50% e ainda mais preferivelmente 25% se comparado a uma molécula de controle negativo, em um ensaio de ligação. A ligação entre CD47 e SIRP v2 (ou SIRPg) pode ser avaliada de acordo com os métodos divulgados nos exemplos da presente invenção, em particular, o método de Blitz divulgado no exemplo 6, mas também através da análise de Biacore, ensaio de ELISA ou citometria de fluxo com células expressando SIRPa v2 e/ou SIRPg. Uma ligação é considerada prevenida ou inibida quando o valor de KD correspondente à afinidade de CD47 à SIRPa v2 (ou SIRPg) é acima de $1E-7$ M.

[0045] A prevenção ou a inibição da ligação pode ser determinada através de vários métodos conhecidos por aquele habilitado na técnica; estes métodos incluem, mas não são limitados à análise de Biacore, análise de Blitz e plotagem de Scatchard.

[0046] A diminuição ou a inibição da ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana significam que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou

anticorpo modificado diminui a interação entre SIRPa v1 e CD47, isto é, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo parcial ou completamente inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana ou em outras palavras, especificamente liga à SIRPa v1 humana e antagoniza a interação entre SIRPa v1 humana e CD47 humana, em particular, a anticorpo anti-SIRPA v1 humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem a capacidade de diminuir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana em pelo menos 50%, preferivelmente 60%, mais preferivelmente 70%, mais preferivelmente 80% e ainda mais preferivelmente 90% e em uma modalidade particular 100%, se comparado a um molécula de controle negativo, em um ensaio ligação, em particular, o anticorpo anti-SIRPA v1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tem a capacidade de reduzir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana de 50% a 100%, mais preferivelmente de 60% a 90%, se comparado a uma molécula de controle negativo, em um ensaio de ligação.

[0047] De acordo com a invenção, pode ser considerado que um anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado) não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 se o dito anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno) não induz um aumento superior a 5 log, preferivelmente não superior a 4 log, mais preferivelmente não superior a 3 log, mais preferivelmente não superior a 2 log e ainda mais preferivelmente não superior a 1 log, do valor KD da CD47 humana em uma ensaio competitivo de ligação de SIRPa v2, em particular, através do ensaio de Blitz. Alternativamente, pode ser considerado que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 se o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ou mimético de

anticorpo de ligação ao antígeno não reduz a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 acima de 25% se comparado a um molécula de controle negativo, em um ensaio de ligação.

[0048] Em uma modalidade particular da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para o uso de acordo com a invenção pode apresentar uma ligação transitória à SIRPa v2, mas não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2. O anticorpo anti-humano, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com a invenção significativamente inibe, diminui, antagoniza ou compete com a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana, enquanto o mesmo anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno não diminui, antagoniza, inibe ou compete com a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2. O efeito antagonista pode ser determinado usando os métodos como ilustrado nos exemplos do presente pedido.

[0049] Um paciente positivo para SIRPa v1 é uma pessoa que compreende pelo menos um alelo de SIRPa v1, isto é, uma pessoa que é heterozigótica para SIRPa v1 (compreendendo alelos de SIRPa v1 e SIRPa v2) ou homozigótica para SIRPa v1 (compreendendo dois alelos de SIRPa v1). De acordo com a presente invenção, a SIRPa v1 humana pode ser definida como uma SIRPa compreendendo o resíduo de aminoácido L na posição 44 da SEQ ID No: 3 ou na posição 14 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo um resíduo de aminoácido T na posição 50 da SEQ ID No: 3 ou na posição 20 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido T na posição 52 da SEQ ID No: 3 ou na posição 22 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido R na posição 54 da SEQ ID No: 3 ou na posição 24 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido A na posição 57 da SEQ ID No: 3 ou na posição 27 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido G na posição 75 da SEQ

ID No: 3 ou na posição 45 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido D na posição 95 da SEQ ID No: 3 ou na posição 65 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido L na posição 96 da SEQ ID No: 3 ou na posição 36 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido N na posição 100 da SEQ ID No: 3 ou na posição 70 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido R na posição 107 da SEQ ID No: 3 ou na posição 77 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido G na posição 109 da SEQ ID No: 3 ou na posição 79 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido D na posição 130 da SEQ ID No: 3 ou na posição 100 da SEQ ID No: 24; ou compreendendo o resíduo de aminoácido V na posição 132 da SEQ ID No: 3 ou na posição 102 da SEQ ID No: 24. Em uma modalidade particular da invenção, a SIRPa v1 humana compreende o resíduo de aminoácido V na posição 132 da SEQ ID No: 3 e o resíduo de aminoácido D na posição 130 da SEQ ID No: 3 ou compreende o resíduo de aminoácidos D e V nas posições 100 e 102 da SEQ ID No: 24 respectivamente. Alternativamente, um SIRPa v1 pode ser definido como uma isoforma de SIRPa compreendendo na sua sequência de aminoácidos a sequência da SEQ ID No: 1, enquanto uma isoforma SIRPa v2 pode ser definida como uma isoforma SIRPa compreendendo na sua sequência de aminoácidos a sequência da SEQ ID No: 2. Alternativamente, um paciente positivo para SIRPa v1 pode ser definido como um paciente cujo genoma compreende dentro do alelo de SIRPa um gene que codifica para um RNA de SIRPa traduzido em uma proteína de com resíduo de aminoácidos D e V nas posições 130 e 132 da SEQ ID No: 3 respectivamente ou nas posições 100 e 102 da SEQ ID No: 24 respectivamente.

[0050] A invenção tem base na observação inesperada feita pelos inventores de que alguns anticorpos anti-SIRPA humana não ligam igualmente às diferentes isoformas de SIRPa e alguns anticorpos podem ser

úteis para tratar, prevenir, deste modo particularmente abranger, diminuir progressão dos ou reduzir os sintomas associados com uma doença ou um distúrbio em um paciente positivo para SIRPa v1, em particular, uma doença em que CD47 e/ou SIRPa é envolvida, em particular, uma doença em que CD47 é superexpressada em um paciente positivo para SIRPa v1.

[0051] Em uma modalidade particular da invenção, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é usado para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença selecionada do grupo que consiste em uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nos nervos, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica, em particular, uma doença infecciosa por *Pseudomonas* e Citomegalovírus, fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II, melanoma e uma disfunção de transplante. Em uma modalidade particular, o anticorpo é usado para a prevenção e/ou o tratamento de um câncer, em particular, câncer e cânceres inflamatórios com células mieloides infiltradas, particularmente, com células dendríticas infiltradas e/ou células supressoras derivadas de mieloide (MDSCs) e/ou células de macrófago associadas com tumor (TAMs). Em uma modalidade particular da invenção o anticorpo é usado para o tratamento e/ou a prevenção de melanoma, trauma ou choque séptico. Em uma modalidade particular, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é usado para a vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em particular, cânceres inflamatórios e cânceres com células mieloides infiltradas, em particular, um câncer com células dendríticas infiltradas e/ou células MDSCs e/ou TAM. Em uma modalidade particular, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo são usados para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença em que CD47 é superexpressado. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo são usados para o tratamento e/ou a prevenção

de melanoma. O uso do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com a invenção melhora a apresentação cruzada de antígenos pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), em particular, a apresentação cruzada de antígenos para as células T através das APCs, em particular, a apresentação cruzada de antígenos para as células T CD8+ pelas células dendríticas. Devido ao aumento na apresentação cruzada de antígenos, o uso do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é útil na vacinação terapêutica contra as doenças citadas, em particular, contra cânceres, em um paciente que é positivo para SIRPa v1, em particular, quando a doença é relacionada com a superexpressão de CD47, mais particularmente quando a doença é relacionada com a superexpressão de CD47 pelas células cancerosas ou células tumorais. A superexpressão de CD47 pode ser avaliada comparando-se a expressão de CD47 em uma célula cancerosa e em uma célula saudável emitida do mesmo tecido. A expressão de CD47 pode ser avaliada através de métodos conhecidos na técnica como a quantificação de mRNA, por exemplo, através de RT-qPCR ou quantificação de proteínas por citometria de fluxo, western blot, ELISA e os semelhantes.

[0052] Em uma modalidade particular, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo são usados para a prevenção e/ou o tratamento de um câncer, em que pelo menos um dos antígenos selecionados do grupo que consiste em Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos do gene CTNNB1, gene CASP8, gene HER2, gene p53, gene KRAS, gene NRAS ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste do oncogene *ras*, antígenos tumorais BCR-ABL, antígenos tumorais ETV6-AML1, antígeno de melanoma que codifica genes

(MAGE), antígenos BAGE, antígenos GAGE, antígenos ssx, antígenos ny-eso-1, antígenos tumorais ciclina-A1, antígeno MART-1, antígeno gp100, antígeno CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno do carcinoma 125, antígeno de mucina 16, antígeno de mucina 1, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno de p53 do tipo selvagem, antígeno de ERBB2 oncogênico, antígeno tumoral sialila-Tn, antígeno do tumor de Wilms 1, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), é expressado, em particular, superexpressado. Alternativamente ou de maneira complementar, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é usado para a vacinação terapêutica contra um câncer em que pelo menos um dos antígenos selecionado do grupo consistindo em antígenos acima mencionados é expressado, em particular, superexpressado.

[0053] Em uma modalidade particular da invenção, o anticorpo anti-SIRPA v1 humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso tem as seguintes propriedades:

- o mesmo não liga especificamente à SIRPa humana v2;
- o mesmo não inibe ou previne a ligação de CD47 humana à SIRPg humana, em particular, este não liga à SIRPg humana.

[0054] De acordo com a invenção, pode ser considerado que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado não liga especificamente à SIRPa humana v2 se o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou

anticorpo modificado do mesmo tem uma afinidade de ligação menor do que $1\text{E-}8\text{ M}$, mais preferivelmente menor do que $1\text{E-}7\text{ M}$, para SIRPa v2, em particular, através da análise de Blitz. A biodisponibilidade de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno que não liga especificamente à SIRPa humana v2 pode ser aumentada quando o paciente positivo para SIRPa v1 é heterozigoto SIRPa v1.

[0055] De acordo com a invenção, pode ser considerado que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado não inibe ou previne a ligação de CD47 humana à SIRPg humana se o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno não induz um aumento ou induz um aumento inferior a 5 log, mais preferivelmente inferior a 4 log, mais preferivelmente inferior a 3 log, mais preferivelmente inferior a 2 log e ainda mais preferivelmente inferior a 1 log, do valor KD da CD47 humana para SIRPg humana em um ensaio de ligação competitiva de SIRPg, por exemplo, através da análise de Blitz. Em uma modalidade particular, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de ligação ao antígeno não liga especificamente à SIRPg humana se o dito anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno tem um valor KD superior a $10\text{E-}8\text{ M}$, preferivelmente superior a $10\text{E-}7\text{ M}$, mais preferivelmente superior a $10\text{E-}6\text{ M}$, para SIRPg, em particular, através da análise de Blitz.

[0056] O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso no tratamento e/ou a prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1 também pode ter pelo menos uma das seguintes propriedades, em particular, pelo menos duas das seguintes propriedades, em particular,

pelo menos três das seguintes propriedades, em particular, todas das seguintes propriedades:

- o mesmo liga com a SIRPa v1 humana com uma afinidade (KD) de pelo menos $10E-8$ M, em particular, pelo menos $10E-9$ M, mais preferivelmente de pelo menos $10E-10$ M; e/ou

- o mesmo não inibe a proliferação e/ou a ativação das células T humanas, em particular, *in vivo*; e/ou

- o mesmo melhora a ativação dos macrófagos; e/ou

- o mesmo melhora a apresentação cruzada de pelo menos um antígeno pelas células que apresentam antígeno para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas.

[0057] A capacidade de ligação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado à SIRPa v1 humana pode ser avaliada como já explicado, por exemplo, por SPR (Ressonância de Superfície Plasmônica, por exemplo, Biacore), ELISA, citometria de fluxo ou análise de Western Blot.

[0058] A proliferação e/ou ativação das células T humanas, em particular, *in vivo*, pode ser avaliada de acordo com os métodos conhecidos na técnica, em particular, os métodos descritos nos exemplos da presente invenção como incorporação de timidina. Em uma modalidade particular, o uso de um anticorpo anti-SIRPA v1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado não diminui ou não inibe a proliferação das células T acima de 20% se comparado com um controle negativo. Ao contrário do uso de anticorpos antiCD47 humanos, o uso dos anticorpos anti-SIRPA V1 humanos ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno não têm um efeito significativo na proliferação das células T humanas, enquanto os anticorpos antiCD47 inibem a proliferação das células

T humanas.

[0059] A ativação dos macrófagos humanos pode ser avaliada de acordo com vários métodos, incluindo os métodos descritos nos exemplos da presente invenção. Em uma modalidade particular, um macrófago é ativado quando sua secreção de quimiocina MIP-1a/CCL-3 e/ou quimiocina MIP-1b/CCL4 é aumentada se comparado a um controle negativo, em particular, a secreção da quimiocina MIP-1a/CCL-3 e/ou quimiocina MIP-1b/CCL4 é aumentada em pelo menos 20% se comparado a um controle negativo.

[0060] A apresentação cruzada de pelo menos um antígeno por células apresentadoras de antígeno para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas, pode ser avaliada através de vários métodos, incluindo os métodos descritos nos exemplos da presente invenção, em particular, é considerado que a apresentação cruzada é aumentada quando a secreção de IL-2 pelas células T é aumentada, em particular, em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos 50%. Alternativamente, a apresentação cruzada é melhorada quando a secreção de IFN γ pelas células T é aumentada, em particular, em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos 50%.

[0061] A invenção também diz respeito ao uso de um polipeptídeo, em particular, um antígeno, para a produção e/ou para a seleção de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso como detalhado aqui acima. Portanto, é aqui provido um polipeptídeo útil, em particular, para a produção de um anticorpo anti-SIRPA v1 humana, e/ou para a seleção e/ou a produção de tal anticorpo, e/ou para testar a afinidade de ligação de tal anticorpo. Para esta finalidade, também é provido um polipeptídeo, em particular, um antígeno compreendendo ou consistindo em epítipo de SIRPa v1 humana consistindo da SEQ ID No: 1 (KGSPDDV) ou da SEQ ID No: 4 (KFRKGSPDDVE) ou da SEQ ID No: 25

(DDVEFKSGAGTELSVR) para o uso na seleção de um anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno, que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e que não previne ou diminui a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2, em particular, que não liga especificamente à SIRPa humana v2.

[0062] A SEQ ID No: 1 corresponde a uma sequência de epítopo reconhecida pelo anticorpo anti-SIRPA humana que têm uma capacidade significativa de ligação para isoformas de SIRPa v1, que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e que não inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v2. Portanto, um polipeptídeo compreendendo a sequência de epítopo do aminoácido da SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 pode ser útil para a produção de um anticorpo que pode ser usado no tratamento e/ou na prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1. A ligação específica entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado e o epítopo (ou a região compreendendo o epítopo) implica que o anticorpo apresenta uma afinidade apreciável para o epítopo (a região compreendendo o epítopo) em uma proteína ou antígeno particulares (aqui: SIRPa v1). A “afinidade apreciável” ou “ligação específica” ou “especificamente liga a” inclui a ligação com uma afinidade de cerca de $10E-8$ M (KD) ou mais forte. Preferivelmente, a ligação é considerada específica quando a afinidade de ligação é entre $10E-8$ M (KD) e $10E-12$ M (KD), opcionalmente entre $10E-8$ M (KD) e $10E-10$ M (KD), em particular, pelo menos $10E-8$ M (KD). Se um domínio de ligação especificamente reage com ou liga a um alvo, este pode ser prontamente testado por, entre outras coisas, comparação da reação dos ditos domínios de ligação com uma proteína alvo ou antígeno com a reação dos ditos domínios de ligação com as proteínas ou antígenos outros que não a proteína alvo. Os termos “ligação específica” ou “especificamente liga a” não significa que um anticorpo reconhece e liga a

uma molécula alvo única, mas que o anticorpo tem uma afinidade de ligação que é mais alta para sua molécula alvo com relação a outras moléculas e, em particular, tem uma afinidade de ligação para uma molécula alvo acima de uma dada afinidade como detalhado mais acima. Usados na forma negativa, os termos “ligação específica” ou “especificamente liga a” significam que um anticorpo reconhece a molécula alvo com uma baixa afinidade ou não reconhece a molécula alvo, isto é, a ligação entre o anticorpo e a molécula alvo não é específica. Preferivelmente, uma ligação é reconhecida não específica quando a afinidade de ligação é menor do que 10^{-8} M (KD). As moléculas comparadas em relação da ligação poder ser relacionada como específica são, em particular, as isoformas SIRPg e SIRPa.

[0063] Os inventores demonstram nos exemplos da invenção que dois Polimorfismos de Nucleotídeo Único específicos (SNPs) (a saber SNP 15 e SNP 16, sua combinação correspondendo SNP 17) são responsáveis pelo não reconhecimento de SIRPa humana v2 pelos anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado usado de acordo com a invenção. Ambos SNPs codificam os resíduos de aminoácidos localizados dentro do epítipo da SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 e SEQ ID No: 25. Devido ao polimorfismo desta região específica de SIRPa, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado são capazes de ligar à SIRPa v1 e romper a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana, sem prejudicar a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2. Além disso, tal anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado também é incapaz de prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPg humana, em particular, tal anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado não ligam especificamente à

SIRP_g humana.

[0064] O polipeptídeo compreendendo o epítopo da SEQ ID No: 1 também pode compreender pelo menos um outro epítopo, o epítopo da SEQ ID No: 5 (SLIPVGP) e/ou o epítopo da SEQ ID No: 6 (GRELIYNQKEGH), ambos sendo epítopos lineares reconhecidos pelo anticorpo anti-SIRPA v1 humana, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado. Alternativamente, o polipeptídeo também pode compreender pelo menos um epítopo selecionado do grupo compreendendo a SEQ ID No: 7 (ELIYNQKEGHFPR) e a SEQ ID No: 8 (RNNMDFSIRIGN), ambos sendo epítopos conformacionais reconhecidos pelo anticorpo anti-SIRPA v1 humana, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno e anticorpo modificado.

[0065] O polipeptídeo ou o antígeno, compreendendo o epítopo da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 pode ser usado para a preparação (ou a produção) de anticorpos ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, por exemplo, imunizando-se um animal não-humano, em particular, um mamífero não-humano e coletando o soro resultante ou células B dos ditos animais não humanos imunizados para obter os anticorpos direcionados contra o(s) antígeno(s) compreendido(s) dentro do polipeptídeo. Os anticorpos recuperados podem ser então humanizados ou modificados para obter o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou anticorpos bifuncionais ou biespecíficos. As células B recuperadas podem ser transformadas em hibridomas para a produção de anticorpos SIRPA V1 anti-humano. Os anticorpos produzidos podem ser recuperados e selecionados de acordo com um método de seleção detalhado aqui abaixo.

[0066] A invenção também se refere ao uso de um polinucleotídeo

que codifica um antígeno de SIRPa v1 humana, para a produção de um polipeptídeo, em particular, um antígeno, compreendendo o epítipo da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25. O polinucleotídeo pode compreender pelo menos uma porção da SEQ ID No: 26, a dita porção compreendendo aos resíduos do ácido nucleico que codificam o epítipo da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25. A SEQ ID No: 26 corresponde a um cDNA que codifica uma proteína SIRPa v1. O polinucleotídeo pode ser usado em um sistema de produção, por exemplo, quando o polinucleotídeo é inserido dentro de um vetor de expressão, como um plasmídeo, para produzir o polipeptídeo compreendendo o epítipo de SIRPa v1 compreendendo os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25. Em uma modalidade particular, o polinucleotídeo codifica uma porção da SEQ ID No: 26 compreendendo pelo menos os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 e os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 5 e/ou SEQ ID No:6; ou os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 7 e/ou SEQ ID No: 8.

[0067] A invenção também se refere a um método para selecionar e recuperar um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado que liga especificamente à SIRPa v1 humana e que diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e que não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2. Os métodos de seleção e recuperação compreendem as seguintes etapas:

a) Testar a capacidade do composto (isto é, o anticorpo, o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, o mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou o anticorpo modificado) para ligar especificamente à SIRPa v1 humana, em particular, a capacidade do composto para ligar especificamente a um epítipo compreendendo ou que consiste em SEQ ID No:1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25, em particular, a capacidade do

composto para ligar especificamente aos resíduos de aminoácido D e V localizados respectivamente nas posições 130 e 132 de SIRPa da SEQ ID No: 3; ou localizados respectivamente nas posições 100 e 102 de SIRPa da SEQ ID No: 24; e

b) Testar a capacidade do composto para diminuir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana; e

c) Testar a capacidade do composto não para prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2; e/ou

d) Em particular, testar a capacidade do composto não para prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPg humana;

e opcionalmente:

e) Testar a capacidade do composto de não ligar especificamente à SIRPa humana v2;

f) Testar a capacidade do composto de não ligar especificamente à SIRPg humana; e/ou

[0068] O composto selecionado e recuperado deve ter as seguintes propriedades:

- o mesmo liga especificamente à SIRPa v1 humana, em particular, com uma afinidade de pelo menos $1E-9$ M, em particular, $10E-9$ M, mais preferivelmente com uma afinidade de pelo menos $1E-10$ M, em particular, $10E-10$ M;

- o mesmo diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana;

- o mesmo não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2;

- em particular, este não liga especificamente à SIRPg humana.

[0069] O composto selecionado e recuperado também pode apresentar pelo menos uma das seguintes propriedades, preferivelmente pelo menos duas das seguintes propriedades:

- o mesmo não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRP_g humana; e/ou

- o mesmo não liga especificamente à SIRP_a humana v2.

[0070] A especificidade de ligação do composto pode ser avaliada de acordo com os métodos já descritos aqui acima, por exemplo, por SPR (Ressonância de Superfície Plasmônica, por exemplo, Biacore), ELISA ou análise de Western Blot, em particular, o composto liga especificamente à SIRP_a v1 quando a afinidade de ligação é de pelo menos $10E-8$ M, mais preferivelmente de pelo menos $10E-9$ M ou quando a afinidade de ligação é compreendida entre $10E-8$ M e $10E-11$ M, mais preferivelmente entre $10E-9$ M e $10E-10$ M. O composto não liga especificamente à SIRP_a humana v2 ou SIRP_g quando a afinidade de ligação é menor do que $1E-8$ M. A prevenção ou inibição da ligação de CD47 à SIRP_a v1 humana, SIRP_a v2 e SIRP_g pode ser avaliada através dos métodos já aqui descritos, em particular, através do ensaio competitivo, em particular, através do ensaio de Blitz. Pode ser considerado que um composto não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRP_a v1 humana, SIRP_a v2 ou SIRP_g se o dito composto não induzem um aumento superior a 5 log, preferivelmente não superior a 4 log, mais preferivelmente não superior a 3 log, mais preferivelmente não superior a 2 log e ainda mais preferivelmente não superior a 1 log, do valor KD da CD47 humana em uma SIRP_a v1, SIRP_a v2 ou Ensaio de ligação competitiva de SIRP_g, em particular, através de um ensaio de Blitz. Ao contrário, pode ser considerado que um composto previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRP_a v1 humana, SIRP_a v2 ou SIRP_g se o dito composto induzem um aumento superior a 1 log, preferivelmente superior a 2 log, mais preferivelmente superior a 3 log, mais preferivelmente superior a 4 log e ainda mais preferivelmente superior a 5 log, do valor KD da CD47 humana em um SIRP_a v1, SIRP_a v2 ou Ensaio de ligação competitiva de SIRP_g, em particular, através de um ensaio de Blitz.

[0071] Em um aspecto particular, o método para selecionar um composto pode compreender pelo menos uma das seguintes etapas, em particular, pelo menos duas das seguintes etapas, em particular, pelo menos três das seguintes etapas e, em particular, as quatro seguintes etapas:

i) testar a proliferação da célula T na presença do composto;
e/ou

ii) testar a ativação da célula T na presença do composto; e/ou

iii) testar a ativação do macrófago na presença do composto;
e/ou

iv) testar a apresentação cruzada de um antígeno, em particular, um antígeno de tumor, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, células dendríticas, para as células T humanas na presença do composto, em particular, a apresentação cruzada do antígeno pelas células dendríticas para células T CD8⁺.

[0072] De acordo com esta modalidade particular, o composto selecionado pode apresentar pelo menos uma, preferivelmente pelo menos duas, mais preferivelmente pelo menos três, ainda mais preferivelmente as quatro seguintes propriedades:

- o mesmo não inibe a proliferação da célula T humana; e/ou
- o mesmo não inibe a ativação da célula T humana; e/ou
- o mesmo melhora a ativação dos macrófagos; e/ou
- o mesmo melhora a apresentação cruzada de um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno para as células T humanas.

[0073] A proliferação da célula T e a ativação da célula T podem ser determinadas através de vários métodos. Por exemplo, a proliferação das células T podem ser medidas através da incorporação de H3-tiamidina, em particular, é considerado que um composto não inibe a proliferação das células T quando a proliferação das células T é reduzida em não mais do que

20% se comparado a um controle negativo. A ativação da célula T pode ser avaliada analisando-se a expressão de CD25 e/ou CD69, por exemplo, através da citometria de fluxo, western blot, ELISA e outros, e/ou avaliando-se a secreção de IFN γ e/ou IL2 como divulgado nos exemplos da presente invenção. A apresentação cruzada pode ser avaliada de acordo com vários métodos, em particular, através do método descrito nos exemplos da presente invenção, em particular, é considerado que a apresentação cruzada é aumentada quando a secreção de IL-2 pelas células T é aumentada em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos 50% se comparado a um controle negativo. Alternativamente, a apresentação cruzada é aumentada quando a secreção de IFN γ pelas células T é aumentada em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos 50%, se comparado a um controle negativo. A ativação do macrófago pode ser avaliada através de vários métodos, em particular, o método descrito nos exemplos da presente invenção, em particular, a ativação do macrófago pode ser avaliada pela dosagem da secreção de quimiocina(s), em particular, um macrófago é ativado quando a secreção de quimiocina MIP-1a/CCL-3 e/ou quimiocina MIP-1b/CCL4 é aumentada se comparado a um controle negativo, em particular, quando o aumento da secreção de quimiocina(s) é acima de 20% se comparado a um controle negativo.

[0074] Também é provido um método *in vitro* ou *ex vivo* para avaliar a probabilidade de eficácia a um tratamento em que um composto de anti-SIRPA humana (isto é, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado), deve ser administrado a um paciente humano, em particular, quando o composto é um composto de anti-SIRPA v1 humana. O método compreende a determinação da presença de SIRPa v1 em uma amostra biológica previamente obtida do paciente, como sangue, células, biópsia ou outros. A presença de SIRPa v1 pode ser determinada usando-se os

compostos anti-SIRPA v1 como aqui definido ou produzido de acordo com os métodos aqui definidos ou selecionados de acordo com os métodos aqui descritos. A detecção de SIRPa v1 dentro da amostra é um indicativo de que o tratamento com um composto de anti-SIRPA v1 humana é provavelmente eficaz. Em outras palavras, a presente invenção provê um método *in vitro* ou *ex vivo* para a identificação de um paciente que é provavelmente eficazmente com um composto anti-SIRPA, o dito método compreendendo a identificação do estado do paciente entre o grupo consistindo de SIRPa v1/v1 pacientes, v1/v2 pacientes e v2/v2 pacientes, em que um paciente classificado dentro do grupo v1/v1 ou do grupo v1/v2 deve ser provavelmente tratado de maneira eficaz por um composto anti-SIRPA usado de acordo com a invenção e, em particular, em que a dose terapêutica do composto anti-SIRPA administrado a um paciente SIRPa v1/v1 pode ser diferente (isto é, menos importante) do que a dose terapêutica a e um paciente SIRPa v1/v2. Alternativamente, o método pode compreender a detecção de um produto genético (RNA ou DNA) que codifica a proteína SIRPa v1. Mais particularmente, o método compreende uma etapa de determinação dos alelos de SIRPa do paciente (alelo v1 ou alelo v2). Um paciente humano é considerado positivo para SIRPa v1 se pelo menos um alelo de SIRPa compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25. Alternativamente, um paciente é considerado positivo para SIRPa v1 se pelo menos um dos seus alelos de SIRPa compreende dentro do seu éxon 3 as mutações consistindo em SNPs 15 (rs115287948) e 16 (rs114499682) de SIRPa v1 ou SNP 17 de SIRPa v1, que codifica o resíduo de aminoácido V na posição 132 da SEQ ID No: 3 ou na posição 102 da SEQ ID No: 24 ou que codifica o resíduo de aminoácido V na SEQ ID No: 1 ou 4 ou o primeiro resíduo de aminoácido V na SEQ ID No: 25; e se pelo menos um dos seus alelos de SIRPa compreende dentro de seu éxon 3 uma sequência nucleica que codifica os resíduos de aminoácido 5' DDV 3' dentro de SIRPa.

Os SNPs de SIRPa são bem documentados e disponíveis nos bancos de dados *online* como Genbank. Os números de referência SNP ID ou “rs” estão disponíveis no banco de dados NCBI. Os SNPs 15 e 16 de SIRPa v1 correspondem a um resíduo de ácido nucleico g e t respectivamente como detalhado nos exemplos da invenção. Portanto, o método pode compreender a determinação do alelo de SIRPa, por exemplo, através da reação de cadeia de polimerase, em que a determinação de um paciente positivo para SIRPa v1 compreender a detecção de uma sequência de SIRPa compreendendo os resíduos de ácidos nucleicos correspondentes a pelo menos uma porção do éxon 3 de SIRPa humana e em que os SNPs 15 e 16 de SIRPa são determinados, como detalhados aqui acima, dentro de pelo menos um dos alelos de SIRPa, em particular, ambos os alelos de SIRPa.

[0075] Para esta finalidade, a invenção também se refere a um kit de partes para determinar o estado de SIRPa de um paciente, os ditos kits compreendendo um par de iniciadores adequados para amplificar, em particular, através da reação de cadeia de polimerase (PCR) ou, em particular, através da reação de cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), pelo menos uma porção do gene de SIRPa (como gDNA, por exemplo) ou o transcrito de SIRPa (como mRNA ou cDNA por exemplo), em particular, a dita porção compreendendo pelo menos uma parte do éxon de SIRPa 3, a dita porção compreendendo pelo menos a localização de SNP 15 e SNP 16 de SIRPa como definido aqui acima ou nos exemplos da invenção ou a localização do SNP 17 de SIRPa como aqui definido acima ou nos exemplos da invenção; e a localização do códon que codifica o primeiro resíduo de aminoácido D dentro do epítipo de SIRPa v1 da SEQ ID No: 1 ou da SEQ ID No:4 ou da SEQ ID No: 25. A localização do códon ausente em uma sequência de ácido nucleico que codifica SIRPa v2 pode ser avaliada alinhando-se a SEQ ID No: 27 (éxon 3 de SIRPa v1) e a SEQ ID No: 31 (éxon 3 de SIRPa v2). Portanto, o par dos iniciadores pode compreender um

primeiro iniciador capaz de anelar tanto com as sequências de ácido nucleico que codificam SIRPa v1 e SIRPa v2 tanto com um segundo iniciador capaz de anelar somente com a sequência de ácido nucleico de SIRPa v1. A sequência de ácido nucleico de tais iniciadores pode ser determinada por uma pessoa habilitada na técnica alinhando-se a SEQ ID No: 27 (éxon 3 de SIRPa v1) e SEQ ID No: 31 (éxon 3 de SIRPa v2). Em uma modalidade particular, um iniciador capaz de anelar com a sequência de ácido nucleico que codifica SIRPa v1, mas não com a sequência de ácido nucleico que codifica SIRPa v2 pode ser determinado de acordo com a localização dos SNPs de SIRPa v1 e pode inclui uma pluralidade de SNPs de SIRPa v1. Em uma modalidade particular, o iniciador específico de SIRPa v1 é capaz de anelar, particularmente em condições rigorosas, dentro da sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos os resíduos de aminoácido 5' DDV 3' dentro do epítipo de SIRPa v1 da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25. Alternativamente, o kit compreende um par de iniciadores ambos capazes de anelar com as sequências de ácido nucleico que codificam SIRPa v1 ou SIRPa v2, deste modo permitindo a amplificação de uma porção do gene ou transcrito compreendendo pelo menos uma parte do éxon 3 de SIRPa, a dita porção compreendendo pelo menos a localização de SIRPa SNP 15 e SNP 16 como aqui definido acima ou nos exemplos da invenção ou a localização do SNP 17 de SIRPa como aqui definido acima ou nos exemplos da invenção; e a localização do códon que codifica o primeiro resíduo de aminoácido D dentro do epítipo de SIRPa v1 da SEQ ID No: 1 ou da SEQ ID No:4 ou da SEQ ID No: 25, o kit também compreendendo uma sonda (isto é, uma sonda de ácido nucleico), em particular, uma sonda marcada, capaz de anelar com uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos os resíduos de aminoácido 5' DDV 3' dentro do epítipo de SIRPa v1 da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25.

[0076] Também é provido um método in vitro ou ex vivo de

diagnóstico da severidade de uma doença, em particular, um método de diagnóstico adequado para o uso na medicina personalizada, em que um composto de anti-SIRPA v1 humana (isto é, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado), produzido de acordo com os métodos aqui descritos ou selecionados de acordo com os métodos aqui descritos, é usado para a detecção de células positivas para SIRPa v1 em uma amostra previamente obtida de um paciente, o dito método compreendendo a quantificação da expressão de SIRPa v1. A quantificação da expressão de SIRPa v1 pode ser avaliada de acordo com o método conhecido na técnica, por exemplo, através da quantificação de anticorpos ligados nas proteínas alvos.

[0077] Também é provido um método de auxiliar um médico em uma decisão de tratar um paciente com um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, o dito método compreendendo a determinação dos alelos de SIRPa do paciente, em particular, usando-se os compostos anti-SIRPA aqui divulgados ou genotipando-se e em que um tratamento com uma primeira dose terapêutica de um composto anti SIRPa v1 de acordo com a presente invenção é provavelmente eficaz em um paciente que é homozigoto para SIRPa v1; e em que um tratamento com um composto anti SIRPa v1 de acordo com a presente invenção é provavelmente ineficaz para um paciente que é homozigoto para SIRPa v2; e em que um tratamento com uma segunda dose terapêutica de um composto anti SIRPa v1 de acordo com a presente invenção é provavelmente eficaz em um paciente que é heterozigoto SIRPa v1/v2, em particular, em que a segunda dose terapêutica é maior do que a primeira dose terapêutica.

[0078] Também é provido um método de auxiliar um médico em um decisão de tratar um paciente com um anticorpo anti-SIRPA humana ou

fragmento de ligação ao antígeno ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, em que a dose terapêutica necessária para tratar o paciente com o composto de anti-SIRPA humana é diferente se o paciente é homozigoto para SIRPa v1/v1 ou heterozigoto SIRPa v1/v2.

[0079] Também é provida uma combinação de compostos compreendendo um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, em particular, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para qualquer uso aqui descrito, ou, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado produzido de acordo com qualquer método aqui descrito ou um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado selecionado de acordo com qualquer método aqui descrito, com pelo menos um segundo agente terapêutico. O segundo agente terapêutico pode ser selecionado do grupo que consiste em agente quimioterapêutico, agentes de radioterapia, agente imunoterapêutico, agentes de terapia celular, antibióticos e probióticos, em particular, um agente imunoterapêutico selecionado do grupo que consiste do bloqueador ou ativador do ponto de secagem das células imunológicas adaptativas, particularmente selecionadas do grupo que consiste em antiPDL1, anti-PD1, antiCTLA4, antiCD137, antiCD2, antiCD28, antiCD40, antiHVEM, antiBTLA, antiCD160, antiTIGIT, antiTIM-1/3, antiLAG-3, anti2B4, antiVISTA, antiOX40, agonista antiCD40, CD40-L, agonistas de TLR, antiICOS, ICOS-L, agonista de STING, inibidor de IDO, agonistas do vírus oncolítico e agonistas do receptor da célula B. A combinação de produtos é para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1. A composição pode ser, em particular, uma

composição farmacêutica. Tal composição pode compreender componentes farmacêuticamente aceitáveis, tais como, mas não limitados a um excipiente, carregador ou veículo farmacêuticamente adequados, quando usados para a administração sistêmica ou local. Um carregador ou veículo farmacêuticamente adequados se referem a um enchedor, diluente, material de encapsulação sólidos, semissólidos ou líquidos não tóxicos e formulações semelhantes à soluções salinas tamponadas com fosfato, água destilada, emulsões tais como emulsões de óleo/água, agentes de umectação e outros, dextrose, solução salina, etanol e combinações destes.

[0080] A invenção também está relacionada com uma combinação de compostos compreendendo:

(i) um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, que:

- liga especificamente à SIRPa v1 humana e/ou SIRPa v2, em particular, à SIRPa v1 humana e SIRPa humana v2 e que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 e/ou SIRPA v2, em particular, que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 e SIRPA v2;

- não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana; e, em particular, não liga especificamente à SIRPg humana;

- melhora a apresentação cruzada de um antígeno, em particular, um antígeno do câncer, pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, pelas células dendríticas, para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas;

(ii) pelo menos um segundo agente terapêutico selecionado do grupo que consiste em agente quimioterapêutico, agentes de radioterapia, agente imunoterapêutico, agentes de terapia celular, antibióticos e probióticos, em particular, um agente imunoterapêutico selecionado do grupo que consiste do bloqueador do ponto de checagem ou ativador das células imunológicas

adaptativas, particularmente selecionado do grupo que consiste em antiPDL1, anti-PD1, antiCTLA4, antiCD137, antiCD2, antiCD28, antiCD40, antiHVEM, antiBTLA, antiCD160, antiTIGIT, antiTIM-1/3, antiLAG-3, anti2B4, antiVISTA, antiOX40, agonista antiCD40, CD40-L, agonistas de TLR, antiICOS, ICOS-L, agonista de STING, inibidor de IDO, vírus oncolítico e agonistas do receptor da célula B;

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer.

[0081] Em uma modalidade particular, o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado liga especificamente à SIRPa v1 humana e inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1.

[0082] A invenção também se refere a uma combinação de compostos compreendendo um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, em particular, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para qualquer uso aqui descrito, ou, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado produzido de acordo com qualquer método aqui descrito ou um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado selecionado de acordo com qualquer método aqui descrito e pelo menos um antígeno emitido ou derivado do grupo consistindo em antígenos de Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos

mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos do gene CTNNB1, gene CASP8, gene hER2, gene p53, gene KRAS, gene NRAS ou antígenos tumorais, em particular, os antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais BCR-ABL, antígenos tumorais ETV6-AML1, antígeno de melanoma que codifica genes (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de ssx, antígenos de ny-eso-1, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, antígeno ERBB2 oncogênico, antígeno de tumor sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, o antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA). Tal combinação de compostos pode ser útil para o uso como um medicamento ou como uma composição de vacina ou para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1.

[0083] A invenção também provê uma combinação de compostos compreendendo:

(i) um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, que compreende:

um domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos

apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11, em particular, HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 11;

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15, em particular, HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15, em particular, HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 15;

e

um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID No: 16 e SEQ ID No: 17, em particular, um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 17;

e que melhora a apresentação cruzada de um antígeno, em particular, um antígeno do câncer, pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, pelas células dendríticas, para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas;

(ii) pelo menos um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígenos do Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos do gene *ctnnb1*, gene *casp8*, gene *her2*, gene *p53*, gene *kras*, gene *nrns* ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou

derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais de BCR-ABL, antígenos tumorais de ETV6-AML1, antígeno de melanoma que codifica os genes (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de ssx, antígenos de ny-eso-1, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, antígeno de ERBB2 oncogênico, antígeno tumoral de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA) ou qualquer antígeno mutado particular (neoantígeno ou neoepítipo);

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer e em que a apresentação cruzada do pelo menos um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, pelas células dendríticas, para as células T, em particular, células T CD8+, é aumentada.

[0084] A doença é, em particular, selecionada entre o grupo consistindo de uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica, em particular, uma doença infecciosa por *Pseudomonas* e Citomegalovírus, fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II e uma disfunção de transplante. A doença também pode ser selecionada do grupo que consiste em câncer, em particular, câncer

inflamatório e câncer com células mieloides infiltradas, particularmente com células MDSCs e/ou TAM infiltradas, metástase do câncer, em particular, metástase do câncer de mama, melanoma. Em uma modalidade particular, a doença é um câncer que compreende as células cancerosas que expressam o pelo menos um antígeno.

[0085] Em uma modalidade particular da invenção, a combinação compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em que o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, melhora a apresentação cruzada de um antígeno expressado na dita doença, em particular, um câncer e está envolvido na provocação de uma resposta da célula T adequada para o tratamento da dita doença.

[0086] Em uma modalidade particular da invenção, a combinação compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20, SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 22 e SEQ ID No: 23, em particular, o domínio variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 20.

[0087] Em uma modalidade particular da invenção, a combinação compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença compreende ou consiste em:

- Um domínio variável de cadeia pesada compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 20;
- Um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou

consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 17.

[0088] Os vírus tanto de DNA quanto de RNA foram mostrados ser capazes de causar o câncer em humanos. O Vírus de Epstein-Barr, papiloma vírus humano, Vírus da Hepatite B e Vírus da Herpes Humana-8 (HHV-8 também conhecida como vírus do herpes de sarcoma de Kaposi) são vírus de DNA que são capazes de causar o desenvolvimento de cânceres humanos. O vírus linfotrópico humano T do tipo 1 e os vírus hepatites C são dois vírus de RNA que contribuem para os cânceres em seres humano. Portanto, a administração de uma combinação de compostos compreendendo um composto de anti-SIRPA v1 humana e um antígeno emitido ou derivado destes vírus podem levar ao aumento da apresentação cruzada destes antígenos para as células T humanas e, portanto, podem aumentar a resposta contra as células cancerosas que apresentam tais antígenos.

[0089] A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de carcinoma, em particular, quando os antígenos virais são expressados, como no carcinoma cervical, carcinoma nasofaríngeo, hepatocarcinoma, sarcoma de Kaposi e algumas leucemias (Liao, 2006). A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de glioblastomas, em que as proteínas de citomegalovírus são expressadas. Como um exemplo, o carcinoma da célula de Merkel (MCC) é um câncer neuroendócrino crescentemente comum da pele e a causa principal da morte por câncer de pele que não melanoma e é descrito relacionado com o Poliomavírus da célula de Merkel (MCV), o primeiro poliomavírus diretamente ligado ao câncer humano (Chang and Moore, 2012). A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de cânceres cervicais, em que as proteínas do Vírus da Hepatite B são expressadas, e/ou em tumores do pescoço, cânceres de pele, em particular, em pacientes imunossuprimidos, e/ou cânceres anogenitais. A combinação dos compostos também é útil para o uso no tratamento de malignidades associadas com o

Vírus de Epstein-Barr, como linfomas das células B e células T como linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin, doença linfoproliferativa pós-transplante, leiomiossarcoma e carcinomas nasofaríngeos e alguns casos de câncer no estômago. A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de câncer relacionado com infecção por HIV, incluindo câncer anal, doença de Hodgkin, câncer de pulmão, cânceres da boca, cânceres da garganta, alguns tipos de câncer de pele e câncer de fígado.

[0090] A combinação dos compostos também é útil para o uso no tratamento de cânceres em que alguns peptídeos antigênicos resultam das mutações oncogênicas, em particular, antígenos emitidos dos genes CTNNB1, CASP8 e HER2 podem compreender mutações de ponto. Os tumores com uma alta taxa de mutação, tais como melanoma, carcinoma de pulmão ou instabilidade de microssatélite (MSI) vistos no carcinoma colorretal são esperados carregar mais antígenos mutados. Outros oncogenes também são ligados com vários cânceres P53, KRAS ou NRAS. Os peptídeos ou antígenos tumorais derivados das translocações cromossômicas tais como BCR-ABL em cânceres hematológicos ou ETV6-AML1 também são identificados. As mutações que permanentemente ativam o Oncogene *ras* são encontradas em 20% a 25% de todos os tumores humanos e até 90% em alguns tipos de câncer, como câncer pancreático. A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de cânceres em que os antígenos são codificados pelas células de linha germinal do câncer. Os antígenos tumorais relacionados com as células da linhagem germinal do câncer células são genes que codifica antígeno de melanoma (MAGE). Mais do que 25 genes funcionais no cromossomo X são definidos como genes MAGE (MAGEA, MAGEB e MAGEC) e MAGEA1, MAGEA2 e MAGEA3 são envolvidos em vários cânceres. Outros genes como BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO1, SSX, também relacionados com o cromossomo X, são expressados em vários cânceres e não em tecidos normais, exceto pelas células da linhagem germinal

e células trofoblásticas. NY-ESO-1 foi relatado ser expressado em aproximadamente 80% dos sarcomas de célula sinovial assim como de 10 a 50% dos melanomas metastáticos, cânceres de mama, ovarianos e de pulmão. MAGEA3 é um dos TAA's mais frequentemente expressados (Antígeno Associado ao Tumor) em uma variedade de tumores, incluindo melanoma. Os peptídeos ou antígenos tumorais que derivam de ciclina-A1, uma proteína com propriedades pró-proliferativas e antiapoptóticas, foram identificados. Estes antígenos são expressados nos testículos e leucemia mieloide aguda.

[0091] A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de cânceres em que as células cancerosas expressam os antígenos com baixa especificidade tumoral. A maioria dos antígenos de diferenciação identificados estão presentes nas células de melanoma, mas também em células saudáveis. Os peptídeos ou antígenos tumorais derivados das proteínas tais como tirosinase, gp100/pmel17, Melan-A/MART-1, gp75/TRP1 ou TRP2 são frequentes em pacientes com melanoma e voluntários saudáveis. MART-1, gp100, CEA, CD19 são antígenos de diferenciamento tissular, CD19 é um antígeno de tumor que somente é expressado em células B normais e malignas. Os peptídeos ou antígenos tumorais também foram identificados do antígeno específico da próstata (PSA) e a fosfatase ácida prostática (PAP), duas proteínas expressadas na próstata normal e tecidos tumorais da próstata. O antígeno carcinoembrionário (CEA) é muitas vezes altamente expressado no câncer colorretal e outros tumores epiteliais que também estão presentes em um nível mais baixo em uma variedade de células epiteliais normais do trato intestinal, mas também nos carcinomas colorretais, gástricos, pancreáticos, pulmonar de célula não pequena e mama. A alfafetoproteína (AFP) e CEA são antígenos oncofetais produzidos nos estágios precoces do desenvolvimento embrionário e normalmente desaparecendo quando o sistema imunológico é desenvolvido, mas aberrantemente presente em alguns cânceres como Carcinoma Hepatocelular. CA-125 (antígeno 125 de

carcinoma ou MUC16 conhecida como mucina 16) é elevado no câncer ovariano epitelial, mas pode ser expressado em vários cânceres ginecológicos (endometriais, tromba de Falópio) e cânceres não ginecológicos (pancreático, mama, cólon e pulmão). A superexpressão de MUC1 (Mucina 1, proteína associada à superfície celular) é frequentemente associada com os cânceres do cólon, mama, ovariano, pulmonar, do trato gastrointestinal e pancreático.

[0092] A combinação dos compostos também é útil para o uso no tratamento de cânceres em que as células cancerosas superexpressam os antígenos tumorais. Os antígenos superexpressados são compartilhados por vários tipos de tumores. hTERT, EGFR, mesotelina são proteínas normais superexpressadas pelas células cancerosas. hTERT (transcriptase reversa de telomerase humana) é um antígeno de tumor comum expressado em cerca de 85% de todos os cânceres. Vários peptídeos antigênicos ou antígenos tumorais foram relatados ser “superexpressados,” um exemplo interessante de antígeno superexpressado é o peptídeo codificado pelo gene MOK - RAGE-1 em um carcinoma da célula renal. O RAGE-1 também está expressado nos tumores de diferentes tipos histológicos. Os antígenos emitidos do gene PRAME também são superexpressados em vários tipos de tumor, mas expressados em baixos níveis em vários tecidos normais. Outros genes superexpressados incluem aqueles derivados do inibidor de proteína de apoptose sobrevivente, a proteína p53 do tipo selvagem ou o oncogene e fator de crescimento ERBB2 (HER2/NEU) que é superexpressado em muitos tumores epiteliais tais como carcinoma ovariano e mamário. O HER2 é expressado em muitos tumores epiteliais e superexpressados em aproximadamente 25% de todos os carcinomas mamários primários onde a superexpressão de HER2 é associada com prognósticos ineficazes. Os antígenos tumorais de Sialila-Tn (STn) (antígeno de carboidrato da região de núcleo) são encontrados em cânceres de mama metastáticos e outros cânceres. Os peptídeos ou antígenos tumorais também foram identificados os quais são

derivados da proteína de tumor 1 de Wilms (WT1 inicialmente descrito nos casos hereditários do tumor de Wilms). Este é um fator de transcrição expressado em níveis de 10 a 1000 vezes mais altos em células leucêmicas contra as normais e também superexpressado na leucemia aguda, leucemia mielogênica crônica e síndrome mielodisplásica. A mesotelina é uma glicoproteína da superfície celular com células mesoteliais de expressão normal limitada revestindo a pleura, peritônio e pericárdio mas também é altamente expressada em muitos cânceres, incluindo mesotelioma maligno, câncer pancreático, câncer ovariano, adenocarcinoma pulmonar, câncer endometrial, câncer biliar, câncer gástrico e leucemia mieloide pediátrica aguda (Hassan *et al*, 2016).

[0093] A combinação de compostos também é útil para o uso no tratamento de cânceres em que os antígenos mutados específicos de tumor são expressados. O antígeno mutado pode ser descrito através de métodos de identificação (com base no sequenciamento de exomas ou espectrometria de massa) e classificado como antígeno tumoral personalizado. Estes também são um alvo específico para a combinação de compostos de acordo com a invenção que aumenta a apresentação cruzada destes antígenos. MA-1 inicialmente descrito em melanoma, B-catenina, CDK4, ERBB2IP, são exemplos de antígenos mutados específicos de tumor. CEA, HER2, MUC-1, carboidrato antígenos (Tn, TF, STn), p53 - um gene inibidor de tumor mutado em cânceres, hTERT e WT1 são antígenos mutados específicos de tumor envolvidos nos cânceres de mama.

[0094] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a qualquer combinação de compostos acima aqui para o uso simultâneo, separado ou sequencial na prevenção, tratamento ou vacinação de qualquer condição ou qualquer doença suscetíveis de serem melhoradas ou prevenidas, em particular, a condição ou doença suscetível de ser melhorada é uma condição ou uma doença em que a CD47 está envolvida, em particular, em que o CD47

é superexpressado, a dita condição ou doença sendo, em particular, selecionada do grupo que consiste em câncer, em particular, câncer inflamatório e câncer com células mieloides infiltradas, particularmente com células MDSCs e/ou TAM infiltradas, uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, um doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica, em particular, Pseudomonas e doença infecciosa de CMV, fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II, melanoma e uma disfunção de transplante, em particular, melanoma, em particular, em um câncer em que as células cancerosas superexpressam CD47.

[0095] Em um aspecto, a invenção diz respeito a um produto de combinação como definido acima, para o uso simultâneo, separado ou sequencial no tratamento de qualquer condição suscetível de ser melhorada ou prevenida pelo diferenciamento das células supressoras monocíticas derivadas de mieloide (Mo-MDSC) em células não supressoras.

[0096] Em uma modalidade, a invenção diz respeito a um método de tratamento de qualquer condição suscetível de ser melhorada ou prevenida pelo diferenciamento das células monocíticas supressoras derivadas de mieloide (Mo-MDSC) em células não supressoras em um paciente em necessidade mesmo compreendendo administrar simultaneamente, separadamente ou sequencialmente aos ditos pacientes, uma quantidade eficaz de um produto de combinação como definido acima, os ditos pacientes sendo positivos para SIRPa v1.

[0097] Em uma modalidade, a invenção diz respeito ao uso de um produto de combinação como definido acima na fabricação de um medicamento para o tratamento de qualquer condição suscetível de ser melhorada ou prevenida pelo diferenciamento das células monocíticas supressoras derivadas de mieloide (Mo-MDSC) em células não supressoras,

os ditos pacientes sendo positivos para SIRPa v1.

[0098] Em um aspecto, a invenção diz respeito a um produto de combinação como definido acima, para o uso simultâneo, separado ou sequencial no tratamento de qualquer condição suscetível de ser melhorada ou prevenida modificando-se a polarização de macrófago aos macrófagos pró-inflamatórios.

[0099] Em uma modalidade, a invenção diz respeito a um método de tratamento de qualquer condição suscetível de ser melhorada ou prevenida modificando-se a polarização de macrófago para os macrófagos pró-inflamatórios em um paciente em necessidade do mesmo compreendendo administrar simultaneamente, separadamente ou sequencialmente aos ditos pacientes uma quantidade eficaz de um produto de combinação como definido acima, os ditos pacientes sendo positivos para SIRPa v1.

[00100] Em uma modalidade, a invenção diz respeito ao uso de um produto de combinação como definido acima na fabricação de um medicamento para o tratamento de qualquer condição suscetível de ser melhorada ou prevenida modificando-se a polarização do macrófago aos macrófagos pró-inflamatórios.

[00101] Em um aspecto, a invenção diz respeito a um produto de combinação como definido acima, para o uso simultâneo, separado ou sequencial no tratamento de uma patologia selecionada do grupo que consiste em um câncer, uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica (tal como com *Pseudomonas* ou CMV), fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II e uma disfunção de transplante ou para o uso na vacinação.

[00102] Em uma modalidade, a invenção diz respeito a um método de tratamento de uma patologia selecionada do grupo que consiste em um câncer,

uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica tal como com *Pseudomonas* ou CMV), fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II e uma disfunção de transplante de um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar simultaneamente, separadamente ou sequencialmente aos ditos pacientes uma quantidade eficaz de um produto de combinação como definido acima.

[00103] Em uma modalidade, a invenção diz respeito ao uso de um produto de combinação como definido acima, na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma patologia selecionada do grupo que consiste em um câncer, uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica (tal como com *Pseudomonas* ou CMV), fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II e uma disfunção de transplante ou para o uso na vacinação.

[00104] A invenção também se refere a qualquer combinação de compostos como aqui descrito.

[00105] A invenção também se refere a um método *in vitro* ou *ex vivo* de auxiliar um médico em uma decisão para tratar um paciente com um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, mais particularmente em que um anticorpo anti-SIRPA v1 humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado deve ser administrado ao paciente, o dito método compreendendo a determinação da presença de SIRPa v1 em uma amostra biológica previamente obtida do paciente, a dita SIRPa v1 sendo, em particular, detectada por um anticorpo

anti-SIRPA v1 humana como aqui definido ou produzido como aqui definido ou um composto selecionado de acordo com os métodos aqui divulgados e em que a presença de SIRPa v1 na amostra biológica é indicativa que o tratamento é provavelmente eficaz.

[00106] A invenção também se refere a um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para o uso no tratamento ou prevenção de uma condição em que o paciente recebendo o tratamento é positivo para SIRPa v2, um método para produzir e ou selecionar um anticorpo anti-SIRPA v2 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado. Tal anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para o uso inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 e não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e, em particular, não previne ou inibe a ligação ou CD47 humana à SIRPg humana. Tal anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado pode ter as mesmas capacidades de ligação que os compostos de anti-SIRPA v1 humana descritos na presente invenção, exceto que estas capacidades são relacionadas com sua ligação à SIRPa humana v2. Além disso, tal composto de anti-SIRPA humana v2 pode ter pelo menos uma das seguintes características, em particular, uma pluralidade, em particular, todas das seguintes características:

- O mesmo liga com SIRPa humana v2 com uma afinidade (KD) de pelo menos $10E-8$ M, em particular, pelo menos $10E-9$ M, mais preferivelmente pelo menos $10E-10$ M; e/ou
- o mesmo diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2; e/ou
- o mesmo não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à

SIRPa v1 humana; e/ou

- o mesmo não inibe a proliferação da célula T humana; e/ou
- o mesmo não inibe a ativação da célula T humana; e/ou
- o mesmo melhora a ativação dos macrófagos; e/ou
- o mesmo melhora a apresentação cruzada de pelo menos um

antígeno pelas células que apresentam antígeno para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas.

[00107] A invenção também diz respeito ao uso de um polipeptídeo, em particular, um antígeno, para a produção e/ou para a seleção de um anticorpo anti-SIRPA humana v2 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso. Portanto, é aqui provido um polipeptídeo útil, em particular, para a produção de anticorpo anti-SIRPA humana v2, e/ou para a seleção e/ou a produção de tal anticorpo, e/ou para testar a afinidade de ligação de tal anticorpo. Para esta finalidade, também é provido um polipeptídeo, em particular, um antígeno, compreendendo ou consistindo em epítipo de SIRPa v1 humana que consiste em SEQ ID No: 2 (KGSPDT) ou SEQ ID No: 29 (KFRKGSPDTE) ou SEQ ID No: 30 (TEFKSGAGTELSVR) para o uso na seleção de um anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno, que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 e que não previne ou diminui a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana, em particular, que não liga especificamente à SIRPa v1 humana, em particular, que não liga especificamente à SIRPg humana.

[00108] Tal polipeptídeo pode ser usado como o polipeptídeo compreendendo o epítipo de SIRPa v1 humana, para a produção e/ou para a seleção do composto de anti-SIRPA humana v2. A invenção também é relacionada com um polinucleotídeo que codifica tal polipeptídeo, como detalhado para SIRPa v1. As combinações de compostos podem compreender

tal Composto de anti-SIRPA humana v2 ao invés do Composto de anti-SIRPA v1 humana. Os métodos *ex vivo* ou *in vivos* de avaliar a probabilidade de eficácia de um tratamento podem ser direcionados para a detecção de um paciente positivo para SIRPa-v2 ou para a detecção de SIRPa v2, por exemplo, usando-se um composto de anti-SIRPA humana v2 ou detectando-se um alelo de SIRPa v2 como aqui definido.

[00109] A invenção também diz respeito a uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com a invenção (também indicado como um Composto de anti-SIRPA humana) ou uma combinação de compostos compreendendo um composto anti-SIRPA como aqui descrito; a dita composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêutico, em que a dita composição farmacêutica opcionalmente também compreende um ingrediente ativo diferente. Consequentemente, uma composição farmacêutica também é provida, a dita composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado e pelo menos um ingrediente farmacêuticamente aceitável ou compatível. O termo “ingrediente farmacêuticamente aceitável ou compatível” se refere a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitáveis com os quais um anticorpo anti-SIRPA humana, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado podem ser administrados. A composição farmacêutica pode ser administrada através da administração local, em particular, administração subcutânea, administração intratumoral.

[00110] Um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para o uso de acordo com a invenção podem ser administrados

por injeção, por intermédio de um cateter, por meio de um supositório ou por meio de um implante, o implante sendo de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo uma membrana, tal como uma membrana sialástica ou uma fibra, em particular, para a liberação de longa duração. Em outras modalidades, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para o uso de acordo com a invenção podem ser liberados em um sistema de liberação controlado. Em outras modalidades, um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado para o uso de acordo com a invenção pode ser administrado como composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de ligação e um ou mais ingredientes farmacêuticamente compatíveis. Por exemplo, a composição farmacêutica tipicamente inclui um ou mais carregadores farmacêuticamente aceitáveis (por exemplo, líquidos estéreis, tais como água e óleos, incluindo aqueles de petróleo, origem animal, vegetal ou sintético, tal como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e outros). A água é um carregador mais típico quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. As soluções salinas e a dextrose aquosa e as soluções de glicerol também podem ser utilizadas como carregadores líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Os excipientes farmacêuticos adequados incluem, por exemplo, amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó, glicerol, propileno glicol, água, etanol e outros. A composição, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes de umectação ou emulsificação ou agentes de tamponamento de pH. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, tabletes, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação sustentada e outros. A composição pode ser formulada como um supositório,

com aglutinantes e carregadores tradicionais tais como triglicerídeos. As formulações orais podem incluir carregadores padrão tais como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc. Os exemplos de carregadores farmacêuticos adequados são descritos em “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin. Tais composições conterão uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto, tipicamente na forma purificada, junto com uma quantidade adequada de carregador de modo a prover a forma para a administração apropriada ao paciente.

[00111] Nas modalidades típicas, a composição farmacêutica é formulada de acordo com procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptada para a administração intravenosa aos seres humanos. Tipicamente, as composições para a administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotônico estéril. Onde necessário, as composições farmacêuticas também podem incluir um agente de solubilização e um anestésico local tal como lignocaína para aliviar a dor no local da injeção. Geralmente, os ingredientes são fornecidos separadamente ou misturados juntos na forma única de dosagem, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado sem água em um recipiente hermeticamente fechado tal como uma ampola indicando a quantidade de agente ativo. Onde a composição farmacêutica deve ser administrada por infusão, esta pode ser dispensada com uma garrafa de infusão contendo água de grau farmacêutico estéril ou solução salina. Onde a composição farmacêutica é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina pode ser provida de modo que os ingredientes podem ser misturados antes da administração.

[00112] Além disso, a composição farmacêutica pode ser provida como um kit farmacêutico compreendendo (a) um recipiente contendo um composto de ligação de anti-SIRPA v1 humana (por exemplo, um anticorpo ou derivado) na forma liofilizada e (b) um segundo recipiente contendo um

diluyente farmacêuticamente aceitável (por exemplo, água estéril) para injeção. O diluyente farmacêuticamente aceitável pode ser usado para a reconstituição ou diluição do composto liofilizado de anti-SIRPA v1 humana. Opcionalmente associado com tal(is) recipiente(s) pode estar um aviso na forma prescrita por uma agência governamental regulando a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação da agência de fabricação, uso ou venda para a administração humana. Alternativamente, o kit pode ser adequado para for local administração, em particular, a administração subcutânea ou a administração oral e portanto compreendendo um recipiente enchido antecipadamente, como uma seringa enchida antecipadamente ou um dispositivo sem agulha, como um frasco, em particular, quando a composição deve ser administrada de modo subcutâneo ou oral, respectivamente.

[00113] A quantidade do composto de anti-SIRPA humana (por exemplo, anticorpo ou derivado) que é eficaz no tratamento ou prevenção de uma doença ou para a vacinação contra uma doença pode ser determinada através de técnicas clínicas padrão.

[00114] A invenção também está relacionada com o composto anti-SIRPA para o uso de acordo com a invenção em combinação com um outro tratamento terapêutico ou profilático, em particular, em combinação com radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, estimuladores ou inibidores de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), agonistas do eSTimulador dos Genes de INterferona (STING), fármacos para câncer pró-apoptóticos, fármacos para câncer antiangiogênicos.

[00115] Em uma modalidade particular da invenção, o composto anti-SIRPA para o uso de acordo com a invenção é provido em combinação com um neoantígeno ou um neoepítipo, em que o composto anti-SIRPA aumenta a apresentação cruzada dos ditos neoantígenos ou dos ditos neoepítipos pelas células apresentadoras de antígeno para as células T humanas, em particular,

para as células T CD8+ humanas. Os neoantígenos e neoepítomos podem ser identificados ou detectados dentro de um tumor através de métodos conhecidos na técnica.

[00116] A invenção também diz respeito a um método para avaliar a probabilidade de eficácia de um tratamento com um anticorpo anti-SIRPA v1 humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, dentro de um paciente humano, o dito método compreendendo:

- a determinação da presença de SIRPa v1 humana em uma amostra biológica previamente obtida do paciente humano; e quando o paciente humano é positivo para SIRPa v1;

- a administração de uma quantidade terapêutica de: um anticorpo anti-SIRPA ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, aqui divulgado; ou de qualquer combinação aqui divulgada; ou qualquer composto aqui divulgado.

[00117] Tal método é particularmente de interesse quando o paciente humano foi diagnosticado com um câncer ou é provável de desenvolver um câncer. Em uma modalidade preferida, o tratamento com um anticorpo anti-SIRPA ou fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo modificado do mesmo é provavelmente eficaz quando o paciente humano tem pelo menos um alelo de SIRPa v1, isto é, quando a amostra biológica do paciente humano é positiva para SIRPa v1.

[00118] A determinação da presença de SIRPa v1 em uma amostra biológica de um paciente pode ser realizada através de qualquer método conhecido na técnica que permite a determinação dos alelos que codificam a SIRPa em um paciente humano. Tais métodos são, por exemplo, mas não limitados a classificação celular como FACS, genotipagem, sequenciamento genético, hibridização in situ, Western blot, ELISA e outros.

[00119] A invenção também abrange as seguintes modalidades:

1. Um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, que compreende:

a) um domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11,

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15;

e

b) um domínio variável de cadeia leve compreendido da sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 16 ou na SEQ ID No: 17;

em que o anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e que não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2;

para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença em um paciente que é positivo para SIRPa v1.

2. O anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com a modalidade 1,

em que o domínio variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 18 ou na SEQ ID No: 19 ou na SEQ ID No: 20; ou na SEQ ID No: 21; ou na SEQ ID

No: 22; ou na SEQ ID No: 23, em particular, o domínio variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 20;

em que o domínio variável de cadeia leve compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 17

3. O anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com a modalidade 1 ou 2, em que a doença é selecionada do grupo que consiste em uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica, em particular, uma doença infecciosa por *Pseudomonas* e Citomegalovírus, fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II e uma disfunção de transplante.

[00120] 4. O anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com a modalidade 1 ou 2, em que a doença é selecionada do grupo que consiste em um câncer, em particular, câncer inflamatório e câncer com células mieloides infiltradas, particularmente com células MDSCs e/ou TAM infiltradas, melanoma ou em que o uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2 é para a vacinação terapêutica contra uma destas doenças, em particular, uma vacinação terapêutica contra melanoma.

[00121] 5. O anticorpo anti-humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com a modalidade 4, em que a doença é um câncer e em que pelo menos um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígenos do Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-

Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos de gene *ctnnb1*, gene *casp8*, gene *her2*, gene *p53*, gene *kras*, genes ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais de BCR-ABL, ETV6-AML1 antígenos tumorais, genes que codificam o antígeno de melanoma (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de *ssx*, antígenos de *ny-eso-1*, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, antígeno ERBB2 de oncogene, antígeno de tumor de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), é expressado ou foi detectado no paciente.

[00122] 6. O anticorpo anti-SIRPA humano ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 5, em que o anticorpo é administrado a um paciente positivo para SIRPa v1 apresentando uma doença em que CD47 é superexpressado nas células, em particular, nas células cancerosas, em particular, em um câncer em que CD47 é superexpressado pelas células cancerosas.

[00123] 7. O anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao

antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 6, que tem as seguintes propriedades:

- O mesmo não liga especificamente à SIRPa humana v2; e
- O mesmo não inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg

humana;

e opcionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

- O mesmo liga com SIRPa v1 humana com uma afinidade de pelo menos $1E-9$ M; e/ou

- O mesmo não liga especificamente à SIRPg humana; e/ou

- O mesmo não inibe a ativação e/ou a proliferação das células T humanas *in vivo*; e/ou

- O mesmo melhora a ativação dos macrófagos; e/ou

- O mesmo melhora a apresentação cruzada de pelo menos um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno para as células T humanas, em particular, para as células T CD8+ humanas.

[00124] 8. Uso de um polipeptídeo, em particular, uso de um antígeno compreendendo ou consistindo da epítomos de SIRPa v1 humana que consiste em SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25, em particular, compreendendo ainda pelo menos um dos epítomos de SIRPa v1 humana que consiste em SEQ ID No: 5 e/ou SEQ ID No: 6 [epítomos lineares]; e/ou SEQ ID No: 7 e/ou SEQ ID No. 8 [epítomos conformacionais], na produção ou na seleção de um anticorpo anti-SIRPA v1 humana ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado que liga especificamente à SIRPa v1 humana e que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e que não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2.

[00125] 9. Uso de um polinucleotídeo que codifica um antígeno de SIRPa v1 humana, os ditos polinucleotídeo isolados que codificam um

epítopo de SIRPa v1 humana compreendendo os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25, em particular, também compreendendo pelo menos um epítopo da SIRPa v1 humana compreendendo ou consistindo em resíduo de aminoácido da SEQ ID No: 5 e/ou SEQ ID No: 6 [epítomos lineares], e/ou SEQ ID No: 7 e/ou SEQ ID No: 8 [epítomos conformacionais], para a produção de um polipeptídeo de acordo com a modalidade 8, em particular, um antígeno.

[00126] 10. Um método de preparar um anticorpo anti-SIRPA v1 humana, o dito método compreendendo imunizar um animal não humano, em particular, um mamífero não-humano, com pelo menos um antígeno como definido na modalidade 9 ou com pelo menos um antígeno compreendendo ou consistindo em epítopo de SIRPa v1 humana que consiste em SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25; e, em particular, coletar o soro resultante ou células B dos ditos animais não humanos imunizados para obter anticorpos direcionados contra os ditos antígenos, em particular, em que o antígeno compreende ou consiste dos epítomos de SIRPa v1 humana que consiste em SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 e pelo menos um dos epítomos da SIRPa v1 humana que consiste em SEQ ID No: 5; e/ou da SEQ ID No: 6; e/ou da SEQ ID No: 7 e/ou da SEQ ID No: 8.

[00127] 11. Um método de aumentar a apresentação cruzada de um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, células dendríticas, para as células T, em particular, para as células T CD8+, os dito método compreendendo a administração a um paciente de um composto selecionado do grupo que consiste em anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, o dito composto tendo pelo menos as seguintes propriedades:

1. Este não liga especificamente à SIRPa humana v2; e
2. Este liga à SIRPa v1 humana com uma afinidade de pelo

menos 1E-9 M; e

3. Este diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana; e

4. Este não previne a inibição da ligação de CD47 humana à SIRPa v2; e opcionalmente

o dito composto tendo opcionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

i) este não inibe a proliferação da célula T; e/ou

ii) Este não inibe a ativação da célula T; e/ou

iii) o mesmo melhora a ativação dos macrófagos; e/ou

iv) o mesmo não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana.

[00128] 12. Um método *in vitro* ou *ex vivo* de auxiliar um médico em uma decisão para tratar um paciente com um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou um anticorpo modificado, mais particularmente em que um anticorpo anti-SIRPA v1 humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado deve ser administrado ao paciente, o dito método compreendendo a determinação da presença de SIRPa v1 em uma amostra biológica previamente obtida do paciente, a dita SIRPa v1 sendo, em particular, detectada por um anticorpo anti-SIRPA v1 humana como definido na presente invenção ou produzido como definido na presente invenção ou um composto selecionado de acordo com a presente invenção e em que a presença de SIRPa v1 na amostra biológica é um indicativo de que o tratamento é provavelmente eficaz.

[00129] 13. O método de acordo com a modalidade 10 em que o anticorpo recuperado de anti-SIRPA v1 humana liga especificamente à SIRPa v1 humana com uma afinidade de pelo menos 1E-9 M e que não liga

especificamente à SIRPa humana v2, em particular, em que o anticorpo recuperado de anti-SIRPA v1 humana é um antagonista da ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana e não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 e SIRPg humana.

[00130] 14. Um método de selecionar e recuperar um composto do grupo que consiste em um anticorpo, um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado, o dito método compreendendo pelo menos as seguintes etapas:

a) Testar a capacidade do composto para ligar especificamente à SIRPa v1 humana, e

b) Testar a capacidade do composto de diminuir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana; e

c) Testar a capacidade do composto de não prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2; e

d) Testar a capacidade do composto de ligar aos resíduos de aminoácido D e V localizados respectivamente nas posições 130 e 132 da SIRPa da SEQ ID No: 3; ou localizados respectivamente nas posições 100 e 102 da SIRPa da SEQ ID No: 25

e opcionalmente:

e) Testar a capacidade do composto de não ligar especificamente à SIRPa humana v2; e/ou

f) Testar a capacidade do composto de não ligar especificamente à SIRPg humana; e/ou

g) Testar a capacidade do composto de não prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPg humana,

em que o composto recuperado tem as seguintes propriedades:

1. Este liga especificamente à SIRPa v1 humana;

2. Este diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa

v1 humana; e

3. Este não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2;

e opcionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

4. Este não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRP γ humana; e/ou

5. Este liga à SIRPa v1 humana com uma afinidade de pelo menos $1\text{E}-9\text{ M}$; e/ou

6. Este não liga especificamente à SIRP γ humana; e/ou

4. Este não liga especificamente à SIRPa humana v2.

[00131] 15. O método de selecionar e recuperar um composto de acordo com a modalidade 14 também compreendendo pelo menos uma das seguintes etapas:

v) Testar a proliferação da célula T na presença do composto; e/ou

vi) Testar a ativação da célula T na presença do composto; e/ou

vii) Testar a ativação do macrófago na presença do composto; e/ou

viii) Testar a apresentação cruzada de um antígeno, em particular, um antígeno de tumor, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, células dendríticas, para as células T humanas na presença do composto, em particular, a apresentação cruzada do antígeno pelas células dendríticas para as células T CD8 $^{+}$ humanas,

em que o composto recuperado tem pelo menos uma das seguintes propriedades:

1. O mesmo não inibe a proliferação da célula T humana; e/ou

2. O mesmo não inibe a ativação da célula T humana; e/ou

3. O mesmo melhora a ativação dos macrófagos; e/ou

4. O mesmo melhora a apresentação cruzada de um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno para células T humanas.

[00132] 16. Um método de diagnóstico *in vitro* ou *ex vivo* da severidade de uma doença em um paciente humano, em particular, um método de diagnóstico adequado para o uso na medicina personalizada, em que um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno como definido em qualquer modalidade da presente invenção ou produzidos como definido na presente invenção ou um composto selecionado de acordo com a presente invenção, é usado para a detecção das células positivas para SIRPa em uma amostra biológica previamente obtida de um paciente e em que a expressão de SIRPa v1 é opcionalmente quantificada.

[00133] 17. Um método de diagnóstico *in vitro* ou *ex vivo* da severidade de uma doença em um paciente humano, em particular, um método de diagnóstico adequado para o uso na medicina personalizada, em que um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação ao antígeno como definido em qualquer modalidade da presente invenção ou produzido como definido em qualquer modalidade da presente invenção ou um composto selecionado de acordo com qualquer modalidade da presente invenção, é usado para a detecção das células positivas para SIRPa em uma amostra biológica previamente obtida de um paciente e em que a expressão de SIRPa v1 é opcionalmente quantificada.

[00134] 18. Uma composição compreendendo o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou anticorpo modificado para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 7 e pelo menos um veículo farmacêutico.

[00135] 19. Um kit compreendendo o anticorpo, fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação ao antígeno ou

anticorpo modificado para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 7 e 18 e um dispositivo adequado para um local administração, em particular, um dispositivo de liberação subcutâneo ou oral, em particular, um dispositivo compreendendo uma seringa enchida antecipadamente ou, em particular, um dispositivo sem agulha.

[00136] 20. Uma combinação de compostos compreendendo um anticorpo de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 7 ou produzido de acordo com qualquer modalidade aqui divulgada ou um composto selecionado de acordo com qualquer modalidade aqui divulgada e pelo menos um antígeno emitido ou derivado do grupo consistindo em antígenos de Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos do gene de *ctnnb1*, gene de *casp8*, gene de *her2*, gene de *p53*, gene de *kras*, gene de *nras* ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais de BCR-ABL, antígenos tumorais de ETV6-AML1, genes que codificam o antígeno de melanoma (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de *ssx*, antígenos de *ny-eso-1*, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, antígeno de oncogene ERBB2, antígeno de tumor de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-

catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), para o uso como um medicamento ou como uma composição de vacina, para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1.

[00137] 21. Um mimético de anticorpo de ligação ao antígeno que:
- liga especificamente à SIRPa v1 humana e inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa v1 humana;
- não previne ou inibe a CD47 humana à SIRP humana; e, em particular, não liga especificamente à SIRPg humana;

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em que o mimético de anticorpo de ligação ao antígeno melhora a apresentação cruzada de um antígeno expressado na dita doença, em particular, o dito câncer e está envolvido na provocação de uma resposta da célula T adequada para o tratamento da dita doença.

[00138] 22. O mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com a modalidade 21 que é usado na prevenção e/ou no tratamento de uma doença em um paciente que é positivo para SIRPa v1.

[00139] 23. O mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com a modalidade 21 ou 22, em que a doença é um câncer, em particular, um câncer inflamatório, um câncer com células mieloides infiltradas, mais particularmente com células dendríticas e/ou células MDSCs e/ou TAM infiltradas, metástase do câncer, em particular, metástase do câncer mama, melanoma ou em que o uso de acordo com a modalidade 21 ou 22 é para a vacinação terapêutica contra uma destas doenças, em particular, uma vacinação terapêutica contra o melanoma.

[00140] 24. O mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso

de acordo com qualquer uma das modalidades de 21 a 23, que tem as seguintes propriedades:

- O mesmo não liga especificamente à SIRPa humana v2;
- O mesmo não inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana, em particular, este não liga especificamente à SIRPg humana;
- O mesmo liga com SIRPa v1 humana com uma afinidade de pelo menos $10E-9$ M;
- O mesmo melhora a apresentação cruzada de pelo menos um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno às células T humanas, em particular, pelas células dendríticas, em particular, para as células T CD8+ humanas.

[00141] 25. O mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com a modalidade 24, que também tem pelo menos uma das seguintes propriedades:

- O mesmo não inibe a ativação e/ou a proliferação das células T humanas *in vivo*, e/ou
- O mesmo melhora a ativação dos macrófagos.

[00142] 26. O mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 21 a 25, que também compreende pelo menos um veículo farmacêutico.

[00143] 27. O mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 21 a 26, em que a doença é um câncer e em que pelo menos um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígenos do Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos de gene *ctnnb1*, gene *casp8*, gene *her2*, gene *p53*, gene *kras*, gene

nras ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais de BCR-ABL, antígenos tumorais de ETV6-AML1, genes que codificam o antígeno de melanoma (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de ssx, antígenos de ny-eso-1, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, oncogene ERBB2 antígeno, antígeno de tumor de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), é expressado ou foi detectado no paciente.

[00144] 28. Mimético de anticorpo de ligação ao antígeno para o uso de acordo com qualquer uma das modalidades de 21 a 27, também compreendendo pelo menos um antígeno emitido ou derivado do grupo consistindo em antígenos de Papiloma Vírus Humano, Vírus de Epstein-Barr, Poliomavírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus da Herpes Humana 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos de gene *ctnnb1*, gene *casp8*, gene *her2*, gene *p53*, gene *kras*, gene *nras* ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em *ras* oncogene, antígenos tumorais de BCR-ABL, antígenos tumorais de ETV6-AML1, genes que codificam o antígeno de melanoma (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE,

antígenos de ssx, antígenos de ny-eso-1, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno de fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno de transcriptase telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, oncogene ERBB2 antígeno, antígeno de tumor de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MUM-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), para o uso como um medicamento ou como uma composição de vacina, para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1.

Breve descrição dos desenhos

[00145] **Figura 1. Alinhamento das sequências da família SIRP.** Alinhamento da sequência da proteína de domínio distal de membrana de SIRPa variantes v1 e v2, SIRPb e SIRPg e localização de SNPs dentro da sequência de proteína (setas numeradas de 1 a 16). O retângulo cinza corresponde às sequências de sinal de peptídeo, sublinhados em negrito representam epítomos lineares reconhecidos por um anticorpo anti-SIRPA humana, os retângulos tracejados cinzas representam os epítomos configuracionais reconhecidos por um anticorpo anti-SIRPA v1 humana. As SEQ ID NOs. 32 a 35 correspondem respectivamente às sequências mencionadas na Fig. 1 como “P78328_SIRPA_HUMANA_Variante 1”; “SIRPA_HUMANA_Variante”; “O00241_SIRPB_HUMANA”; e “Q9P1W8_SIRPG_HUMANA”.

[00146] **Figura 2. Ligação de anticorpos de SIRPa contra SIRPa humana variantes V1 e V2 expressadas pelos monócitos do sangue.**

Doadores saudáveis já sequenciados para o exon 3 de SIRPa foram selecionados. Pela classificação celular ativada por fluorescência (FACS), a ligação de anticorpo anti-SIRPA interno (Anti-SIRPA v1-FITC no lado esquerdo do desenho) e o SE7C2 comercial (no lado direito do desenho), foram testados nos monócitos de sangue a partir de doadores selecionados de homozigotos SIRPa V1/V1 e SIRPa V2/V2 assim como a heterozigotos SIRPa V1/V2.

[00147] **Figura 3. Atividade de antagonista de um anticorpo anti-SIRPA v1 humana nos monócitos de sangue a partir de doadores que são doadores homozigotos para SIRPa v1/v1, doadores heterozigotos SIRPa v1/v2 ou doadores homozigotos SIRPa v2/v2.** O ensaio de competição por FACS de um anticorpo anti-SIRPA v1 humana na interação SIRPa-CD47 usando células de doador homozigoto ou heterozigoto. Uma resposta de dose de anticorpo anti-SIRPA v1 humana foi usada para competir com a ligação de CD47 às variantes de SIRPa de doadores diferentes. A porcentagem da ligação de CD47 são normalizadas para o controle e os resultados são representados para cada um dos doadores de célula: V2/V2 homozigoto (triângulo), V1/V2 heterozigoto (quadrado) e homozigoto V1/V1 (círculo).

[00148] **Figura 4. O estudo de ligação de variantes de SIRPa usando anticorpo anti-SIRPA v1 humana e anticorpo Kwar pelo ELISA.** A avaliação da ligação pelo ELISA sobre variantes mutadas de SIRPa imobilizada (SIRPa de v1 a v8, ver a Tabela 2 no exemplo 1) ligada ao domínio Fc de camundongo. O anticorpo anti-SIRPA v1 humana e anticorpo Kwar (conhecido ligar tanto à SIRPa v1 quanto SIRPa v2) foram comparados quanto à sua capacidade para ligar as variantes mutadas de SIRPa diferentes. A revelação foi realizada com um anticorpo anti-humano de burro e revelada pela colorimetria a 450 nm usando o substrato TMB. ED50 (ng/ml) é a concentração do anticorpo indicado para atingir 50% do sinal neste ensaio.

[00149] **Figura 5. Apresentação cruzada a antígeno de**

camundongo pelas células dendríticas (DCs). DCs de camundongos foram pré-carregadas com antígeno de Ovalbumina e depois cultivadas com células T transgênicas de camundongos OTI ou OTII (Transgênicos para a sua expressão de TCR dedicada a OVA MHC I ou II). A proliferação da célula T foi medida pela incorporação de timidina (células T OTI CD8+ ou T OTII CD4+) em condições diferentes: controle sem nenhum Ag (círculo vazio) ou controle de anticorpo isótipo (cruzes), anticorpos anti-SIRPA P84 de camundongos (quadrado) e MY1 (círculo) ou anticorpo antiCD47 (triângulo). A: resultados obtidos nas células T OTI CD8 positivas. B: resultados obtidos nas células T OT-II CD4 positivas.

[00150] **Figura 6. Apresentação cruzada a antígeno humano pelas células dendríticas.** Monócitos de HLA-A2+ HV foram fenotipados para SIRPa e monócitos tanto homozigotos (v1/v1) quanto heterozigotos (v1/v2) foram usados em dois tipos de experimentos. A. Expressão de IL-2 em células T CD8+. Os resultados obtidos com DCs imaturas homozigotas para SIRPa v1 são representados com um círculo e aqueles obtidos com DCs imaturas heterozigotas para SIRPa v1/v2 com um quadrado. DCs imaturas carregadas com Melan-A foram usadas para ativar o clone de timoma específico para Melan-A/HLA-A2+ que foi medido pela secreção de IL-2 depois de 48 horas de cultura. B. Expressão de IFN γ em células T CD8+ estimuladas com iDC carregada com Melan-A. As iDCs foram previamente incubadas durante a fase de carga com anticorpos diferentes: anti-SIRPA v1 (círculo), anti-SIRPA/g (quadrado), anti-SIRPA v1 + anti-SIRPA/g (diamante), B6H12 (triângulo invertido) e CC2C6 (triângulo). A expressão de IFN γ foi avaliada pela citometria de fluxo.

[00151] **Figura 7. Resposta alogênica das células T (células positivas em CD4 e CD8) para anticorpos anti-SIRPA v1 humana e antiCD47 humana na presença das células dendríticas.** As células T humanas isoladas a partir das células mononucleares de sangue periférico a

partir de voluntários saudáveis foram estimuladas com células dendríticas alogênicas (DC) e, uma razão de 5 células T:1 DC durante 5 dias. Os anticorpos foram adicionados no dia 0 da cultura. A: Proliferação medida pela incorporação de H^3 -tiamidina durante as últimas 12 horas de cultura. B: Porcentagem de secreção de IFN γ medida pelo ELISA. Os resultados foram normalizados para as condições do controle. Anti-SIRPA v1 (quadrado) corresponde às células tratadas com um anticorpo interno específico para SIRPa v1, que não liga SIRPa v2 e SIRPg. mAb CD47 (triângulo) corresponde às células tratadas com um anticorpo que se liga à CD47.

[00152] **Figura 8. Bioensaio de polarização de macrófago comparando monócitos de doador V1/V1 e V1/V2 tratados com anticorpo anti-SIRPA v1.** As secreções de MIP-1a/CCL-3 e MIP-1b/CCL-4 foram medidas pelo ELISA em sobrenadante das células não tratadas (círculo) ou tratadas com um anticorpo anti-SIRPA v1 humana (quadrado). A: resultados obtidos com células de doadores homozigotos V1/V1. B: resultados obtidos com células de doadores heterozigotos V1/V2.

[00153] **Figura 9. Análise de ligação de anticorpos anti-SIRPA em monócitos homozigotos humanos para SIRPa v2 pelo FACS e determinação do ED₅₀ do anticorpo contra SIRPa v2 pelo ELISA.** A avaliação pela citofluorometria nos monócitos humanos v2/v2 (previamente tingidos com inibidor de ligação do receptor Fc humano) de anticorpo 18D5 quimérico ou anticorpo SIRP29 ou anticorpos anti-SIRPA humanizados diferentes. A revelação foi realizada com um mAb Fc anti-humano de camundongo rotulado com PE no citômetro Cantoll. ED₅₀ é a concentração do anticorpo indicado para atingir 50% do sinal. A: Média da Intensidade de Fluorescência de células v2/v2 positive tingidas. B: determinação da ED₅₀ pelo ELISA para cada anticorpo. A ED₅₀ não foi detectável para a maioria dos anticorpos 18D5 humanizados.

[00154] **Figura 10. Análise de competição pelo Blitz de CD47 na**

proteína recombinante SIRPg humana pré-incubada com anticorpos anti-SIRP. A proteína recombinante SIRPg-His foi imobilizada em um biossensor NINTA a 10 µg/ml e os anticorpos indicados foram adicionados a 20 µg/ml (concentração de saturação). Depois CD47Fc foi adicionado a 100 µg/ml e valores de afinidade foram deduzidos depois de um período de associação (k_a) de 120 s seguido por um período de dissociação de 120 s (k_d) para determinar a constante de afinidade (KD). A afinidade KD de CD47 à SIRPg foi determinada em condições diferentes: na presença do anticorpo LSB2.20 (um anticorpo que se liga especificamente à SIRPg); o anticorpo kwar e os anticorpos SIRP29.

[00155] **Figura 11. Efeito de anticorpos anti-SIRPA sobre modelo de metástase de camundongos de câncer mamário.** O modelo de câncer mamário 4T1 foi usado para estudar a eficiência de anti-SIRPA de camundongo (anticorpo p84 e anticorpo MY-1) sobre a metástase pulmonar. A figura representa os números de nódulos de metástase pulmonar em camundongos tratados ou não com anticorpos anti-SIRPA. Os camundongos tratados com o controle isotópico são representados com um diamante, os camundongos tratados com o anticorpo p84 são representados com um círculo e aqueles tratados com o anticorpo MY-1 são representados com um quadrado. Os resultados são significantes entre o controle e cada anticorpo anti-SIRPA.

Exemplos

Exemplo 1: Identificação do epítopo que permite a produção de anticorpos anti-SIRPA V1 humana

[00156] A SIRPa humana foi previamente descrita apresentar certo nível de polimorfismo no domínio IgV 1 que interage com CD47. O mesmo polimorfismo está principalmente localizado no éxon 3 do gene SIRPa (SEQ ID No: 27) (Takenaka et al., 2007). Em 37 sequências genômicas de doadores diferentes de origens diferentes, Takenaka *et al.* identificou 10 diferentes

sequências/alelos, com 2 alelos principais: variante 1 (v1) e variante 2 (v2). Outros alelos diferem das sequências de V1 ou V2 em somente 1 ou 2 SNPs. Portanto, a família de SIRPa é subdividida em duas subfamílias: isoformas de SIRPa v1 e isoformas de SIRPa v2. Estes diferentes alelos levam a proteínas levemente diferentes, mas todas as variantes ligam similarmente ao ligante CD47. A frequência de v1 em Takenaka *et al.* é de 78% (89% para V1 e semelhante a V1) enquanto a frequência de genótipos para os doadores semelhantes aos homozigotos V1/V1 é de 65%. 24% de seus 37 doadores totais apresentaram um genótipo heterozigoto.

DNA DE CODIFICAÇÃO E SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNA DE SIRPA V1 E V2:

[00157] A sequência humana SIRPa V1 foi obtida em ncbi (gene ID: 140885).

[00158] Sequência de referência do DNA genômico de SIRPa v1 éxon 3 (transcrito SIRPA-201 ID ENST00000400068,7) (SEQ ID No: 27):

GAGTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGC
CTGACAAGTCCGTGTTGGTTGCAGCTGGAGAGACAGCCACTCTGC
GCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGGGGCCCATCCAGTGGTT
CAGAGGAGCTGGACCAGGCCGGAATTAATCTACAATCAAAAAGA
AGGCCACTTCCCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGACCTCACAAAGAG
AAACAACATGGACTTTTCCATCCGCATCGGTAACATCACCCCAGCA
GATGCCGGCACCTACTACTGTGTGAAGTTCCGGAAAGGGAGCCCC
GATGACGTGGAGTTTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTG
CGCG

Sequência de aminoácidos de uma SIRPa v1 (referência Genbank NP_001035111.1 (UniProtKB: P78324) (SEQ ID No: 3):

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQ
PDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGH
FPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCVKFRKGSPDDVEF

KSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITL
 KWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICE
 VAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVR
 KFYPQRLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWMSWLLVNV
 AHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGS
 NERNIYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEK
 NAREITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPA
 SEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

Sequência de aminoácidos de uma SIRPa v2 (SEQ ID No: 28):

A sequência de proteína Variante 2 foi referenciada em Takenaka *et al.*, 2007. A sequência codificadora de DNA foi obtida em ncbi (GenBank: BC075849,1). Nenhuma sequência genética foi encontrada para esta variante no banco de dados ncbi.

[00159] MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQ
 PDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHF
 PRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSG
 AGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF
 KNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICEVAH
 VTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFY
 PQRLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHR
 DDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNER
 NIYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA
 REITQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPASE
 DTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

Sequência de referência do DNA genômico de SIRPa v2 éxon 3 (SEQ ID No: 31):

GAGTGGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGC
 CTGACAAGTCCGTATCAGTTGCAGCTGGAGAGTCGGCCATTCTGCA
 CTGCACTGTGACCTCCCTGATCCCTGTGGGGCCCATCCAGTGGTTC

AGAGGAGCTGGACCAGCCCCGGGAATTAATCTACAATCAAAAAGAA
 GGCCACTTCCCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGAGTCCACAAAGAGA
 GAAAACATGGACTTTTCCATCAGCATCAGTAACATCACCCCAGCA
 GATGCCGGCACCTACTACTGTGTGAAGTTCCGGAAAGGGAGCCCT
 GACACGGAGTTTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGT
 GC

As sequências de aminoácidos do domínio D1 de SIRPa v1, SIRPa v2, SIRPb e SIRPg foram alinhadas como ilustrado na Fig. 1.

FREQUÊNCIA DA ANÁLISE DE GENÓTIPOS POR BIOINFORMÁTICA

[00160] Para explorar mais dados no polimorfismo de SIRPa no ser humano, dados de “1000 Genomes project” (1KG, > 2500 genomas humanos diferentes) foram usados para identificar as SNPs relevantes na SIRPa humana éxon 3. Os inventores identificaram que os SNPs de SIRPa segregaram em 2 blocos de haplotipo usando Haploview (dados não mostrados).

[00161] Para explorar a frequência de genótipos e analisar as diferenças entre doadores homozigotos e heterozigotos, os inventores primeiro identificaram 18 SNPs (Tabela 1) dentro da SIRPa humana éxon 3 (o éxon polimórfico conhecido da literatura e o éxon responsável da ligação com o ligante) e os SNPs retidos associados com uma mudança de códon (mudança na sequência de aminoácidos). As SNPs foram numeradas de 1 a 18. 1 SNP não foi analisado desde que não conhecido na literatura. SNP7 e SNP18 não foram analisados em termos de frequência de genótipos visto que ambos correspondem ao códon sinônimo (nenhuma mudança no nível de proteína). Os inventores depois identificaram os alelos de SNPs e as frequências genotípicas com o projeto de 1000 genomas fase 3 que inclui mais do que 5000 doadores de 5 super populações: n = 1030 do leste asiático (EAS), n = 1010 Europeus (EUR), n = 1338 africanos (AFR), n = 704 Americanos misturados (AMR) e n = 988 do Sul da Ásia (SAS). Todos os

indivíduos do projeto 1000 genomas fase 3 estão sendo considerados.

	Mutações do nucleotídeo (SIRPa v1 - SIRPa v2)	Posição e mutações do aminoácido (SIRPa v1 – SIRPa v2)	Número rs
SNP1	g-a	44 L-S	rs386811660
SNP2	a-t	50 T-S	rs17855609
SNP3	a-g	51 A	rs17853846
SNP4	c-t	52 T-I	rs17855610
SNP5	g-a	54 R-H	rs17855611
SNP6	c-t	57 A-V	rs17855612
SNP7	t-c	60 L	rs17853847
SNP8	g-c	75 G-a	rs1057114 (=rs72620874)
SNP9	c-g	95 D-E	rs138283486
SNP10	c-t	96 L-S	rs149634649
SNP11	t-c	97 T	rs146163282
SNP12	a-g	100 N-E	rs17855613
SNP13	c-a	101 N	rs17855614
SNP14	c-a	107 R-S	rs17855615
SNP?	g-a	109 G-S	
SNP15+ SNP16	gt - ac	132 V - T	rs115287948 rs114499682
SNP17 =(SNP15 + SNP16)	gt - ac	132 V – T	s386811663
SNP18	c - t	145 R	rs6136375

Tabela 1: Identificação de SNPs nas SIRPa variantes e suas posições de aminoácido

[00162] Depois, os inventores aglomeraram os SNPs fisicamente adjacentes com uma frequência aproximadamente semelhante (<1% de diferença) e as frequências médias destes SNPs aglomerados foram representadas graficamente em um gráfico de pizza de acordo com a genética da população. Eles finalmente realizaram uma correlação com o epítipo de anticorpo anti-SIRPa humana v1 interno (visto que o mesmo apresenta baixa ligação nos doadores de V2/V2 e bloqueia de maneira ineficaz a ligação de CD47 em V2/V2, dados não mostrados) determinado por dois métodos (métodos lineares ou configuracionais). Estes também levaram em consideração os SNPs associados com uma mutação no SIRP gama (visto que o anticorpo interior não liga à SIRP gama). Finalmente, os inventores também reforçaram esta análise comparando-se as diferenças de sequências entre a SIRPa humana V1, SIRPa humana V2 e mutações encontradas em macacos cinomolgo (*Macaca fascicularis*) ou reso (*Macaca mulatta*) visto que os

anticorpos internos não têm reatividade cruzada com o macaco.

RELAÇÕES da LIGAÇÃO Anti-SIRPA COM SNPs:

[00163] Método: A atividade de ligação dos anticorpos anti-SIRPAs foi avaliada por ELISA. Para o ensaio de ELISA, o anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno e anticorpo Kwar foram testados em 8 hSIRPa mutados diferentes (SIRPA v1 a v8; ver a tabela 2). As variantes diferentes da hSIRPa mutada (SIRPa v1 a v8) foram imobilizadas em plástico a 0,5 µg/ml em tampão de carbonato (pH 9,2) e o anticorpo purificado foi adicionado à ligação de medição. Depois da incubação e lavagem, o IgG de macaco anti-humano rotulado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch; EUA; referência 709-035-149) foi adicionado e revelado através de métodos convencionais.

[00164] Resultados: De modo a avaliar o impacto dos SNPs de SIRPa humana nas capacidades de ligação do anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno, 8 diferentes proteínas de SIRPa humana recombinantes foram geradas (Tabela 2). Os domínios extracelulares destas proteínas de SIRPa foram fundidas com o camundongo Fc de IgG2a e a capacidade de ligação do anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno a aquelas variantes de SIRPa foram avaliadas (Fig. 4). O anticorpo interno perde sua propriedade de ligação em ELISA quando os SNPs 15+16 são mutados na sequência de V1 (Fig. 4A). Nos experimentos divulgados no presente pedido, o anticorpo anti-SIRPA humana v1 usado corresponde a um anticorpo com um domínio variável de cadeia pesada compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 20; e um domínio variável de cadeia leve compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos da SEQ ID No: 17. Outra mutação SNPs não altera a propriedade de ligação do anticorpo interno. Em comparação, as propriedades de ligação de KWAR23 (que é descrito ligar tanto a V1 quanto a V2) não foram modificadas com qualquer uma das mutações de SNPs (Fig. 4B), confirmando que a proteína SIRPa V8 (SNPs 15+16) é funcional e que um antígeno compreendendo um epítipo localizado

nas adjacências de SNPs 15 + 16 permite a produção de anticorpos anti-SIRPA V1 que não reconhece ou liga especificamente à SIRPa v2.

SIRPa V1
SIRPa V2
SIRPa V3 (SNP1+2+3+4+5+6)
SIRPa V4 (SNP8)
SIRPa V5 (SNP9+10+11)
SIRPa V6 (SNP12+13)
SIRPa V7 (SNP14+?)
SIRPa V8 (SNP15+16)

Tabela 2: Proteínas SIRPa recombinantes

IMPACTO DO POLIMORFISMO DE SIRPA NAS PROPRIEDADES DOS ANTICORPOS – ENSAIO DE ANTAGONISTA SIRPA-CD47 POR FACS EM MONÓCITOS

[00165] MÉTODO: Monócitos humanos (purificados pela elutriação de humano PBMC na plataforma DTC, Nantes e congelados em DMSO a 10 M/ml a -80° C ou nitrogênio líquido) foram descongelados em 40 mL de meio RPMI completo. Depois imediatamente centrifugados a 1000 rpm durante 10 min+ As células são recolocadas em suspensão em 10 ml de meio de RPMI e contadas na célula de Malassez. Os monócitos humanos congelados são descongelados, as amostras diluídas são adicionadas e CD47Fc biotinilado é adicionado em seguida. O CD47Fc biotinilado é depois revelado com estreptavidina-PE e a fluorescência é medida por citometria de fluxo. O seguinte protocolo foi aplicado: - Colocar 100.000 monócitos humanos por poço na Placa P96 com fundo em V; - Centrifugar 1 min a 2500 rpm e esvaziar os poços sacudindo a placa; - lavar as células 2 vezes com 200 µL de PSE (Centrifugar por 1 min a 2500 rpm e esvaziar poços); - Preparar 8 diluições da amostra começando com 10 µg/mL (2 x concentrada, concentração final de 5 µg/mL) e diluir em etapas de 3; - Adicionar 12,5 µL de amostra/reservatório nas células e misturar; - Incubar 15 min em gelo; - Preparar a solução biotinilada de CD47Fc concentrada 2 x, determinada em função do parágrafo e adicionar 12,5 µL desta solução/poço nas células e misturar. - Incubar 30 min em gelo; - Adicionar 175 µL de PSE/w-Centrifuga

1min a 2500 rpm e esvaziar os poços; - Lavar as células 2 vezes com 200 µL de PSE (Centrifugar 1 min a 2500 rpm e esvaziar os poços). Uma concentração intermediária é escolhida para o CD47Fc biotinilado. Aqui, 5 µg/mL de CD47Fc biotinilado são tomados para o teste de antagonista. Esta etapa deve ser realizada todas as vezes porque a porcentagem das células positivas para CD47 depende do doador individual; - Diluir a estreptavidina-PE a 1/1000, Adicionar 25 µL/w-Incubar 15 min em gelo; - Adicionar 175 µL de PSE/w; - Centrifugar 1 min a 2500 rpm e esvaziar os poços; - Lavar as células 2 vezes com 200 µL de PSE (Centrifugar 1 min a 2500 rpm e esvaziar os poços); - Transferir as células tingidas na placa de canto P96 de fundo em V e ler em BD canto II.

[00166] RESULTADOS: os inventores analisaram as propriedades de ligação do anticorpo de anti-SIRPA v1 interno através da citometria de fluxo nos monócitos do sangue de doadores saudáveis já sequenciados para a SIRPa éxon 3 (Fig. 2). Eles selecionaram doadores heterozigotos V1/V1, doadores homozigotos V2/V2 assim como a doadores heterozigotos V1/V2. A Figura 3 mostra que o anticorpo anti-SIRPA humana v1 liga significativamente menos em doadores V2/V2. Em comparação, os inventores verificaram que um mAb anti-SIRPA comercial (clone SE7C2) liga somente à proteína V2. Os dados de SE7C2 mostram que os doadores V2/V2 expressam níveis similares de proteína SIRPa na sua superfície se comparado aos doadores V1/V2, confirmando que a ligação reduzida do anticorpo anti-SIRPA humana v1 em V2/V2 não é devido à expressão inferior, mas à baixa ligação deste anticorpo a esta proteína de SIRPa v2 (Fig. 2).

[00167] Depois os inventores analisaram por citometria de fluxo a propriedade do antagonista de anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno para prevenir a ligação de proteína de ligação CD47 humana recombinante nos monócitos do sangue de doadores saudáveis (Fig. 3). Para estudar o impacto do polimorfismo de SIRPa no efeito antagonístico na ligação de CD47-Fc, um

ensaio antagonístico foi realizado em monócitos humano congelados genotipados para SIRPa. Os dados ilustrados na Figura 3 mostram que o anticorpo anti-SIRPA humana v1 antagoniza muito a ligação de CD47 em doadores V1/V1 ($n = 3$) enquanto apenas reduz pela metade a ligação de CD47 nos doadores de V1/V2 heterozigotos ($n = 5$). A ação fraca do antagonista (25%) do anticorpo anti-SIRPA humana v1 foi observada em doadores homozigotos V2/V2 ($n = 3$). Como mostrado na Figura 3, o anticorpo interno reconheceu SIRPa V1 e reconheceu muito fracamente a SIRPa V2. Isto indica que o anticorpo interno tem um efeito antagonístico forte na ligação de CD47-Fc em monócitos humanos que foram V1/V1 homozigotos para SIRPa, um efeito antagonístico muito fraco nos monócitos de V2/V2 humanos homozigotos e um efeito antagonístico intermediário nos monócitos humanos V1/V2 heterozigotos.

CONCLUSÃO

[00168] O polimorfismo de SIRPa não foi descrito afetar a ligação de CD47, mas pode afetar o reconhecimento pelos anticorpos monoclonais anti-SIRPA humana. Múltiplas variantes foram determinadas por Takenaka *et al.* com uma alta homologia de sequência com as sequências V1 ou V2. Outras variantes representam diferentes combinações entre as sequências V1 e V2 e podem ser consideradas como variantes semelhantes a V1 ou semelhantes a V2 dependendo da maioria do seu genótipo. Estes resultados foram confirmados com os dados de 1000 genomas que mostram que existem duas variantes principais para SIRPa: V1 e V2. A Variante 1 é a mais frequente na população mundial, exceto na super população do leste asiático. As análises de SNPs na presente invenção mostraram que as frequências de alelo de SIRPa V1 (V1/V1 e V1/V2) relevantes para o epítipo que permite a produção e/ou seleção de anticorpos anti-SIRPA V1 humana é entre 76 a 86% nos US e EU e pacientes homozigotos V1/V1 representam entre 40 e 50% das populações do US e EU (com base nas frequências do SNPs 15 e 16). A

análise do inventar em $n = 184$ doadores mostrou que o anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno ligou fortemente a 83 a 86% dos v1 doadores (V1/V1 e V1/V2). Os doadores homozigotos V1/V1 representam entre 40 e 50% do grupo analisado. Enquanto o ensaio do antagonista de CD47 mostrou de uma maneira interessante que o anticorpo interno preveniu apenas metade da ligação, os ensaios funcionais na polarização de macrófago mostrados na Figura 8 e a apresentação cruzada de antígeno de tumor pelas células dendríticas humanas mostrada na Figura 6 mostraram o anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno tem a mesma eficácia biológica tanto nos doadores V1/V1 quanto V1/V2.

Exemplo 2: Comparação do bloqueio da interação de SIRPa-CD47 na apresentação imune cruzada entre camundongo e ser humano

APRESENTAÇÃO CRUZADA DE CAMUNDONGO (fig. 5)

[00169] FÁRMACOS: O anticorpo monoclonal do antagonista alostérico alvejando o domínio 2 dos camundongos SIRP α (clone da IgG1 P84 de rato) foi purificado do hibridoma. O anticorpo do antagonista ortostérico monoclonal alvejando o domínio 1 do camundongo SIRPa (clone MY-1–camundongo IgG2a) (Garcia *et al.*, 2011) foi reengenheirado em um domínio Fc de IgG1 do hibridoma parental. Ambos os anticorpos anti-SIRPAs bloqueiam a sinalização através de SIRPa nas células mielóides. A IgG1 de camundongo de controle de isótipo (clone 3G8) foi purificada. O anticorpo monoclonal antiCD47 de camundongo antagonístico substituto (clone MIAP410) foi adquirido da BioXCell (#BE0283).

[00170] EXPRESSÃO DE SIRPa DE CAMUNDONGO PELAS DCs ESPLÊNICAS: DCs naturais foram isoladas do baço de camundongos ingênuos pela seleção magnética positiva em CD11c e separadas quanto à sua expressão de CD8 α pela classificação celular com um FACS ARIA II da BD. Como descrito na literatura, CD8 α +/+DC, que são as melhores células de apresentação a antígeno (APC) para a apresentação cruzada, expressam níveis

baixos a negativos de SIRPa enquanto CD8 α -/-DC expressam SIRPa (e são conhecidas apresentar de modo cruzado menos eficientemente a antígenos).

[00171] FUNÇÃO DE APRESENTAÇÃO A ANTÍGENO PELAS DCs ESPLÊNICAS: De acordo com a literatura, as SIRPa baixo/neg CD8 α +/+DC são as melhores células de apresentação a antígeno (APC) para a apresentação cruzada a antígeno (Ag) comparadas com as CD8 α -/-DC (expressando altos níveis de SIRPa) (Haan *et al.*, 2000; Hochrein *et al.*, 2001). Entretanto, os dois subtipos de DC carregaram e apresentaram Ag exógeno nas moléculas MHC de classe II equivalentemente. Os inventores mostraram que o protocolo usado para avaliar o papel de SIRPa na apresentação cruzada a Ag com células TOVA e OT-I reproduz estas propriedades das DC (dados não mostrados). De fato, as CD8 α +/+DC induziram uma melhor proliferação de células T OT-I (de camundongos transgênicos em TCR específicas de Ovalbumina CD8+) do que CD8 α -/-DC indicando um melhor processamento de Ag, carregando e apresentando nas moléculas de MHC classe I ao passo que a apresentação a antígeno exógena é alta para ambos os subtipos de DCs esplênicas como observadas com a proliferação de célula T OT-II (de camundongos transgênicos em TCR específicas de Ovalbumina CD4+). Assim, a expressão de SIRPa está inversamente correlacionada com a capacidade das células dendríticas para apresentar cruzado a antígeno para células T CD8+, sugerindo que SIRPa reprime a apresentação cruzada em camundongos.

[00172] APRESENTAÇÃO CRUZADA A ANTÍGENO DE CAMUNDONGO: CD8 α +/+e CD8 α -/-DC foram carregadas com ovalbumina (OVA) durante a noite na presença de GM-CSF. Depois, as células T CD8+ isoladas do baço dos camundongos transgênicos em OT-I e células T CD4+ isoladas do baço dos camundongos transgênicos em OT-II foram cultivadas com subtipos de DC carregadas com OVA durante 3 dias. Os camundongos transgênicos expressam TCR específico de OVA MHC I (OT-I) e II (OT-II).

A proliferação foi avaliada pela incorporação de H3-timidina durante as últimas 16 horas de cultura. mAb anti-SIRPA foi adicionado a 10 µg/ml durante a incubação de DC com proteína OVA e durante a proliferação da célula T com DC carregadas com OVA. O mesmo protocolo permite avaliar o impacto do bloqueio de SIRPa durante o processamento da proteína pelas DCs e depois apresentação de peptídeo de OVA pelas moléculas MHC classe I pelas DC para células T CD8 OT-I e pelas moléculas MHC classe II para células T CD4 OT-II salientando a apresentação cruzada a antígeno e a apresentação a antígeno exógeno respectivamente.

[00173] Os inventores mostram que o bloqueio de SIRPa ou CD47 em camundongo potencializou a apresentação a antígeno pelas células dendríticas esplênicas SIRPa+. As CD8α+/+DC (SIRPa baixo/neg) não foram afetadas pelo bloqueio do caminho de SIRPa/CD47 com respeito à sua capacidade para apresentar cruzado OVA para células T OT-I (não mostrado). Entretanto, o bloqueio de SIRPa por P84 ou anticorpos de bloqueio MY-1 ou CD47 por MIAP410 melhora a apresentação cruzada a Ag pelas DC CD8α-/SIRPa+ refletido pelo aumento na proliferação de CD8+ OT-I (Figura 5A).

[00174] APRESENTAÇÃO A ANTÍGENO EXÓGENO: os inventores analisaram o efeito do bloqueio de SIRPa/CD47 sobre a apresentação a Ag exógeno, eles verificaram que a apresentação a Ag pelas SIRPa baixo/neg-CD8α+/+DC não foi modificada pelo bloqueio do caminho de SIRPa/CD47 (não mostrado). Similar ao processo de apresentação cruzada, o bloqueio de SIRPa/CD47 no processamento e apresentação a antígeno exógeno aumentou CD8α-/DC positivas em SIRPa nas moléculas MHC classe II como medido pela proliferação de célula CD4+ OT-II (Figura 5B).

CONCLUSÃO

[00175] Os inventores demonstraram que bloquear o caminho de SIRPa/CD47 (com mAbs anti-SIRPA ou antiCD47) no camundongo aumentou tanto a apresentação cruzada a antígeno MHC-I (resposta T CD8)

quanto a apresentação a antígeno MHC-II (resposta T CD4). Estes resultados confirmaram o que foi sugerido por outros tais como (Liu *et al.*, 2016, 2015; Xu *et al.*, 2017).

APRESENTAÇÃO CRUZADA HUMANA (fig. 6)

[00176] FÁRMACOS: O anticorpo monoclonal antagonístico alvejando a SIRPα humana (anticorpo interno de SIRPα anti-humano v1 – IgG4 humana) foi gerado e purificado pelos inventores. A IgG4 humana de controle de isótipo foi adquirida da Biolegend (clone QA16A15). O anticorpo monoclonal antagonístico alvejando a CD47 humana (clone B6H12) foi adquirido da BioXCell (#BE0019-1) e o clone CC2C6 da BioLegend (#TBD2) foram usados. Em alguns experimentos, o anticorpo anti-SIRPA:g (clone SIRP29 da WO201356352) foi usado sozinho ou em combinação com o anticorpo anti-SIRPA V1 interno.

[00177] RESPOSTA ESPECÍFICA DE MELAN-A: a apresentação cruzada pelas células humanas foi avaliada pela apresentação de um peptídeo longo (25-mer, que implica que o peptídeo não pode “acoplar” nas moléculas MHC Classe I sem ser processado) do antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA) pelas HLA-A2+ DCs às células T específicas de TCR que reconhecem especificamente complexos de HLA-A2/Melan-a. Duas células T específicas de TCR diferentes foram usadas para avaliar a apresentação cruzada a antígeno. A primeira foi um clone de linfócito T de um paciente com melanoma que é específica para estes complexos de HLA-A2/Melan-a (generoso presente do Dr. N. Labarrière, Univ. Nantes, França, Vignard *et al.*, J. Immunol 2005). O segundo clone foi uma linhagem de célula de timoma de murino transgênico transduzida com o TCR do mesmo clone de célula T do paciente com melanoma e transfectada com o correceptor de CD8 humano. As DCs foram geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue de voluntários saudáveis HLA-A2+ (HV; voluntários do Etablissement Français de Sang, Nantes). Entrementes, os monócitos foram

fenotipados quanto ao polimorfismo de SIRPa. Depois de 7 dias de cultura com GM-CSF e IL-4, as DCs imaturas (iDCs) foram induzidas. Depois as iDCs foram carregadas durante a noite com o peptídeo de 25-mer de comprimento de Melan-a na presença de anticorpos antagonísticos alvejando o caminho de SIRPa/CD47 e finalmente independentemente cultivadas com os dois clones de célula T específicos de Melan-a/HLA-A2 diferentes. O clone de célula T humano do paciente com melanoma foi cultivado com iDC carregadas com Melan-a durante 5 horas e a ativação da célula T avaliada pela citometria de fluxo pelo tingimento intracelular de IFN γ .

[00178] O clone de timoma transgênico em TCR foi cultivado com iDC carregadas com Melan-a durante 48 horas e a ativação da célula T foi avaliada pelo ELISA durante a secreção de IL-2.

[00179] Para validar o protocolo, as iDCs carregadas com Melan-a de doadores negativos em HLA-A2 foram usadas como um controle negativo, assim como as iDCs não carregadas de HLA-A2+ HV. Os resultados (não mostrados) mostraram que apenas as iDC carregadas com Melan-a HLA-A2+ foram capazes de induzir a secreção de IFN γ pelos clones de célula T humana. A secreção de IL-2 pelas células de timoma de murino foi apenas medida em doadores positivos em HLA-A2 e comparada com as DCs carregadas com HLA-A2-Melan-a (dados não mostrados) demonstrando a especificidade dos dois clones de célula T específicos de HLA-A2/Melan-a diferentes.

[00180] Os monócitos de HLA-A2+ HV foram fenotipados para SIRPa e os monócitos tanto homozigotos para V1 quanto heterozigotos para V1/V2 foram incluídos em 2 experimentos diferentes.

[00181] CLONE DE CÉLULA DE TIMOMA ENGENDRADO *IN VITRO*: depois de 48 horas de estimulação do clone de célula de timoma transgênico em TCR com as iDCs humanas carregadas com Melan-a, a secreção de IL-2 foi medida. Nesta primeira leitura da apresentação cruzada

ao antígeno, os inventores observaram um aumento da secreção de IL-2 pelo clone de timoma na maioria dos doadores quando SIRPa foi bloqueada por um anticorpo anti-SIRPA específico (anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno) durante o carregamento de Melan-a e o ensaio de estimulação (Fig. 6A). Nenhuma diferença foi observada entre os doadores homozigotos para V1 e heterozigotos para V1/V2 de DCs.

[00182] CLONE DE CÉLULA T HUMANA DE PACIENTE COM MELANOMA: depois de 5 horas de estimulação dos clones de célula T CD8 humanas com iDC humanas carregadas com Melan-a, a expressão de IFN γ foi avaliada pela citometria de fluxo. A Figura 6B representa a expressão de IFN γ nas células T CD8+. SIRPa ou CD47 foram bloqueadas durante o carregamento de Melan-a e durante a estimulação de célula T. Vários anticorpos foram testados: um anti-SIRPA humana v1; um anti-SIRPA/g (SIRP29), antiCD47 (B6H16 e CC2C6). A Figura 6B mostra que o bloqueio de SIRPa pelo anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno levou a um aumento da expressão de IFN γ pelas células T humanas específicas de antígeno de tumor induzido pela iDC de doadores homozigotos ou heterozigotos. Interessantemente, os inventores mostraram que o efeito positivo do bloqueio de SIRPa na apresentação a Ag não foi restrita às iDCs homozigotas em SIRPa v1 visto que aumento similar foi observado na maioria dos doadores heterozigotos para V1/V2. Inesperadamente, ao contrário da apresentação cruzada de camundongo, os inventores verificaram no ser humano que os dois mAbs antiCD47 não tiveram nenhum impacto positivo sobre a secreção de IFN γ na maioria dos doadores e piorou fortemente a supressão do nível basal de ativação de célula T na maioria dos doadores. Mais surpreendentemente, um anti-SIRPA que não é específico de SIRPa mas também liga SIRPg e inibe a ligação de CD47 à SIRPg, não induz a expressão de IFN γ pelas células T indicando que a apresentação cruzada pelas iDC para células T é específica do anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno. Surpreendentemente,

a adição do anticorpo de SIRPa/g não seletivo ao anticorpo SIRPa v1 seletivo interno impede a secreção aumentada de IFN γ pelo bloqueio seletivo de SIRP alfa e não gama. Estes resultados obtidos nos seres humanos com diferentes anticorpos antiCD47 e anticorpo anti-SIRPA/g não foram previstos com respeito aos resultados em modelos de camundongo e explicariam alguns resultados interessantes dos inventores mostrando que a proliferação de célula T policlonal humana e a reação a linfócito misto humana foram fortemente inibidas no ser humano pelos diferentes mAbs antiCD47 e anti-SIRPg (Piccio *et al.*, 2005) mas não pelo anticorpo anti-SIRPA v1 específico da invenção.

CONCLUSÃO

[00183] Os dois clones diferentes usados para avaliar a apresentação cruzada a antígeno mostraram resultados similares com o bloqueio de SIRPa nas iDCs durante o carregamento de Ag e a apresentação a Ag às células T. Os inventores mostraram pela primeira vez que a SIRPa humana tem um papel inibidor sobre a apresentação cruzada a antígeno, medida pela secreção de IFN γ ou IL2, que pode ser aliviada pelos mAbs anti-SIRPA seletivos. Isto não foi previsto porque o bloqueio de CD47 com anticorpos antiCD47 diferentes ou anticorpo anti-SIRPA/g não seletivo não apresentou o mesmo efeito sobre as células T humanas que encontrou explicação considerando-se observações anteriores sobre as propriedades imunossupressivas de mAbs antiCD47 no ser humano, mas não em camundongo. A técnica anterior mostra que SIRPa inibe a maturação de DC em camundongo. Pela primeira vez, os inventores divulgaram que um anticorpo anti-SIRPA específico seria um composto terapêutico para potenciar a apresentação cruzada a Ag no ser humano. Embora mAbs antiCD47 no camundongo tenham efeito de potenciação similar do que anti-SIRPA de camundongo, o efeito de anti-SIRPA humano sobre as DCs humano a apresentação cruzada não foi prevista. Nosso entendimento do mecanismo imune mediado pela interação de SIRPa-CD47 nos levou a presumir que as propriedades imunossupressivas de

antiCD47 no ser humano sejam devidas à sua interação com SIRP_g que não é expressa em camundongos. Surpreendentemente, o estatuto genético de doadores de DCs na SIRP_a V1 homozigota ou heterozigota não mostrou nenhuma diferença na ativação da célula T humana.

Exemplo 3: Impacto do bloqueio de SIRP/CD47 sobre a estimulação policlonal

[00184] MÉTODO: hPBMC foram isoladas da camada leucoplaquetária de voluntários saudáveis. As células T CD4 ou CD8 foram selecionadas pela seleção positiva usando um AutoMACS (Miltenyi) e plaqueadas em 96 placas de fundo redondo (50.000 células/poço). Os sinais proliferativos foram providos pelos microgrânulos revestidos com antiCD3/antiCD28 (Life Technologies) a uma razão de 1 grânulo para 1 célula T durante três dias ou células dendríticas maduras alogênicas geradas *in vitro* a uma razão de 5 células T para 1 mDC durante 5 dias. Os anticorpos alvejando os caminhos SIRP_a/CD47 e/ou SIRP_g/CD47 foram adicionados a partir do princípio do teste de proliferação em uma concentração saturante (10 µg/mL). A proliferação foi medida pela incorporação de H³-tiamidina durante as últimas 12 horas de cultura. O anticorpo antiCD47 (referências comerciais: B6H12), anticorpos anti-SIRPA (HEFLB como aludido na patente (WO2017178653)).

[00185] RESULTADOS: para investigar o efeito imunossupressivo do bloqueio de CD47 nos linfócitos T humanos, as PBMC foram isoladas a partir de 3 voluntários saudáveis diferentes e uma parte das células foi irradiada (35 Gy). Cada doador (respondedor) foi incluso na Reação de Linfócito Mixto com cada um dos dois doadores remanescentes (estimuladores irradiados). Os anticorpos de bloqueio foram adicionados no princípio da MLR e proliferação da célula T foi medida pela incorporação de timidina nas últimas 16 horas de uma cultura de cinco dias. Os inventores verificaram uma inibição forte da proliferação da célula T humana com mAb antiCD47 ao passo que anti-

SIRPA (anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno) não diferiu significativamente das condições de controle (Figura 7). A secreção de IFN γ que também reflete a ativação da célula T foi dosada no sobrenadante da cultura de 4 dias. Os inventores observaram também uma inibição dramática da secreção da citocina com mAb antiCD47 (B6H12) indicando e confirmando resultados anteriores dos inventores e outros grupos que CD47 é importante para a ativação da célula T no ser humano.

Exemplo 4: Efeito de anticorpo anti-SIRPA sobre o bioensaio de polarização de Macrófago usando monócitos de doadores saudáveis: Bioensaio medindo a produção de quimiocina: MIP-1a/CCL-3 e MIP-1b/CCL-4.

[00186] Para investigar o impacto de anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno sobre a polarização e ativação de macrófago, a secreção de algumas quimiocinas, mais especificamente MIP-1a/CCL-3 e MIP-1b/CCL-4, foram medidas no sobrenadante de monócitos humanos frescos ou congelados genotipados homozigotos V1 para SIRPa ou heterozigoto V1/V2 cultivados com GM-CSF para induzir macrófagos imaturos não polarizados (Fig. 8). Duas fontes de CD47-Fc recombinante foram testadas a 10 μ g/ml: SinoBiological #12283-H02 e R&D systems #4670-CD-050. A quantificação de MIP-1a/CCL-3 e MIP-1b/CCL4 foi realizada pelo ELISA em sobrenadantes de cultura (R&D systems: Human CCL3/MIP-1 alfa DuoSet ELISA#DY270 e Human CCL4/MIP-1 beta DuoSet ELISA#DY271). Ao todo, os resultados mostraram que na presença de CD47-Fc revestido, o anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno, significativamente aumentou a secreção de MIP-1a e MIP-1b, tanto em doadores homozigotos para SIRPa V1 (Fig. 8A) ou heterozigoto (genótipo V1/V2) (Fig. 8B).

CONCLUSÃO

[00187] Os inventores identificaram que a secreção das quimiocinas associadas com M1 MIP-1a/CCL-3 e MIP-1b/CCL-4 é significativamente aumentada com anticorpo anti-SIRPA humana v1 interno na presença de

CD47-Fc recombinante revestida. CD47-Fc induz a supressão funcional das células mielóides humanas, em particular, pela diminuição da secreção basal de MIP-1a/CCL-3 e MIP-1b/CCL-4. O bloqueio da interação de SIRPa-CD47 por um anticorpo anti-SIRPA restaura a função mielóide como mostrado pela secreção de MIP-1a e MIP-1b no sobrenadante. O genótipo dos doadores com respeito à expressão do alelo SIRPa V1 não teve nenhum impacto sobre a indução destas quimiocinas, sugerindo um efeito limiar sobre o bloqueio de SIRPa para observar um efeito funcional.

Exemplo 5: Ensaio de ligação de SIRPa sobre monócitos v2/v2 humanos pela citofluorometria.

[00188] MÉTODO: Para medir a ligação dos anticorpos anti-SIRPA sobre monócitos humanos, Inibidor da Ligação de Receptor Fc Humano (BD pharmingen; USA; referência 564220) foi primeiro adicionado durante 30 min na temperatura ambiente para bloquear receptores Fc humano nos monócitos humanos para reduzir o fundo. Depois, um anticorpo foi incubado durante 30 min a 4°C e lavado antes de tingido 30 min a 4°C com IgG Fc anti-humano rotulado com PE (Biolegend; USA; referência 409303). Para os anticorpos de camundongo, uma IgG anticamundongo rotulada com PE (Jackson immunoresearch; referência 715-116-151) foi usada. As amostras foram analisadas no citofluorômetro LSRII ou Canto II da BD.

[00189] RESULTADOS: Como mostrado na Figura 9, os resultados indicam uma ligação do anticorpo SIRP29 e do anticorpo precursor do anticorpo 18D5 quimérico da invenção sobre monócitos SIRPa v2/v2 humanos e nenhuma ligação para todos os anticorpos anti-SIRPA humanizados (como medido com a MFI (Intensidade Fluorescente Média) indicando que a humanização dos anticorpos induz a perda da especificidade de SIRPa v2.

Exemplo 6: Análise de competição dos anticorpos anti-SIRPA na interação de CD47-SIRPg por Blitz.

[00190] MÉTODO: O mesmo ensaio foi realizado com um Blitz (Forté Bio; USA; referência C22-2 No 61010-1). Em uma primeira etapa, hSIRPg-His (Sino Biologicals, Pequim, China; referência 11828-H08H) foi imobilizado a 10 µg/ml pela cauda de histidina em um biossensor Ni-NTA (Forté Bio; USA; referência 18-0029) durante 30 segundos. Em uma segunda etapa, um anticorpo foi adicionado a 20 µg/mL (concentração de saturação) durante 120 segundos. Depois, CD47 Fc humana ((Sino Biologicals, Pequim, China; referência 12283-H02H) foi associada a 100 µg/mL, em competição com anticorpos diferentes, durante 120 segundos (LSB2,20, Kwar ou anticorpos SIRP29). A dissociação de CD47Fc foi feita em tampão cinético durante 120 segundos. Os dados de análise foram feitos com o software Blitz pro 1.2, que calculou a constante de associação (k_a) e a constante de dissociação (k_d) e determinou a constante de afinidade K_D (k_a/k_d).

[00191] RESULTADOS: Como mostrado na Figura 10, na condição normal a afinidade da CD47 à SIRPg está em torno de $6,10^{-8}$ M, Kwar23 e SIRP29 significativamente reduz a ligação de CD47 à SIRPg, enquanto a LSB2.20 um anticorpo anti-SIRPg, não rompem a interação CD47-SIRPg. Estes resultados salientam a especificidade do anticorpo anti-SIRPA v1 interno da invenção contra a SIRPa comparado com os anticorpos da técnica anterior.

Exemplo 7: Modelo pré-clínico 4T1 mamário: um modelo de metástase

[00192] O mesmo modelo pré-clínico 4T1 pré-clínico ortotópico e singênico foi usado para avaliar o efeito de duas monoterapias anti-SIRPA de camundongo específicas diferentes em um modelo onde a infiltração de célula mielóide é importante e bem descrita. De fato, foi previamente relatado que o modelo 4T1 é predominantemente infiltrado pelas células mielóides CD11b+ (DuPré *et al.*, 2007), em particular, MDSC (Markowitz *et al.*, 2013).

[00193] O mesmo modelo é conhecido induzir metástase. Os inventores, portanto, reuniram o fígado e o pulmão e numeraram as

metástases de camundongos tratados ou não com anticorpos anti-SIRPA de camundongo. O controle de isótipo e anticorpos anti-SIRPA foram usados a 8 mg/kg de D4 a D28 (3 vezes/semana). O bloqueio de SIRPa pelos dois anticorpos diferentes alvejando especificamente SIRPa (e rompendo a ligação de CD47 à SIRPa) demonstrou um efeito clínico potente na monoterapia sobre o desenvolvimento de tumor de um modelo agressivo de TNBC. Os inventores também analisaram a metástase de pulmão e fígado depois do sacrifício pela comparação com os substitutos P84 (Ref: MABS164 um anticorpo Anti-SHPS-1, clone P84 da Merck Millipore) e MY1-mG1 (descrito em Yanagita *et al.*). Os camundongos de controle desenvolveram metástases pulmonares enquanto nenhum dos camundongos tratados com MY1-mG1 ou P84 não. A Figura 11 mostra resultados sobre a metástase pulmonar para os mAbs anti-SIRPA P84 e MY-1, ambos mostrando a mesma eficácia sobre a metástase pulmonar.

[00194] Estes resultados em um modelo de camundongo que não expressa SIRPg nas suas células salientam a importância para alvejar especificamente SIRPa para aplicações contra o câncer e mais particularmente para tratamento ou prevenção de metástases. No ser humano onde as células expressam SIRPg, será útil alvejar especificamente SIRPa sem romper a interação de CD47-SIRPg tal como com os anticorpos da invenção.

Bibliografia

[00195] Chang, Y., and Moore, P.S. (2012). Merkel Cell Carcinoma: A Virus-Induced Human Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 123–144.

[00196] DuPré, S.A., Redelman, D., and Hunter, K.W. (2007). The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int. J. Exp. Pathol.* 88, 351–360.

[00197] Haan, J.M.M. den, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8+ but Not Cd8– Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685–1696.

- [00198] Hassan, R., Thomas, A., Alewine, C., Le, D.T., Jaffee, E.M., and Pastan, I. (2016). Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J. Clin. Oncol.* *34*, 4171–4179.
- [00199] Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O’Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 5448–5455.
- [00200] Liao, J.B. (2006). Viruses and Human Cancer. *Yale J. Biol. Med.* *79*, 115–122.
- [00201] Liu, Q., Wen, W., Tang, L., Qin, C.-J., Lin, Y., Zhang, H.-L., Wu, H., Ashton, C., Wu, H.-P., Ding, J., et al. (2016). Inhibition of SIRP α in dendritic cells potentiates potent antitumor immunity. *OncoImmunology* *5*, e1183850.
- [00202] Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W.A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y.-X., and Xu, M.M. (2015). CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat. Med.* *advance online publication*.
- [00203] Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T.R., and Carson, W.E. (2013). Myeloid Derived Suppressor Cells in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *140*, 13–21.
- [00204] Piccio, L., Vermi, W., Boles, K.S., Fuchs, A., Strader, C.A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRP β 2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* *105*, 2421–2427.
- [00205] Takenaka, K., Prasolava, T.K., Wang, J.C.Y., Mortin-Toth, S.M., Khalouei, S., Gan, O.I., Dick, J.E., and Danska, J.S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1313–1323.
- [00206] Xu, M.M., Pu, Y., Han, D., Shi, Y., Cao, X., Liang, H., Chen,

X., Li, X.-D., Deng, L., Chen, Z.J., et al. (2017). Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein α Signaling. *Immunity* 47, 363–373.e5.

[00207] Yanagita, T., Murata, Y., Tanaka, D., Motegi, S., Arai, E., Daniwijaya, E.W., Hazama, D., Washio, K., Saito, Y., Kotani, T., et al. AntiSIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight* 2.

[00208] Zong, J., Keskinov, A.A., Shurin, G.V., and Shurin, M.R. (2016). Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 65, 821–833.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-SIRPA humana, fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11,

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15;

e

(b) um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 16 ou na SEQ ID No: 17,

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em que o anticorpo, fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, melhora a apresentação cruzada de um antígeno expresso na dita doença, em particular, no dito câncer e está envolvido na provocação de uma resposta da célula T adequada para o tratamento da dita doença.

2. Anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo para o uso como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

- se liga especificamente à SIRPa humana v1 e inibe a ligação

de CD47 humana à SIRPa humana v1, não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana; e, em particular, não se liga especificamente à SIRPg humana.

3. Anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) um domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11,

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15;

e

b) um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 16 ou na SEQ ID No: 17;

em que o anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação a antígeno inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v1 e não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2;

para o uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença em um paciente que seja positivo para SIRPa v1.

4. Anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de

que

o domínio variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 18 ou na SEQ ID No: 19 ou na SEQ ID No: 20; ou na SEQ ID No: 21; ou na SEQ ID No: 22; ou na SEQ ID No: 23, em particular, o domínio variável de cadeia pesada compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 20;

em que o domínio variável de cadeia leve compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 17.

5. Anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, anticorpo modificado do mesmo para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a doença é selecionada do grupo que consiste em um câncer, em particular, câncer inflamatório e câncer com células mielóides infiltradas, particularmente com células dendríticas infiltradas e/ou MDSCs e/ou células TAM, metástase do câncer, em particular, metástase do câncer de mama, melanoma ou em que o uso como definido na reivindicação 1 ou 4 é para a vacinação terapêutica contra uma destas doenças, em particular, uma vacinação terapêutica contra o melanoma.

6. Anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, anticorpo modificado do mesmo para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que tem as seguintes propriedades:

- o mesmo não se liga especificamente à SIRPa humana v2; e
- o mesmo não inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana; em particular, o mesmo não se liga especificamente à SIRPg humana; e
- o mesmo se liga com SIRPa humana v1 com uma afinidade de pelo menos $10E-9$ M; e

- o mesmo melhora a apresentação cruzada de pelo menos um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno às células T humanas, em particular, pelas células dendríticas, em particular, às células T CD8+ humanas;

e opcionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

- o mesmo não inibe a ativação e/ou a proliferação das células T humanas *in vivo*; e/ou

- o mesmo melhora a ativação dos macrófagos.

7. Anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a doença é um câncer e em que pelo menos um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígenos do Vírus do Papiloma Humano, Vírus de Epstein-Barr, Vírus do poliovírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus do Herpes Humano 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos de gene *ctnnb1*, gene *casp8*, gene *her2*, gene *p53*, gene *kras*, gene *nras* ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais de BCR-ABL, antígenos tumorais de ETV6-AML1, genes que codificam o antígeno de melanoma (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de ssx, antígenos de ny-eso-1, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno da fofatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno da transcriptase da telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME,

antígeno p53 do tipo selvagem, antígeno do oncogene ERBB2, antígeno de tumor de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MA-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA), é expresso ou foi detectado no paciente.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e também compreendendo pelo menos um veículo farmacêutico.

9. Uso de um polipeptídeo, em particular, o uso de um antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende ou consiste em epítopo da SIRPa humana v1 que consiste em SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 na produção ou na seleção de um anticorpo anti-SIRPA humana v1 ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou anticorpo modificado do mesmo que liga especificamente à SIRPa humana v1 e que inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v1 e que não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2 e à SIRPg humana, em particular, que melhora a apresentação cruzada de um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, células dendríticas, às células T humanas, em particular, células T CD8+.

10. Método para preparar um anticorpo anti-SIRPA humana v1, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende imunizar um animal não humano, em particular, um mamífero não humano, com pelo menos um antígeno como definido na reivindicação 9 ou com pelo menos um antígeno compreendendo ou consistindo em epítopo da SIRPa humana v1 que consiste em SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25; e, em particular, coletar o soro ou células B resultantes dos ditos animais não

humanos imunizados para obter anticorpos direcionados contra os ditos antígenos.

11. Uso de acordo com reivindicação 9 ou o método de acordo com reivindicação 10, caracterizados pelo fato de que compreende adicionalmente uma etapa de seleção e recuperação do anticorpo anti-SIRPA humana v1, as ditas etapas de seleção compreendendo pelo menos uma das seguintes etapas:

a. testar a capacidade de ligação do anticorpo à SIRPa humana v1, em particular, a capacidade de ligação do anticorpo ao antígeno citado na reivindicação 7; e/ou

b. testar a capacidade do anticorpo de diminuir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v1; e/ou

c. testar a capacidade do anticorpo para prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v2, e/ou

d. testar a capacidade do anticorpo para prevenir ou inibir a ligação de CD47 humana à SIRPg humana;

e opcionalmente:

e. testar a capacidade do anticorpo para ligar aos resíduos de aminoácido D e V localizados respectivamente nas posições 130 e 132 da SIRPa da SEQ ID No: 3; ou localizados respectivamente nas posições 100 e 102 da SIRPa da SEQ ID No: 24;

f. testar a capacidade de ligação do anticorpo à SIRPa humana v2; e/ou

g. testar a capacidade de ligação do anticorpo à SIRPg humana;

e em que o anticorpo recuperado tem as seguintes propriedades:

1. o mesmo se liga especificamente à SIRPa humana v1;

2. o mesmo diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à

SIRPa humana v1; e

3. o mesmo não diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana; e

e opcionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

4. o mesmo se liga à SIRPa humana v1 com uma afinidade de pelo menos $10E-9$ M; e/ou

5. o mesmo liga aos resíduos de aminoácido D e V localizados nas posições 130 e 132 respectivamente da SIRPa da SEQ ID No: 3; ou localizados nas posições 100 e 102 respectivamente da SIRPa da SEQ ID No: 24; e/ou

6. o mesmo não se liga especificamente à SIRPg humana; e/ou

7. o mesmo não liga especificamente à SIRPa humana v2.

12. Uso de acordo com reivindicação 9 ou o método de acordo com reivindicação 10 ou 11, caracterizados pelo fato de que os anticorpos obtidos se ligam especificamente à SIRPa humana v1 com uma afinidade de pelo menos $1E-9$ M e que não se ligam especificamente à SIRPa humana v2, em particular, em que o anticorpo recuperado anti-SIRPA humana v1 é um antagonista da ligação de CD47 humana à SIRPa humana v1.

13. Método *in vitro* ou *ex vivo* para avaliar a probabilidade de eficácia de um tratamento com um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou um anticorpo modificado do mesmo em um paciente humano, mais particularmente em que um anticorpo anti-SIRPA humana v1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou anticorpo modificado devem ser administrados a um paciente humano, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende a determinação da presença de SIRPa v1 em uma amostra biológica previamente obtida do paciente, a dita SIRPa v1 sendo, em particular, detectada por um anticorpo anti-SIRPA humana v1 como definido em

qualquer uma das reivindicações 1 a 7, a composição de acordo com reivindicação 8 ou produzido como definido na reivindicação 9 ou um composto selecionado de acordo com reivindicação 10 ou 11 e em que a presença de SIRPa v1 na amostra biológica é um indicativo de que o tratamento é provavelmente eficaz.

14. Método *in vitro* ou *ex vivo* para avaliar a probabilidade de eficácia de um tratamento com um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou um mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou um anticorpo modificado em um paciente humano, mais particularmente em que um anticorpo anti-SIRPA humana v1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou anticorpo modificado devem ser administrados a um paciente humano, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende determinar os alelos de SIRPa do paciente, em particular, determinar se pelo menos um alelo de SIRPa do paciente compreende uma sequência de ácido nucléico que codifique os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 e em que a presença de uma sequência de ácido nucléico que codifique os resíduos de aminoácido da SEQ ID No: 1 ou SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25 dentro de um alelo de SIRPa em uma amostra biológica previamente obtida do paciente é um indicativo de que o tratamento é provável de ser eficaz, em particular, a determinação de um dos alelos de SIRPa é realizada na amostra biológica pela reação de cadeia da polimerase usando iniciadores adequado para amplificar uma porção do gene da SIRPa ou transcrito da SIRPa compreendendo a SNP 15 e SNP 16 da SIRPa humana ou compreendendo SNP 17 da SIRPa humana, e/ou uma porção compreendendo a sequência de ácido nucléico que codifica os resíduos de aminoácido DDV dentro da SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 4 ou SEQ ID No: 25.

15. Combinação de compostos, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) um anticorpo, um fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou um anticorpo modificado do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7; e/ou a composição como definida na reivindicação 8; e

(ii) pelo menos um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígenos do Vírus do Papiloma Humano, Vírus de Epstein-Barr, Vírus do Poliovírus da célula de Merkel, Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Leucemia da Célula T Humana, Vírus do Herpes Humano 8, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, HCV, HBC, Citomegalovírus ou do grupo dos antígenos mutados de ponto único derivados do grupo consistindo em antígenos de gene *ctnnb1*, gene *casp8*, gene *her2*, gene *p53*, gene *kras*, genes *ras* ou antígenos tumorais, em particular, antígenos tumorais emitidos ou derivados do grupo que consiste em oncogene *ras*, antígenos tumorais de BCR-ABL, antígenos tumorais de ETV6-AML1, genes que codificam o antígeno de melanoma (MAGE), antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, antígenos de ssx, antígenos de ny-eso-1, antígenos tumorais de ciclina-A1, antígeno de MART-1, antígeno de gp100, antígeno de CD19, antígeno específico da próstata, antígeno da fosfatase do ácido prostático, antígeno carcinoembrionário, antígeno de alfafetoproteína, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 16 de mucina, antígeno 1 de mucina, antígeno da transcriptase da telomerase humana, antígeno de EGFR, antígeno de MOK, antígeno de RAGE-1, antígeno de PRAME, antígeno p53 do tipo selvagem, antígeno do oncogene ERBB2, antígeno de tumor de sialila-Tn, antígeno 1 do tumor de Wilms, antígeno de mesotelina, antígenos de carboidrato, antígeno de B-catenina, antígeno de MA-1, antígeno de CDK4 e antígeno de ERBB2IP, em particular, antígeno associado ao tumor de melanoma Melan-A (TAA) ou qualquer antígeno mutado particular (neoantígeno ou neoepítipo);

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma

doença, em particular, contra um câncer, em que o anticorpo, fragmento de ligação a antígeno do mesmo, mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou anticorpo modificado, melhora da apresentação cruzada de um antígeno expresso na dita doença, em particular, um câncer e está envolvido na provocação de uma resposta da célula T adequada para o tratamento da dita doença, em particular, para tratar uma doença em um paciente positivo para SIRPa v1, em particular, para tratar ou prevenir uma doença em que CD47 é superexpressa.

16. Combinação de compostos, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) um anticorpo, um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, um mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou um anticorpo modificado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7; e/ou a composição como definida na reivindicação 8; e

(ii) pelo menos um segundo agente terapêutico selecionado do grupo que consiste em agente quimioterapêutico, agentes de radioterapia, agente imunoterapêutico, agentes de terapia celular, antibióticos e probióticos, em particular, agente imunoterapêutico selecionado do grupo que consiste em bloqueadores ou ativadores do ponto de checagem ou de células imunes adaptativas, particularmente selecionadas do grupo que consiste em antiPDL1, antiPD1, antiCTLA4, antiCD137, antiCD2, antiCD28, antiCD40, antiHVEM, antiBTLA, antiCD160, antiTIGIT, antiTIM-1/3, antiLAG-3, anti2B4, antiVISTA, antiOX40, agonista antiCD40, CD40-L, agonistas de TLR, antiICOS, ICOS-L, agonista de STING, inibidor de IDO, vírus oncolítico e agonistas do receptor de célula B;

para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em particular, um câncer ou para o uso na vacinação terapêutica contra uma doença, em particular, contra um câncer, em particular, em um paciente positivo para SIRPa v1, em particular, para tratar ou prevenir uma doença em

que CD47 é superexpressa.

17. Combinação de compostos para o uso como definido na reivindicação 15 ou 16, caracterizada pelo fato de que a combinação é adequada para evocar uma resposta imune em um paciente, em particular, a combinação evoca uma resposta da célula T adequada para tratar a doença, a dita ativação compreendendo (i) ativar as células T, em particular, células T CD8⁺; e/ou (ii) realçar a apresentação cruzada de pelo menos um antígeno pelas células dendríticas para células T CD8⁺; e/ou (iii) realçar a polarização de macrófagos, em particular, polarização de macrófagos M1; ou (i), (ii) e (iii).

18. Combinação de compostos para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizada pelo fato de que a doença é selecionada do grupo que consiste em câncer, em particular, câncer inflamatório e câncer com células mielóides infiltradas, particularmente com células dendríticas infiltradas ou MDSCs e/ou células TAM, uma doença infecciosa, uma doença inflamatória crônica, uma doença autoimune, uma doença neurológica, um dano cerebral, um dano nervoso, uma policitemia, uma hemocromatose, um trauma, um choque séptico, uma doença infecciosa crônica, em particular, doença infecciosa por *Pseudomonas* e CMV, fibrose, aterosclerose, obesidade, diabetes tipo II, melanoma e uma disfunção de transplante, em particular, melanoma.

19. Método para aumentar a apresentação cruzada de um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno, em particular, células dendríticas, para células T, em particular, para células T CD8⁺, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende a administração a um paciente de um composto selecionado do grupo que consiste em anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou mimético de anticorpo de ligação a antígeno ou anticorpo modificado, o dito composto tendo pelo menos as seguintes propriedades:

1. o mesmo não se liga especificamente à SIRPa humana v2; e
 2. o mesmo se liga à SIRPa humana v1 com uma afinidade de pelo menos $1E-9$ M; e
 3. o mesmo diminui ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPa humana v1; e
 4. o mesmo não previne ou inibe a ligação de CD47 humana à SIRPg humana,
- o dito composto tendo opcionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

- i) o mesmo não inibe a proliferação da célula T; e/ou
- ii) o mesmo não inibe a ativação da célula T; e/ou
- iii) o mesmo melhora a ativação dos macrófagos.

20. Método para aumentar a apresentação cruzada de um antígeno de acordo com reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o composto administrado é um anticorpo anti-SIRPA humana ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, que compreende:

(a) domínio variável de cadeia pesada compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3,

em que:

HCDR1 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 9,

HCDR2 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 10 ou SEQ ID No: 11,

HCDR3 compreende ou consiste em sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 12 ou SEQ ID No: 13 ou SEQ ID No: 14 ou SEQ ID No: 15;

e

(b) um domínio variável de cadeia leve compreendendo a

sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID No: 16 ou na SEQ ID No: 17.

21. Método para avaliar a probabilidade de eficácia de um tratamento com um anticorpo anti-SIRPA humana v1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, em um paciente humano, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende:

- a determinação da presença de SIRPa humana v1 em uma amostra biológica previamente obtida do paciente humano; e quando o paciente humano é positivo para SIRPa v1;

- a administração de uma quantidade terapêutica de: um anticorpo anti-SIRPA ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo modificado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8; ou da combinação como definida em qualquer uma das reivindicações 15 a 18; ou um composto selecionado como definido na reivindicação 11 ou 12.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a presença de SIRPa v1 na amostra biológica é um indicativo de que o tratamento é provavelmente eficaz no paciente humano.

23. Método de acordo com reivindicação 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que o paciente humano a ser tratado tem um câncer ou é provável de desenvolver um câncer.

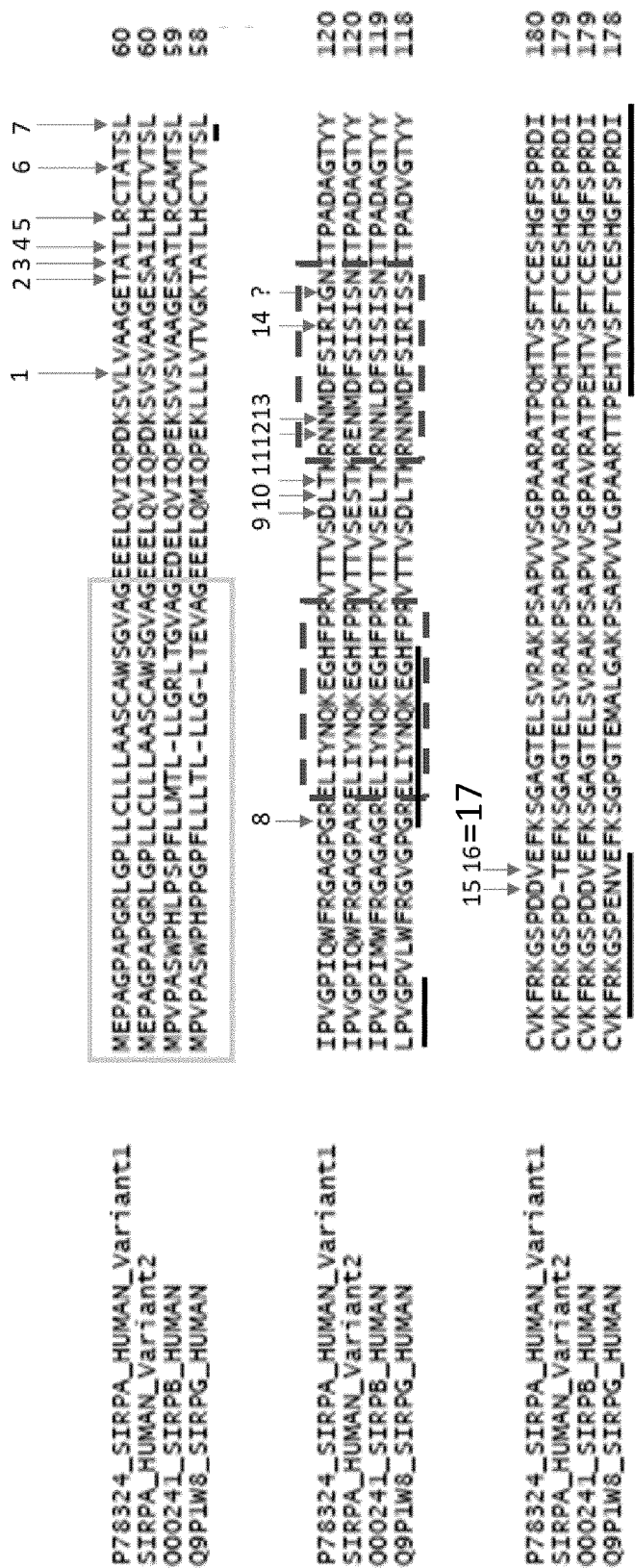


Figura 1

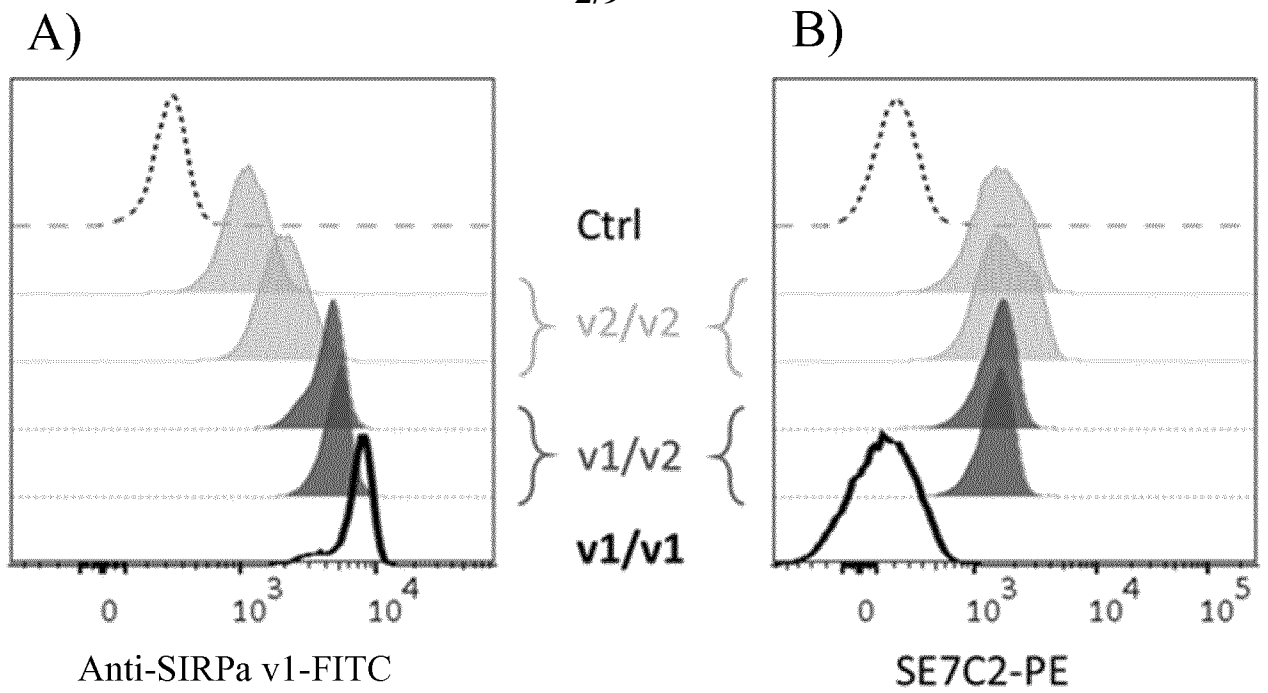


Figura 2

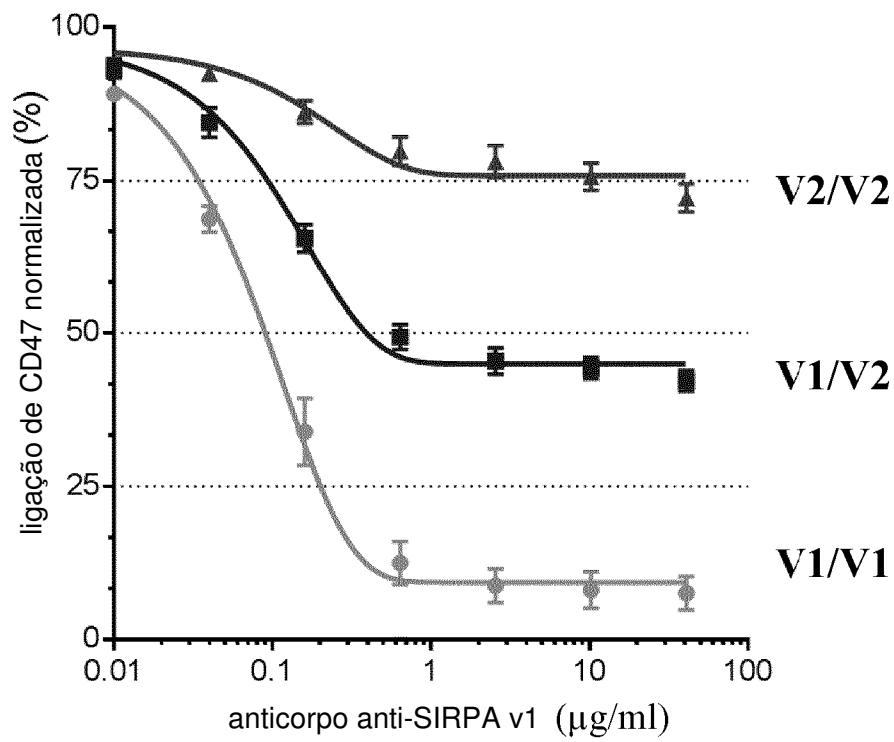


Figura 3

A)

	ED50 (ng/ml)
anti-SIRPa + SIRPv1	0,78
anti-SIRPa + SIRPv2	/
anti-SIRPa + SIRPv3	0,99
anti-SIRPa + SIRPv4	0,71
anti-SIRPa + SIRPv5	0,63
anti-SIRPa + SIRPv6	0,72
anti-SIRPa + SIRPv7	0,54
anti-SIRPa + SIRPv8	/
anti-SIRPa + Fc	/

B)

	ED50 (ng/ml)
Kwar23 + SIRPv1	0,77
Kwar23 + SIRPv2	0,77
Kwar23 + SIRPv3	0,77
Kwar23 + SIRPv4	0,74
Kwar23 + SIRPv5	0,78
Kwar23 + SIRPv6	0,75
Kwar23 + SIRPv7	0,60
Kwar23 + SIRPv8	0,93
Kwar23 + Fc	/

Figura 4

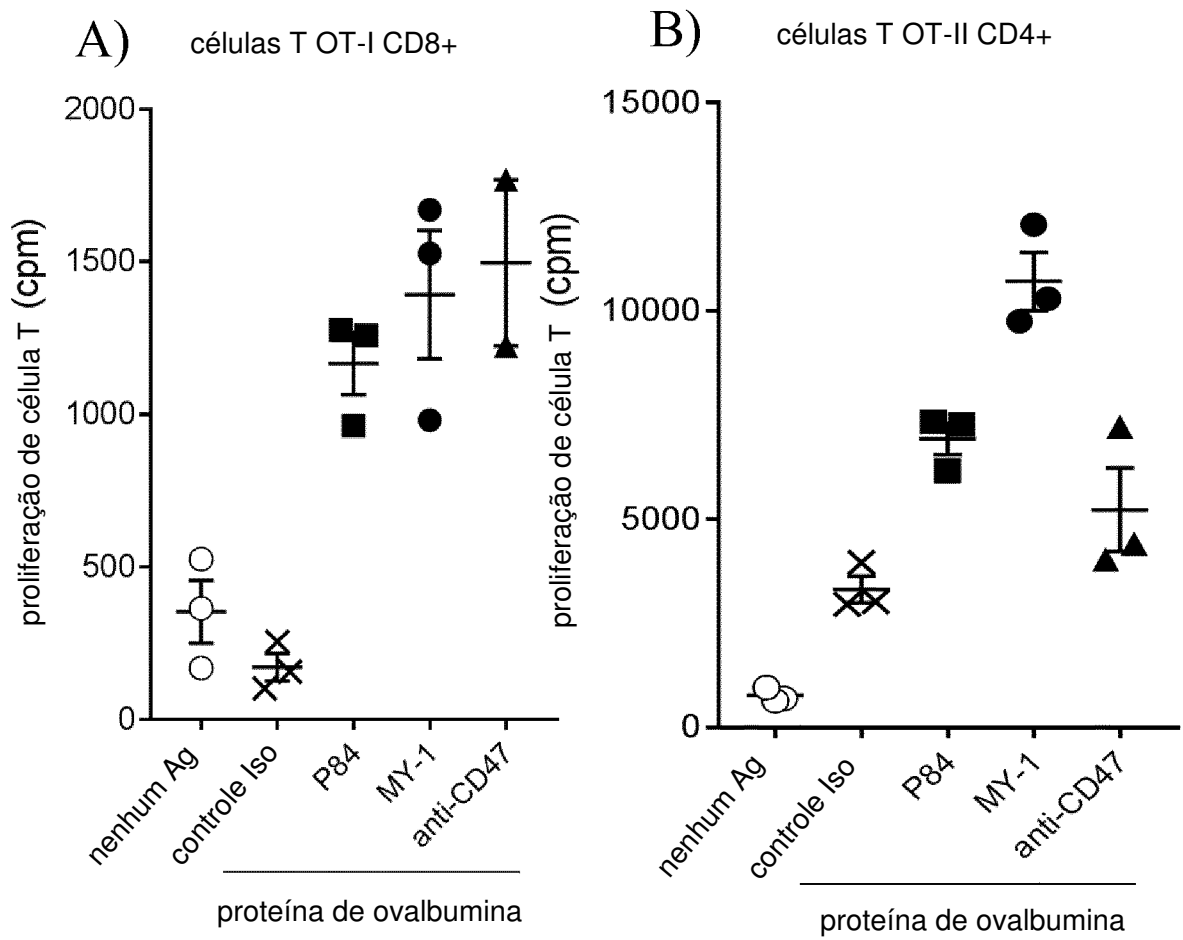


Figura 5

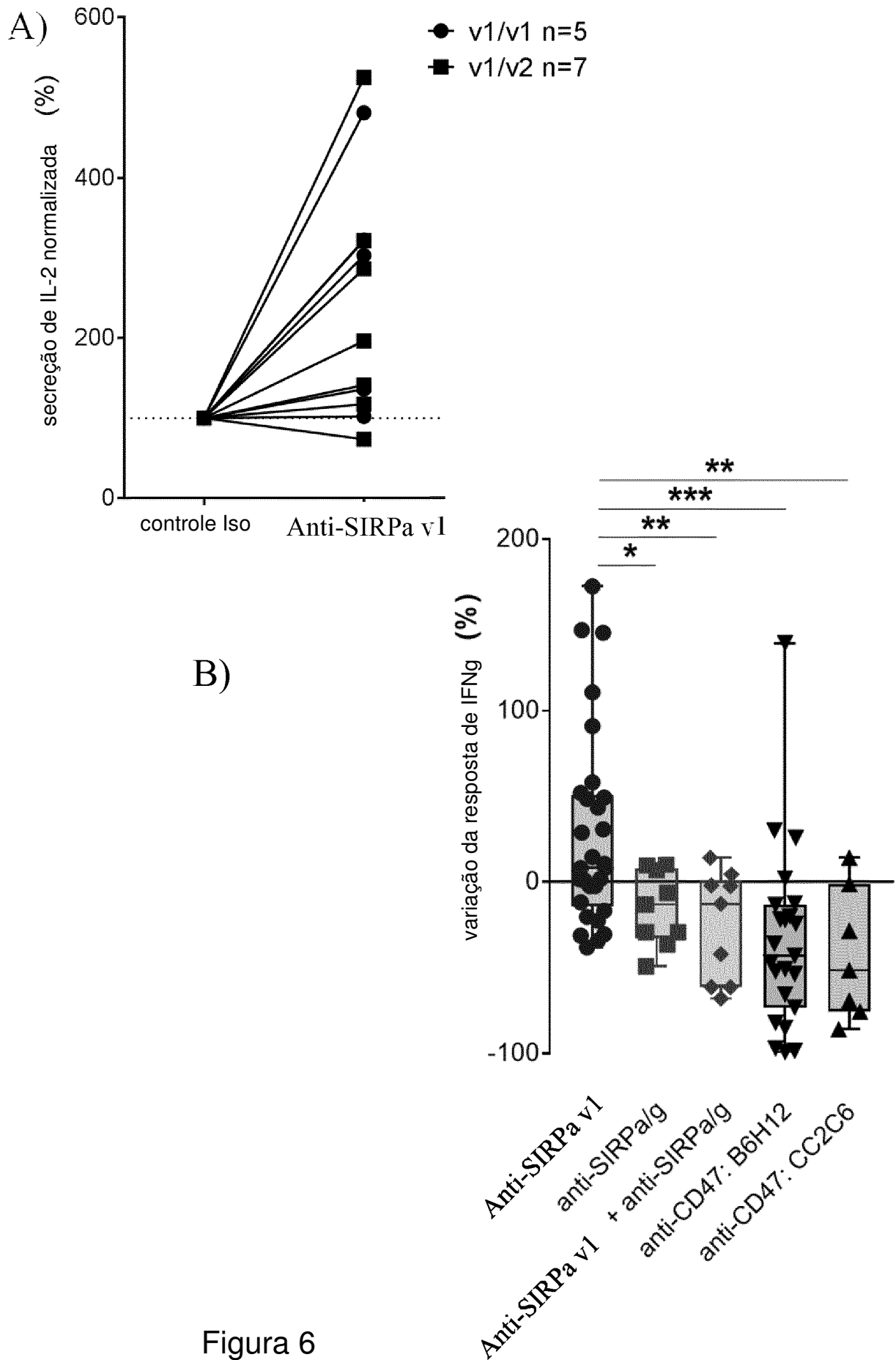


Figura 6

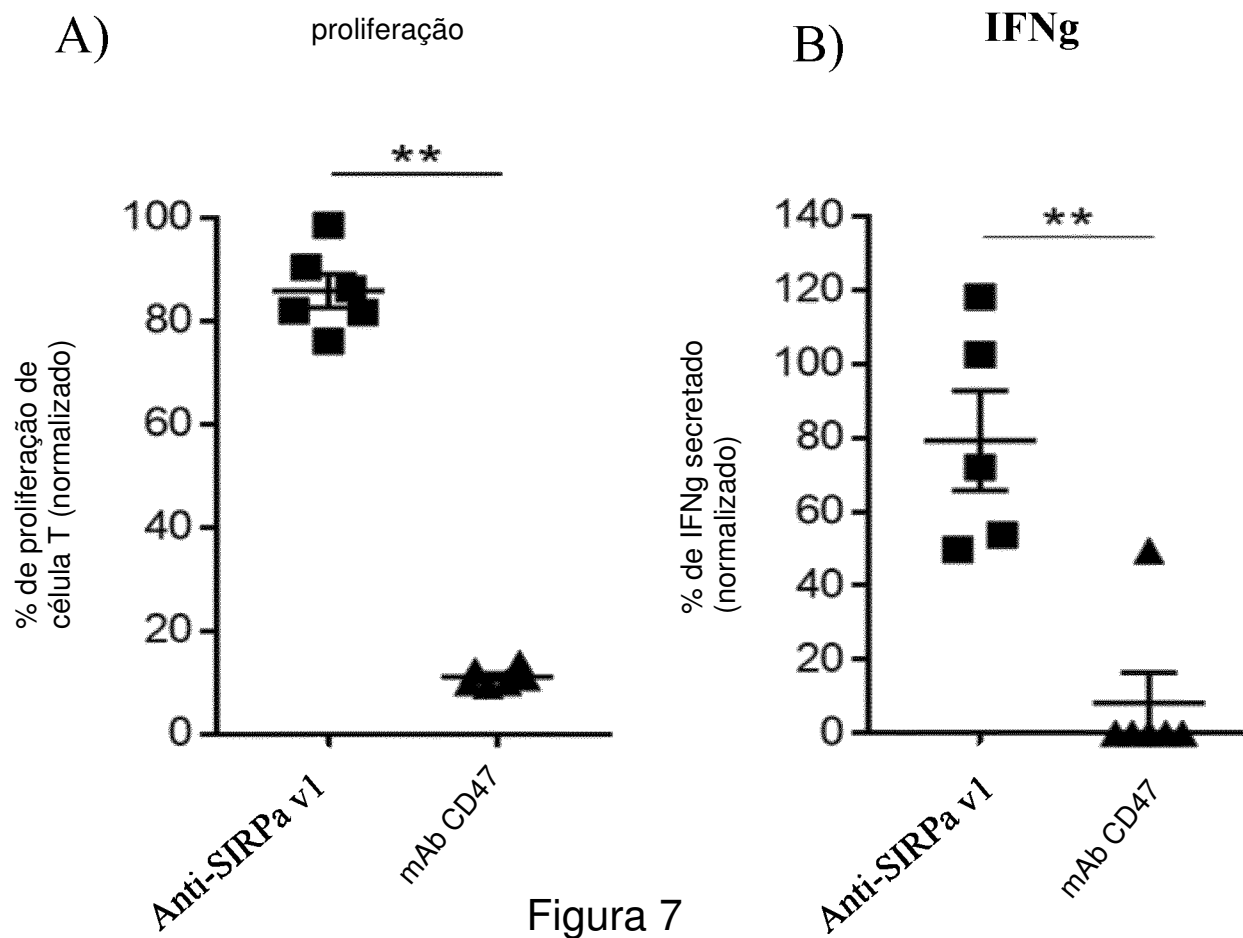


Figura 7

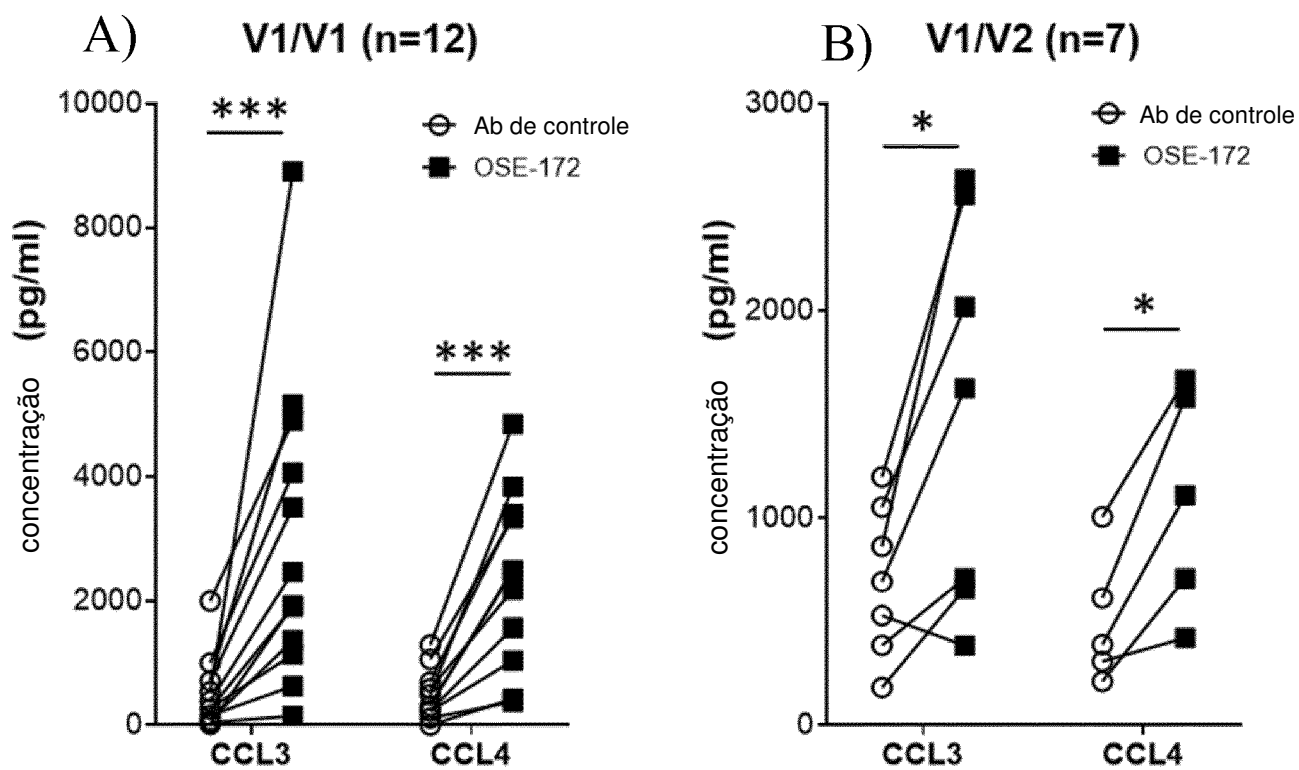
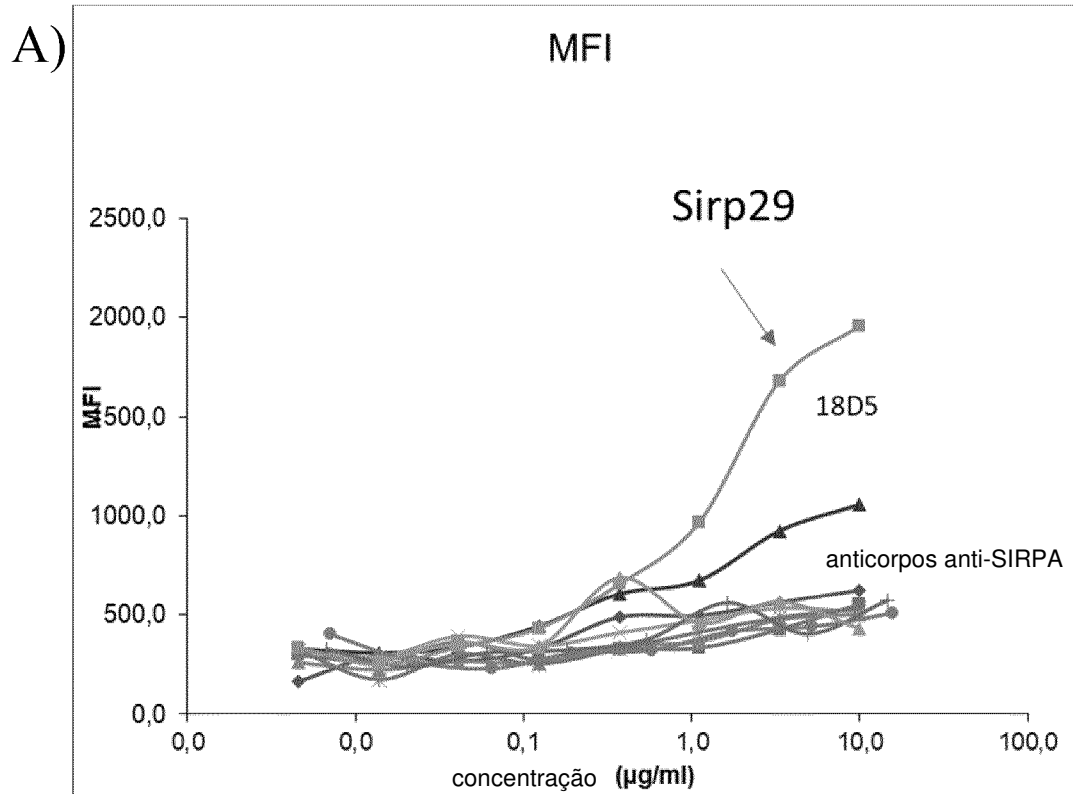


Figura 8



B)

	ED50 (µg/ml)
Sirp29	1,13
18D5 quimérico	5,72
18D5 humanizado	4439,44

Figura 9

Índice	ID da amostra	Conc. (nM)	Informação	KD (M)	ka (1/Ms)	Erro ka	kd (1/s)	Erro kd	Rmax	Erro Rmax	Equilíbrio R
1	LSB2-20	133.3		2.001e-8	7.683e5	2.166e4	1.538e-2	5.21e-4	1.404	0.02729	1.221
2	kwar23	133.3		1.068e-4	3.339e3	1.139e6	3.567e-1	1.048e-1	81.84	27890	0.102
3	sirp29	133.3		3.386e-5	4.279e3	1.086e5	1.449e-1	9.625e-3	36.06	914	0.1414

Figura 10

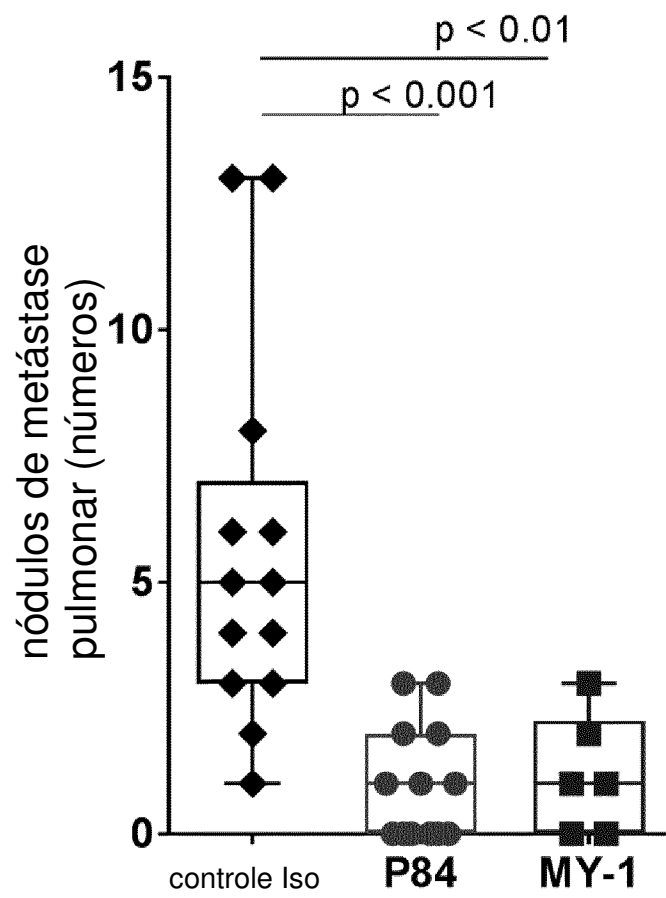


Figura 11

RESUMO

ANTICORPO ANTI-SIRPA HUMANA, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO OU ANTICORPO MODIFICADO DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM POLIPEPTÍDEO, MÉTODOS PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-SIRPA HUMANA V1, PARA AUMENTAR A APRESENTAÇÃO CRUZADA DE UM ANTÍGENO E PARA AVALIAR A PROBABILIDADE DE EFICÁCIA DE UM TRATAMENTO, MÉTODO IN VITRO OU EX VIVO PARA AVALIAR A PROBABILIDADE DE EFICÁCIA DE UM TRATAMENTO, E, COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS

A invenção está no campo da imunoterapia. A presente invenção provê anticorpos úteis em aplicações terapêuticas e de diagnóstico alvejando SIRPa humana, os ditos anticorpos realçando a apresentação cruzada de antígenos para as células T. A invenção também provê anticorpos contra isoformas específicas de SIRPa e capazes de romper a interação entre estas isoformas de SIRPa e a CD47 humana para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou aplicações de diagnóstico e métodos para produzir e/ou selecionar anticorpos anti-SIRPA humana que se liguem com afinidades diferentes às várias isoformas de membros da SIRP humana.